

***Vakzinierungsstrategien gegen eine  
Echinococcus multilocularis-Infektion  
zur Charakterisierung protektiver  
Immunantworten.***

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim**

Institut für Zoologie  
Fachgebiet Parasitologie

vorgelegt von  
*Torsten Wassermann*

aus *Berlin*  
2010

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer  
1. berichtende Person: Prof. Dr. Ute Mackenstedt  
2. berichtende Person: Prof. Dr. Dr. Peter Kimmig  
2. berichtende Person: PD Dr. Wolfgang Beyer  
Eingereicht am: 20.05.2010  
Mündliche Prüfung am: 30.07.2010

Die vorliegende Arbeit wurde am 16.07.2010 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Hiermit erkläre ich, Dipl. Bio. Torsten Wassermann, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Ferner erkläre ich, dass nicht bereits früher oder gleichzeitig ein Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens unter Vorlage der hier eingereichten Dissertation gestellt wurde.

Stuttgart-Hohenheim den

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ute Mackenstedt für die Bereitstellung des Themas, die fortwährende Förderung, ihr Interesse an dem Gelingen und der Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Kimmig bedanke ich mich für die Begutachtung der Arbeit. Herrn PD Dr. Wolfgang Beyer danke ich für die fachliche Unterstützung, die kritischen Diskussionen und für die zusätzliche Begutachtung der Arbeit. Auch für die Bereitstellung von Bakterienstämmen und Plasmiden gilt ihm mein herzlichster Dank.

Herrn Dr. Michael Merli gilt mein Dank für die Betreuung und Hilfestellung bei den Tierversuchen, die Ratschläge und fachlichen Diskussionen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Thomas Romig bedanken, der stets ein offenes Ohr für jegliche Anliegen hatte und mit Ratschlägen nicht geizte.

Ein aufrichtiges Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Harald Rösner, der während meines Studiums das wissenschaftliche Interesse geweckt hat und mich in der Entscheidung für diese Promotion außerordentlich gestärkt hat.

Frau Sabine Hoche und Frau Birenbaum danke ich für die praktische Unterstützung bei der Laborarbeit und die Einführung in verschiedene molekularbiologische Arbeitsmethoden.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Fachgebietes Parasitologie der Universität Hohenheim für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere Yasmin, Nicole, Kremena und Sonja.

Mein innigster Dank gilt meiner Mutter für ihre langjährige Unterstützung, ohne die ich nicht da sein würde, wo ich jetzt bin.

Abschließend möchte ich Marion danken, der meine Dissertation gewidmet ist. Ohne Deine grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung wäre ich nicht in der Position in der ich jetzt glücklicherweise bin. Du warst immer für mich da und hast meine innere Ausgeglichenheit und Stärke aufgebaut und gefestigt, die ich während meiner Promotion und in schwierigen Lebenssituationen dringend gebraucht habe. Die vielen fachlichen Diskussionen und Ratschläge nicht zu vergessen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Landesgraduiertenförderungsgesetzes Baden-Württemberg von Juni 2005 bis Juli 2008 gefördert.

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Abkürzungen .....   | 5         |
| <b>1 Einleitung .....</b>   | <b>8</b>  |
| 1.1 <i>Echinococcus spec.</i> .....                                       | 8         |
| 1.2 <i>Echinococcus multilocularis</i> .....                              | 10        |
| 1.2.1 Die Alveoläre Echinokokkose .....                                   | 13        |
| 1.2.2 Immunologische Aspekte (Stand der Forschung) .....                  | 15        |
| 1.3 Vakzinierung gegen Zestoden .....                                     | 17        |
| 1.3.1 Immunisierungstudien gegen <i>Echinococcus multilocularis</i> ..... | 17        |
| <b>2 Zielsetzung .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>3 Materialien und Methoden.....</b>                                    | <b>21</b> |
| 3.1 Versuchstiere, Parasitenmaterial und Infektionsmodus .....            | 21        |
| 3.1.1 <i>Mus musculus</i> (BALB/c) .....                                  | 21        |
| 3.1.2 <i>Microtus arvalis</i> (Feldmaus) .....                            | 21        |
| 3.1.3 Herkunft des Parasitenmaterials .....                               | 21        |
| 3.1.4 Isolation von <i>E. multilocularis</i> -Eiern .....                 | 21        |
| 3.1.5 Bestimmung der Infektiosität .....                                  | 22        |
| 3.1.6 Infektion von BALB/c-Mäusen .....                                   | 22        |
| 3.1.7 Bestimmung und Auswertung der Metazestodenzahl .....                | 22        |
| 3.1.8 Immunisierung mit rekombinanten Antigenen .....                     | 24        |
| 3.1.9 Immunisierung mit Salmonellen als Carrier .....                     | 24        |
| 3.1.10 Blutentnahme, Gewinnung und Lagerung von Seren .....               | 25        |
| 3.2 Bakterien, Plasmide, Klonierung .....                                 | 26        |
| 3.2.1 Verwendete Bakterienstämme .....                                    | 26        |
| 3.2.2 Kultivierung von Bakterien.....                                     | 26        |
| 3.2.3 Lagerung von Bakterien .....  | 27        |
| 3.2.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....                     | 28        |
| 3.2.5 Verwendete Plasmid-Vektoren.....                                    | 29        |
| 3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion - PCR .....                               | 29        |
| 3.2.7 Primer .....  | 30        |
| 3.2.8 Präparation von Plasmid-DNA .....                                   | 31        |
| 3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....                     | 32        |
| 3.2.10 Agarosegelelektrophorese von DNA.....                              | 32        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.2.11   | DNA-Elution aus Agarosegelen .....   | 33        |
| 3.2.12   | Restriktionsverdau von DNA.....  | 33        |
| 3.2.13   | DNA-Ligation.....  | 33        |
| 3.2.14   | Transformation.....  | 33        |
| 3.2.15   | Bestimmung der Plasmidstabilität in Salmonellen .....  | 34        |
| 3.3      | Proteinextraktion und Westernblot .....  | 34        |
| 3.3.1    | Präparation von <i>E. multilocularis</i> – Gesamtantigen.....  | 34        |
| 3.3.2    | Proteinextraktion aus Bakterien (His-Tag-Protein-Aufreinigung mittels Ni-NTA) .....                                      | 35        |
| 3.3.3    | TCA-Fällung .....  | 36        |
| 3.3.4    | SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) .....  | 36        |
| 3.3.5    | Western-Blot (Nitrozellulose).....   | 38        |
| 3.4      | Quantitative PCR .....   | 40        |
| 3.4.1    | Präparation von RNA aus Gewebe (Milz).....   | 40        |
| 3.4.2    | RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) / cDNA Präparation .....  | 41        |
| 3.4.3    | Lightcycler - Real-time PCR .....  | 42        |
| 3.4.4    | Schwellenwert- und Cp- Wert- Bestimmung .....  | 43        |
| 3.4.5    | Schmelzkurvenanalyse .....   | 43        |
| 3.4.6    | Normalisierung.....  | 43        |
| 3.4.7    | Effizienzberechnung .....  | 44        |
| 3.4.8    | Berechnungsgrundlage der relativen Quantifizierung – Die $\Delta\Delta\text{CP}$ - Methode .....                         | 44        |
| 3.5      | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) .....   | 45        |
| 3.5.1    | Schachbrett-Titration .....  | 46        |
| 3.6      | Milzzellproliferation.....   | 47        |
| 3.6.1    | Zellkultur von Milzzellen .....  | 47        |
| 3.6.2    | Proliferationsassay .....  | 48        |
| 3.7      | Geräte und Software .....  | 49        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>50</b> |
| 4.1      | Gewinnung von <i>Echinococcus multilocularis</i> – Eiern .....   | 50        |
| 4.2      | Klonierung von <i>E. multilocularis</i> Antigenen.....   | 51        |
| 4.2.1    | Klonierung von emGAPDH in den Expressionsvektor pQE30 .....  | 53        |
| 4.2.2    | Klonierung von emGAPDH in den Expressionsvektor pVDL9.3.....   | 55        |
| 4.2.3    | Klonierung von em95 in den Expressionsvektor pQE30 .....   | 58        |
| 4.2.4    | Klonierung von em95 in den Expressionsvektor pVDL9.3 .....   | 60        |
| 4.2.5    | Transformation der Plasmide pVDL9.3-em95 und pVDL9.3-emGAPDH in<br>Zoosaloral H® ( <i>Salmonella typhimurium</i> ) ..... | 61        |
| 4.2.6    | Kontrolle auf Export der Antigene EM95 und EMGAPDH in den extrazellären<br>Raum .....                                    | 62        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 4.3      | Immunisierungsstudien mit dem rekombinanten Antigen EMGAPDH.....  | 64         |
| 4.3.1    | Milz Zellproliferationen nach subkutaner Immunisierung mit EMGAPDH .....  | 67         |
| 4.3.2    | Bildung spezifischer Antikörper gegen EMGAPDH .....   | 70         |
| 4.4      | Immunisierungsstudien mit dem rekombinanten Antigen EM95 .....  | 76         |
| 4.4.1    | Milz Zellproliferationen nach subkutaner Immunisierung mit EM95.....  | 79         |
| 4.4.2    | Bildung spezifischer Antikörper gegen EM95 .....  | 81         |
| 4.5      | Individualisierte Darstellung der Läsionen in den Immunisierungsstudien mit EM95<br>und EMGAPDH .....   | 88         |
| 4.6      | mRNA-Expression der Zytokine TGFβ, IFNγ, IL-10 in den Milzzellen.....   | 89         |
| 4.6.1    | Schmelzkurven-Analyse .....   | 90         |
| 4.6.2    | Generierung von externen Standards.....   | 92         |
| 4.6.3    | Expression von IFNγ, TGFβ und IL-10 nach 4 wpi mit <i>E. multilocularis</i> .....   | 93         |
| 4.6.4    | Expression von IFNγ, TGFβ und IL-10 nach Immunisierung mit EM95 .....   | 95         |
| 4.6.5    | Expression von IFNγ, TGFβ und IL-10 nach Immunisierung mit EMGAPDH.....   | 99         |
| 4.6.6    | Zusammenfassung der Expression von IFNγ, TGFβ und IL-10 in den Immuni-<br>-sierungsstudien mit den rekombinanten Antigenen EM95 und EMGAPDH ..... | 103        |
| 4.7      | Vorversuche zur Immunisierung mit <i>Salmonella typhimurium</i> .....   | 104        |
| 4.7.1    | Bestimmung der Generationszeit der Reisolat (RI) .....  | 104        |
| 4.7.2    | Bestimmung der Plasmidstabilität.....   | 106        |
| 4.8      | Immunisierungsstudien mit <i>Salmonella typhimurium</i> als Carrier für protektive<br>Antigene .....  | 107        |
| 4.8.1    | Immunisierungsstudie 1 mit den <i>Salmonella</i> -Impfstämmen ZpVDL9.3EM95 und<br>ZpVDL9.3EMGAPDH.....  | 108        |
| 4.8.2    | Immunisierungsstudie 2 mit den <i>Salmonella</i> -Impfstämmen ZpVDL9.3EM95 und<br>ZpVDL9.3EMGAPDH.....  | 111        |
| 4.8.3    | Milz Zellproliferation der Immunisierungsstudien mit <i>Salmonella typhimurium</i> als<br>Carrier für die Antigene EM95 und EMGAPDH.....          | 114        |
| 4.8.4    | Bildung von Antikörpern gegen <i>Salmonella</i> und von <i>Salmonella</i> produzierte<br>Antigene .....   | 118        |
| 4.9      | <i>post infectionem</i> Immunisierung mit EM95 .....  | 122        |
| 4.10     | Bildung von IgG-Antikörpern gegen <i>Echinococcus multilocularis</i> –<br>Gesamtantigene.....   | 124        |
| 4.11     | Expression von IFNγ, TGFβ und IL-10 nach 46, 49, 62 und 101 Tagen<br>Infektionsdauer mit <i>E. multilocularis</i> .....                           | 125        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion .....</b>   | <b>130</b> |
| 5.1      | Primäre und sekundäre Alveoläre Echinokokkose .....   | 130        |
| 5.2      | Geeignete Mausstämme .....  | 132        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 5.3      | Immunantworten nach <i>E. multilocularis</i> - Infektion .....                | 133        |
| 5.4      | Zytokinexpression nach <i>E. multilocularis</i> - Infektion .....             | 134        |
| 5.5      | Vakzinierungsstudien .....  | 137        |
| 5.6      | Immunisierungsstudien von BALB/c-Mäusen mit rekombinanten EMGAPDH .....       | 139        |
| 5.7      | Immunisierungsstudien von BALB/c-Mäusen mit rekombinanten EM95.....           | 140        |
| 5.8      | Vergleich der Immunantworten nach Immunisierung mit EM95 und EMGAPDH.         | 142        |
| 5.9      | Expression von EM95 und EMGAPDH durch <i>Salmonella typhimurium</i> .....     | 145        |
| 5.9.1    | Export von Antigenen mittels des $\alpha$ -Hämolyisin Sekretionssystems ..... | 146        |
| 5.10     | Immunisierungsstudien mit <i>Salmonella</i> -Vektoren .....                   | 148        |
| 5.11     | <i>Post-infectionem</i> Vakzinierung mit EM95 .....                           | 151        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>152</b> |
| <b>7</b> | <b>Summary</b> .....  | <b>155</b> |
| <b>8</b> | <b>Literatur</b> .....  | <b>158</b> |



**Abkürzungen**

|       |   |
|-------|---|
| Abb.  | Abbildung   |
| AE    | Alveoläre Echinokokkose   |
| AK    | Antikörper  |
| APS   | Ammoniumperoxodisulfat  |
| ASD   | Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd-Dehydrogenase  |
| bp    | Basenpaare  |
| BrdU  | Bromdesoxyuridin  |
| BSA   | Bovines-Serum-Albumin   |
| CD    | Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen ( <i>cluster of differentiation</i> ) |
| cDNA  | komplementäre DNA   |
| cm    | Zentimeter  |
| ConA  | Concanavalin A  |
| dATP  | Desoxyadenosintriphosphat   |
| DAP   | 2,6-Diaminopimelinsäure, Komponente der Bakterienzellwand                                 |
| dCTP  | Desoxycytidintriphosphat  |
| DEPC  | Diethyl dicarbonat  |
| dGTP  | Desoxyguanosintriphosphat   |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid  |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )                                   |
| DNase | Deoxyribonuclease   |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate   |
| dpi.  | Tage nach der Infektion ( <i>days post infection</i> )                                    |
| DTT   | Dithiothreitol  |
| dTTP  | Desoxythymidintriphosphat   |
| EDTA  | Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )                   |
| ELISA | Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )        |
| Em    | <i>Echinococcus multilocularis</i>  |
| Eg    | <i>Echinococcus granulosus</i>  |
| EtOH  | Ethanol   |
| for   | 5'-3' Primer ( <i>forward</i> )   |
| FCS   | Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )   |
| g     | Gramm   |
| g     | Gravitationskonstante   |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  |
| GL    | Gebrauchslösung   |
| GST   | Glutathion-S-Transferase  |

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| H                                  | Stunde(n)  |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> | bidestilliertes Wasser   |
| HIS                                | Histidin   |
| i.p.                               | intraperitoneal  |
| Ig                                 | Immunoglobulin(e)  |
| IL                                 | Interleukin  |
| IFN <sub>γ</sub>                   | Interferon $\gamma$  |
| IPTG                               | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid   |
| kb                                 | Kilobasen  |
| KbE                                | Koloniebildende Einheit  |
| kbp                                | Kilobasenpaare   |
| kDa                                | Kilodalton   |
| l                                  | Liter  |
| LB                                 | Luria-Bertani (Medium)   |
| $\mu$ l                            | Mikroliter   |
| $\mu$ g                            | Mikrogramm   |
| m                                  | Milli  |
| M                                  | Molar (mol/l)  |
| min                                | Minuten  |
| mpi                                | Monat(e) nach der Infektion  |
| mRNA                               | Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )   |
| ng                                 | Nanogramm  |
| NK                                 | Natürliche Killerzellen  |
| nm                                 | Nanometer  |
| NO                                 | Stickstoffmonoxid  |
| OD                                 | Optische Dichte  |
| p.i.                               | post infectionem (nach der Infektion)  |
| PAGE                               | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| PBS                                | Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )                             |
| pH                                 | negative dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität ( <i>potentia hydrogenii</i> ) |
| rev                                | 3'-5' Primer ( <i>reverse</i> )  |
| RT                                 | Raumtemperatur   |
| s.c.                               | subkutan   |
| SCID                               | schwerer kombinierter Immundefekt ( <i>severe combined immunodeficiency</i> )                  |
| sec                                | Sekunden   |
| SD                                 | Standardabweichung der Stichprobe  |
| SDS                                | Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium lauryl sulfate</i> )   |
| Sj                                 | <i>Schistosoma japonicum</i>   |

## Abkürzungen

|              |   |
|--------------|---|
| SL           | Stammlösung   |
| Sm           | <i>Schistosoma mansoni</i>  |
| Sh           | <i>Schistosoma haematobium</i>  |
| STP          | Squalen-Tween-Pleuronic (Adjuvans)                                    |
| Tab.         | Tabelle   |
| TBS          | Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )        |
| TCA          | Trichloressigsäure ( <i>trichloroacetic acid</i> )                    |
| TE           | Tris-EDTA-Puffer  |
| TEMED        | Tetramethylethyldiamin  |
| TFB          | Transformationspuffer   |
| TGF          | <i>Transforming Growth Factor</i> (Transformierender Wachstumsfaktor) |
| Th1/Th2      | T-Helferzellen  |
| TNF $\alpha$ | Tumornekrose-Faktor alpha   |
| To           | <i>Taenia ovis</i>  |
| Tris         | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                       |
| U            | Unit = Enzym-Einheit  |
| ÜN           | über Nacht  |
| UV           | Ultraviolettes Licht  |
| Vol          | Volumen   |
| well         | Kavität (Vertiefung) einer Mikrotiter- bzw. Zellkulturplatte          |
| w/v          | Gewicht pro Volumeneinheit ( <i>weight/volume</i> )                   |
| wpvacc.      | Woche(n) nach der Vakzinierung  |

## 1 Einleitung

### 1.1 Echinococcus spec.

Die Gattung *Echinococcus* gehört zur Familie der Taeniidae, Klasse Cestoda, Ordnung Cyclophyllidea. Zestoden (Bandwürmer) sind global verbreitete Erreger veterinär- wie humanmedizinisch bedeutender Parasitosen. Der Lebenszyklus involviert stets zwei Säuger, die in einem Räuber-Beute-Verhältnis zueinander stehen. Während die fast ausschließlich im Darm des Endwirtes (karnivore Säuger) lebenden adulten Zestoden nur bei sehr starkem Befall Schädwirkungen auslösen, sind die Larvenstadien (= Metazestoden) für die oftmals ausgeprägte Pathogenität im Zwischen- oder Fehlwirt verantwortlich. Diese infizieren sich durch die orale Aufnahme von Eiern, welche von den Endwirten direkt oder noch in den Proglottiden ausgeschieden werden. Die aus dem Ei freigesetzte Hakenlarve (Onkosphäre) durchdringt die Darmwand und gelangt über die Vena portae in die inneren Organen und entwickelt sich dort zu dem Metazestoden. Infektiöse Metazestoden weisen üblicherweise zahlreiche Protoskolizes auf (vegetative Vermehrung), welche wiederum das Potenzial besitzen, sich nach Aufnahme durch den Endwirt zu adulten Zestoden zu entwickeln. Im Unterschied zur Gattung *Taenia* sind alle *Echinococcus*-Arten weniggliedrig und sehr klein (< 7 mm). Taeniiden zeichnen sich insbesondere durch ihre Komplexität und den im Entwicklungszyklus vielschichtigen Wirt-Parasit-Interaktionen aus. Zudem sind Metazestoden in der Lage, auf vielfältige Weise der Wirtsimmunantwort zu entgehen, bzw. durch Immunmodulation den Wirt in einer für den Parasiten günstigen Weise zu beeinflussen (Gottstein & Hemphill, 2008; Siracusano *et al.*, 2008; Vuitton, 2003).

Gegenwärtig werden innerhalb der Gattung *Echinococcus* neun Arten unterschieden:

*Echinococcus granulosus* („Hundebandwurm“) stellt einen Komplex von sehr nahe verwandten Stämmen dar (Thompson & McManus, 2002). Diese Art ist kosmopolitisch verbreitet, nur sehr wenige Länder gelten als *E. granulosus*-frei. Endwirte sind vor allem Vertreter aus der Familie der Caniden aber auch andere Carnivora (Feliden und Hyaeniden). Die Zwischenwirtspräferenz beinhaltet außer Ungulaten zahlreiche andere Tierfamilien, darunter Marsupialier, Rodentia und Primaten (Jenkins & Macpherson, 2003). Die im Zwischenwirt hervorgerufene Erkrankung, die zystische Echinokokkose (auch Hydatidose), verursacht aufgrund der humanmedizinischen und veterinärmedizinischen Bedeutung in einigen Ländern ökonomische Probleme (Eckert & Deplazes, 2004).

Phylogenetische Studien, basierend auf der Analyse mitochondrialer und nukleärer Gene, offenbarten, dass die Genotypen 6 bis 10 von *E. granulosus* nicht dieser Art zuzuordnen sind, sondern einen eigenen Zweig im Stammbaum der Gattung *Echinococcus* bilden (Nakao *et al.*, 2007; Saarma *et al.*, 2009). Es bleibt noch zu klären, ob alle abweichenden Genotypen unter den Artnamen *E. canadensis* zusammengefasst werden, oder ob zwei, auf Zerviden

beschränkte „Stämme“ separat von *E. canadensis* unter dem Namen *E. intermedius* geführt werden sollen (Saarma *et al.*, 2009; Thompson, 2008).

*Echinococcus felidis* wurde 1937 von Ortlepp beschrieben (Ortlepp, 1937). Dieser, wohl auf Afrika beschränkte Zestode wurde aufgrund von geringen morphologischen Besonderheiten, aber vor allem wegen der Tatsache, dass Feliden (z.B. *Panthera leo*) dessen Endwirte sind, als eigenständige Art klassifiziert. 1965 wurde diese *Echinococcus*-Art aufgrund mangelnder prägnanter Unterschiede bezüglich der Morphologie dem *Echinococcus granulosus* Komplex zugeordnet (Verster, 1965). Die jüngste genetische Charakterisierung, basierend auf ugandischen und südafrikanischen *Echinococcus*-Proben, bestätigte jedoch Ortlepps Darstellung einer eigenständigen Art (Hüttner *et al.*, 2007).

*Echinococcus equinus* und *Echinococcus ortleppi* erlangten erst in jüngster Zeit den Status eigener Arten. Sie galten früher als Genotypen von *Echinococcus granulosus*, wurden jedoch aufgrund ihres sympatrischen Vorkommens mit *E. granulosus*, mit dem eine Hybridisierung bisher nicht nachgewiesen werden konnte, als eigenständige Arten klassifiziert (Thompson & McManus, 2002). Zudem konnten immer umfangreichere genetische Daten ihre Eigenständigkeit unterstreichen. Das Verbreitungsgebiet von *E. equinus* erstreckt sich über Europa, den Mittleren Osten, Süd-Afrika, Neuseeland und die USA. *E. ortleppi* wurde in Europa, Afrika, Indien, Nepal, Sri Lanka, Russland und Süd-Amerika nachgewiesen. Beiden Arten wird durch ihre spezifische Zwischenwirtspräferenz (*E. equinus* – Pferde und *E. ortleppi* – Rinder) eine veterinärmedizinische Relevanz zugesprochen, wogegen nur von *E. ortleppi* humane Infektionen bekannt sind (Eckert & Deplazes, 2004).

*Echinococcus oligarthra* und *Echinococcus vogeli* gelten als Erreger der polyzystischen Echinokokkose. Ihre Verbreitung ist auf Zentral- und Südamerika beschränkt. Das Spektrum der Zwischenwirte beinhaltet bei beiden Zestoden Agoutis (Dasyproctidae) und Pakas (*Cuniculus paca*). Als Endwirte dienen für *E. vogeli* Caniden, v.a. *Speothos venaticus*, für *E. oligarthrus* Feliden wie *Panthera onca*, *Puma concolor* u.a. (Tappe *et al.*, 2008). Bedingt durch ihr begrenztes Verbreitungsgebiet und die nur sehr seltenen humanmedizinisch relevanten Fälle sind diese Arten von geringerer Bedeutung (D'Alessandro & Rausch, 2008).

Ein erst seit Jüngstem näher beschriebener Vertreter dieser Gattung stellt *Echinococcus shiquicus* dar. Diese Art wurde 2004 im tibetischen Qinghai-Plateau entdeckt und beschrieben (Xiao *et al.*, 2006). Bislang wurde dieser Parasit nur in Pikas (*Ochotona curzoniae*) und Tibetfüchsen (*Vulpes ferrilata*) gefunden. Zur Klärung, inwieweit *E. shiquicus* für den Menschen eine Gefahr darstellt, bedarf es näherer Untersuchungen. Jüngste Untersuchungen zeigen jedoch, dass die humane Echinokokkose (alveoläre und zystische Echinokokkose) im Verbreitungsgebiet von *E. shiquicus* mit 12,9% Befallshäufigkeit der Bevölkerung die weltweit höchste Prävalenz aufzeigt (Tiaoying *et al.*, 2005).

## 1.2 Echinococcus multilocularis

Das Vorkommen von *Echinococcus multilocularis*, dem Erreger der alveolären Echinokokkose (AE), beschränkt sich nahezu auf die gesamte nördliche Hemisphäre. Die Hauptverbreitungsgebiete sind Japan, China, Sibirien, ausgedehnte Gebiete Nordamerikas und weite Teile Mitteleuropas (siehe Abb. 1.2.1). Trotz geringer Variationen im Genotyp Nordamerikanischer und Eurasischer Isolate besteht kein Hinweis auf eine klare Unterscheidung in Stämme wie bei *E. granulosus* (Haag *et al.*, 1997; Knapp *et al.*, 2008; Nakao *et al.*, 2009).

Die bevorzugten Endwirte von *E. multilocularis* sind Polarfuchs (*Alopex lagopus*) und Rottfuchs (*Vulpes vulpes*). Jedoch können auch andere Caniden wie Kojoten (*Canis latrans*), Marderhunde (*Nyctereutes procyonoides*) sowie Wölfe (inklusive Haushunde, *Canis lupus*) diese Rolle einnehmen. Die natürlichen Zwischenwirte sind vor allem Kleinsäuger aus den Familien der Wühler (Cricetidae) und Mäuse (Muridae), wobei letztere ungleich seltener befallen werden. Als weitere Zwischen- bzw. Fehlwirte können sich auch Pferde (*Equus sp.*), Nutrias (*Myocastor coypus*), Haus- (*Sus scrofa domesticus*) und Wildschweine (*Sus scrofa*) unter natürlichen Umständen mit dem Fuchsbandwurm infizieren. Ebenso kann die alveoläre Echinokokkose in Primaten, wie auch im Menschen, auftreten (Eckert & Deplazes, 2004).



Abb. 1.2.1: Verbreitung des Fuchsbandwurmes *Echinococcus multilocularis* (entnommen aus: WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern (Eckert *et al.*, 2002)).

Der adulte „Kleine Fuchsbandwurm“ gliedert sich in einen mit doppeltem Hakenkranz besetzten Skolex (Kopfteil) und eine Strobila (Gliederkette) mit drei bis fünf Proglottiden (Einzelgliedern) und erreicht eine Größe von bis zu 4,5 mm. Die letzte Proglottis ist im reifen Zustand mit ca. 300-500 Eiern gefüllt ist, löst sich nach 4 - 6 Wochen Präpatenz von der Strobila und wird mit dem Kot des befallenen Endwirts ausgeschieden (Frank, 1984). Da ein Fuchs bei Massenbefall bis zu mehrere tausend Zestoden asymptomatisch beherbergen kann, ist die Anzahl der in die Umwelt abgegebenen Eier enorm. Die Eier bleiben unter günstigen Bedingungen mehrere Monate infektiös (Veit *et al.*, 1995). Nach Aufnahme durch einen geeigneten Zwischenwirt schlüpft, angeregt durch das alkalische Milieu im Dünndarm, die Onkosphäre. Diese durchdringt mit Hilfe von proteolytischen Enzymen und ihrer sechs Haken die Darmwand und gelangt über das Pfortadersystem in die Leber. Die Entwicklung zum Metazestoden erfolgt durch Zellproliferation, Vesikularisation und Bildung einer peripheren Laminarschicht. Das Metazestoden-Stadium ist gekennzeichnet durch die Entwicklung von alveolären Strukturen, bestehend aus zahlreichen kleinen Vesikeln. Mit der Ausbildung von Keimschläuchen, welche infiltrativ in das angrenzende Gewebe vordringen, wird die komplette Leber durchwachsen. An den Keimschläuchen bilden sich Brutkapseln, in denen durch asexuelle Knospung die Bildung von Protoskolizes (Kopfanlagen) erfolgt. Die tumorartige Proliferation des Metazestoden erreicht eine Ausdehnung von anfänglich mikroskopisch kleinen Läsionen bis hin zu 20 cm Durchmesser beim Fehlwirt Mensch (Ammann & Eckert, 1996). Natürliche Zwischenwirte sterben an der Infektion, wenn sie nicht zuvor aufgrund ihrer zunehmenden Immobilität von Prädatoren erbeutet werden. In letzterem Fall schließt sich der Lebenszyklus von *Echinococcus multilocularis*, da Protoskolizes im Darm des Endwirts frei werden und sich an den Krypten der Darmmukosa festsetzen und zu adulten Bandwürmern heranwachsen (Abb. 1.2.1).

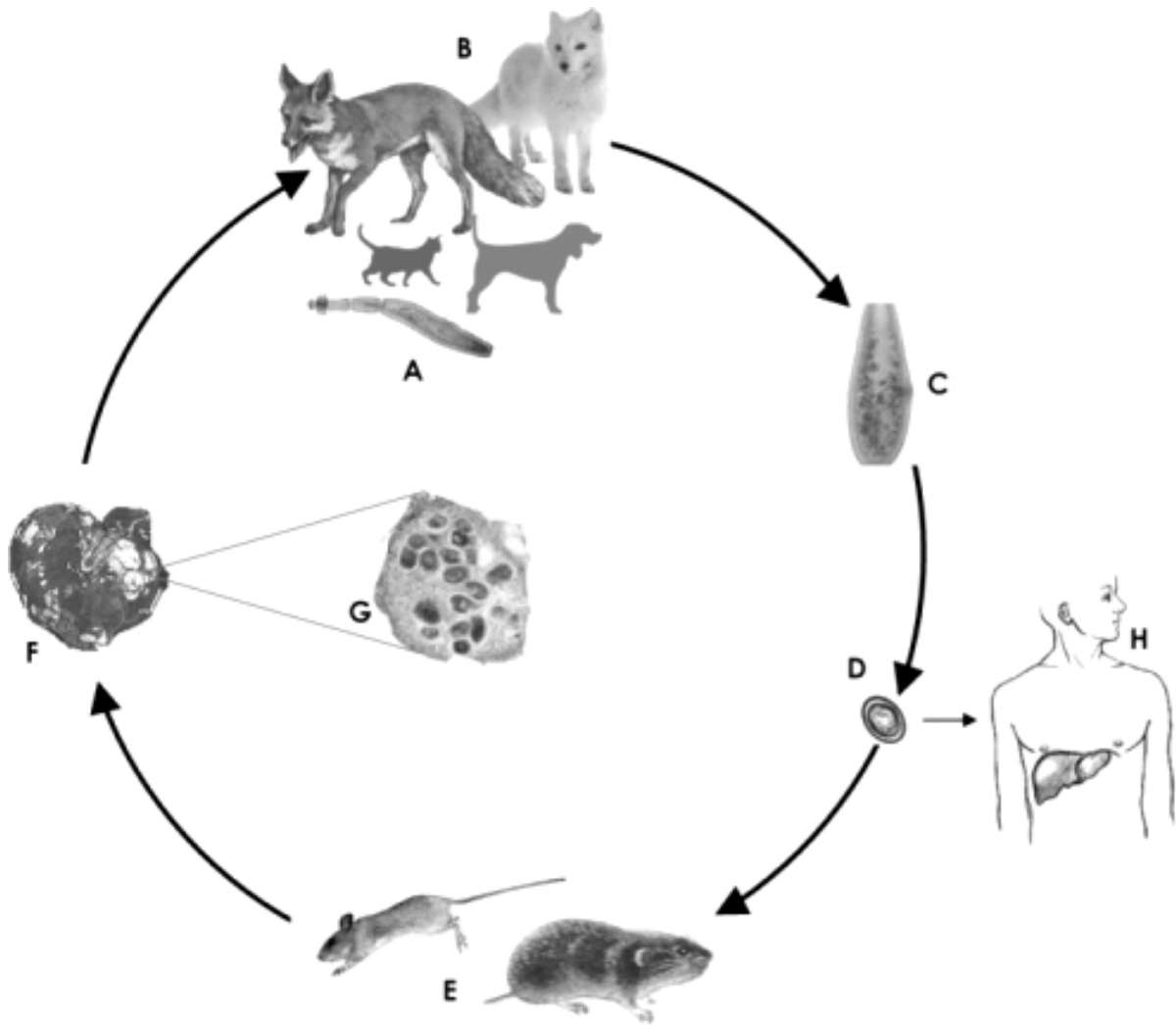


Abb. 1.2.2 Lebenszyklus des Fuchsbandwurmes *Echinococcus multilocularis* (nach Eckert et al. 2002). (A) Adulter Zestode, (B) Endwirte, (C) Proglottis mit Eiern, (D) Ei mit Onkosphäre, (E) natürliche Zwischenwirte, (F) Leber von *M. arvalis* mit Metazestoden, (G) einzelner Metazestode mit Protoskolizes, (H) Fehlwirt Mensch.



### 1.2.1 Die Alveoläre Echinokokkose

Die alveoläre Echinokokkose, ist eine seltene, jedoch laut WHO die gefährlichste, parasiteninduzierte Zoonose in Mitteleuropa (Eckert *et al.*, 2002).

Die Infektion des Fehlwirts Mensch erfolgt – wie beim natürlichen Zwischenwirt - durch die orale Aufnahme von infektiösen Eiern. Die Metazestoden siedeln sich in der Leber an, welche in Folge des tumorartig, proliferativen Wachstums des Parasiten lebensbedrohlich zerstört werden kann. Nach der anfänglich exklusiven Besiedlung der Leber ist eine Expansion auf angrenzende Bereiche (Bauchhöhle) oder sogar entfernte Organe (Lunge, Knochen) relativ häufig. Das Wachstum der Larvalstadien im Fehlwirt Mensch ist, verglichen mit der in dem „empfindlicheren“ natürlichen Zwischenwirten, stark verlangsamt, so dass die Inkubationsperiode 5 bis 15 Jahre betragen kann (Eckert & Deplazes, 2004). Die Diagnose erfolgt zumeist mit Hilfe der Computer-Tomographie, wobei Ultraschall-Untersuchungen das Mittel der Wahl für größer angelegte Screenings darstellen (Kern *et al.*, 2000). Serologische Tests (z.B. Em2plus-ELISA) bilden eine weitere Möglichkeit der Krankheitsbestimmung, jedoch ist deren Sensitivität und Spezifität in Bezug auf größere Patientengruppen nur bedingt befriedigend (Hanle *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 1995). Ein chirurgischer Eingriff ist derzeit die erste Wahl zur Behandlung der AE, wobei allerdings auf eine radikale Resektion des Parasitengewebes geachtet werden muss. Jedoch wird die Sektion als kurative Behandlung aufgrund der in der Regel späten Diagnosestellung und somit großflächigen Infiltration der Leber nur selten in Betracht gezogen. Empfohlen werden daher chemotherapeutische Maßnahmen, welche jedoch ein Leben lang beibehalten werden müssen. Die dabei zur Anwendung kommenden Benzimidazole (Albendazol, Mebendazol) zeigen einerseits nur parasitostatische Effekte und sind von starken Nebenwirkungen begleitet (Hemphill & Muller, 2009; Kern *et al.*, 2000). Die Mortalitätsrate einer unbehandelten alveolärer Echinokokkose liegt bei über 90 % (Stocker U. & M, 2006).

Grund zur Besorgnis geben Hinweise auf die zunehmende Verbreitung des Parasiten in Mitteleuropa (Romig *et al.*, 2006), sowie der Nachweis von *E. multilocularis* in Gebieten, welche als fuchsbandwurmfrei galten (Hegglin *et al.*, 2008; Manfredi *et al.*, 2006; Romig, 2009; Saeed *et al.*, 2000; Saeed *et al.*, 2006). Ob es sich dabei um eine tatsächliche Ausbreitung des Parasiten oder um ein Produkt erhöhter Aufmerksamkeit bzw. verbesserter Untersuchungsmethoden handelt, bleibt strittig. Jedoch ist in den traditionellen Endemiegebieten eine Zunahme der Befallshäufigkeit des Endwirtes Fuchs nachgewiesen, mit Prävalenzen von häufig über 50 % bis nahe 100 % (Romig, 2003). Weiterhin verzeichnet man in Deutschland aufgrund intensiver Tollwutbekämpfungs-Maßnahmen eine starke Zunahme der Fuchspopulation. Die Parasitendichte (Biomasse Eier) hat sich demzufolge in Süddeutschland seit 1990 verzehnfacht (Romig, 2003; Romig, 2009). Zudem entsteht durch die Etablierung so genannter Stadtfuchspopulationen (urbaner Zyklus) ein ansteigender Infektionsdruck auf

weitere Bevölkerungsgruppen (Deplazes *et al.*, 2004). Eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Prävalenz im Endwirt und humanen Infektionen scheint sowohl für Mitteleuropa als auch für Hokkaido (Japan) als bestätigt zu sein (Kimura *et al.*, 1999; Schweiger *et al.*, 2007). Dennoch ist die alveoläre Echinokokkose des Menschen, trotz der weiten Verbreitung und der in den Hochendemiegebieten sehr hohen Prävalenz im Endwirt Fuchs, eine seltene Krankheit (Romig, 2003). Es wird angenommen, dass lediglich 10 % der exponierten Personen (orale Aufnahme von Eiern) eine progressive AE entwickeln (Gottstein & Hemphill, 1997). Abortive Verläufe oder Spontanheilungen scheinen die Regel zu sein (Vuitton, 2003). Die Ursachen hierfür sind bisher weitgehend ungeklärt. Möglicherweise spielt eine immungenetische Prädisposition dabei eine Schlüsselrolle. Aber auch der Immunstatus der exponierten Personen (Immundefizienz, weitere Erkrankungen, Alter) kann für die Etablierung der Infektion ausschlaggebend sein (Gottstein & Felleisen, 1995; Vuitton, 2003). Die jährliche Inzidenz wird für Mitteleuropa mit 0,02 bis 1,2 Fällen pro 100.000 Einwohner geschätzt. Im Zeitraum von 1982 bis 2000 wurden insgesamt 559 Erkrankungen (Stocker U. & M, 2006) an AE im 1998 etablierten Europäischen Echinokokkoseregister (EurEchinoReg) erfasst. Seit 2001 ist die AE in Deutschland nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtig. In den Jahren von 2001 bis 2008 wurden 151 Erkrankungsfälle in Deutschland gemeldet, wobei die meisten Fälle aus Baden-Württemberg stammen (Robert-Koch-Institut, Berlin, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>). Trotz der geringen Anzahl an Humaninfektionen verdient diese Zoonose besondere Beachtung. Aufgrund der Schwere des Krankheitsverlaufes, sowie der enorm hohen Behandlungskosten pro Patient, sind Strategien zur Eindämmung und Verhinderung der Parasitose durchaus gerechtfertigt (Eckert & Deplazes, 2004; Romig *et al.*, 1999). Anstrengungen, die Verbreitung und Prävalenz von *E. multilocularis* zu verringern, wurden und werden durchgeführt. In den neunziger Jahren wurde zum Beispiel die Anzahl infizierter Füchse in Süddeutschland signifikant verringert, indem wiederholt Praziquantel-Köder über hoch endemischen Gebieten mit Hilfe von Flugzeugen abgeworfen wurden (Romig, 2009; Schelling *et al.*, 1997). Diese auf einen längeren Zeitraum basierenden Kontrollmaßnahmen sind erfolgreiche, jedoch auch sehr kostspielige Verfahren zur Bekämpfung des Fuchsbandwurms.

In anderen Endemiegebieten, wie China und West-Alaska (und Nordostsibirien) gelten domestizierte Hunde als Hauptursache für humane Infektionen (Danson *et al.*, 2006; Stehr-Green *et al.*, 1988). So sind in ländlichen Gegenden Nordost-Chinas bis zu 9 % der Bevölkerung infiziert (Yang *et al.*, 2006). Auf St. Lawrence Island im Beringmeer gelten ähnlich hohe Infektionsraten unter den dort lebenden Eskimos. Die auf St. Lawrence heimischen Wühlmäuse (*Microtus oeconomus*) weisen eine Befallsrate von bis zu 83 % auf. Hunde, die sich auf der Inselgruppe teilweise von diesen Wühlmäusen ernähren, sind bis zu 12 % mit *E. multilocularis* infiziert. Dieser synanthropische Zyklus stellt ein enormes Risiko für die ansässige Bevölkerung dar (Rausch & Fay, 2002).

### 1.2.2 Immunologische Aspekte (Stand der Forschung)

Verschiedene seroepidemiologische Studien lassen vermuten, dass die Mehrzahl der exponierten Personen, bei denen eine Serokonversion stattfand, in der Lage ist, eine *E. multilocularis*-Infektion abzuwehren (Gottstein *et al.*, 1985; Romig *et al.*, 1999). Neben den wenigen Personen mit einem progressiven Krankheitsverlauf finden sich einige mit detektierbaren intrahepatischen, jedoch kalzifizierten Läsionen. Diese Menschen zeigten demnach einen abortiven Infektionsverlauf und waren somit in der Lage, die Metazestoden abzutöten (Godot *et al.*, 2000). Bei einer weiteren Personengruppe konnten *E. multilocularis*-spezifische-Antikörper nachgewiesen werden, sie zeigten jedoch weder Symptome einer Infektion noch Auffälligkeiten im Lebergewebe. Die Mechanismen, durch welche es der letztgenannten Personengruppen gelingt, den Parasiten zu eliminieren, sind nicht geklärt. Godot *et al.* (2000) vermuten eine immunogenetisch fixierte Prädisposition, die eventuell mit einem bestimmten Humanen Leukozyten Antigen (HLA) - Muster assoziiert ist (Eiermann *et al.*, 1998). Diese Thesen werden von tierexperimentellen Studien an Mäusen unterstützt, da auch dort zwischen empfänglichen (z.B. C57BL/6J, BALBc) und resistenten (z.B. C57BL/10J) Stämmen unterschieden werden muss (Ali-Khan *et al.*, 1988; Bresson-Hadni *et al.*, 1994; Gottstein *et al.*, 1994). Als eine weitere Ursache protektiver Mechanismen wären immunologische Modifikationen aufgrund von anderen Infektionen denkbar.

Als effektiver Mechanismus gegen die Infektionsstadien (Onkosphäre) wird zumindest für *Echinococcus granulosus* die antikörpervermittelte Komplementlyse der Onkosphären angesehen (Heath *et al.*, 1994), daneben sind wohl auch zelluläre Mechanismen in der Lage, frühe Leberstadien abzutöten (Vuitton, 2003). Der etablierte Metazestode scheint allerdings, durch die Ausbildung der den Parasiten zum Wirtsgewebe hin abgrenzenden, azellulären Lamina, weitgehend gegen die Immunantworten des Wirtes abgeschirmt zu sein (Gottstein *et al.*, 2002; Gottstein *et al.*, 2006).

Die überwiegende Anzahl der bislang durchgeführten tierexperimentellen Studien basieren auf dem Modell der sekundären Echinokokkose. Dabei wurde den Versuchstieren intraperitoneal, intrahepatisch oder subkutan eine Protoskolizes-Suspension bzw. Metazestodengewebe appliziert (Hintz, 1972; Liance *et al.*, 1984). Die sekundäre alveoläre Echinokokkose entspricht jedoch nicht dem natürlichen Weg einer Infektion. Im Besonderen bleibt die frühe Phase (Wanderung der Onkosphäre, Etablierung des Metazestoden in der Leber) unberücksichtigt. Darüber hinaus ist eine Beeinflussung der zellulären Immunreaktion durch die Injektion bzw. den operativen Eingriff nicht auszuschließen. Der zellulären Immunität scheint aber bei der Eindämmung des proliferativen Wachstums des Metazestoden eine besondere Bedeutung zu zukommen, da sowohl beim Menschen, als auch im Tiermodell ein progressiver Krankheitsverlauf mit Th2-, ein retardierter Verlauf dagegen mit Th1-assoziierten Immunantworten korreliert werden konnte (Dai & Gottstein, 1999; Emery *et al.*, 1996; Gottstein

*et al.*, 2002; Jenne *et al.*, 1997; Sturm *et al.*, 1995; Vuitton, 2003; Wellinghausen *et al.*, 1999). Unterstützt wird diese Hypothese jedoch nur von Experimenten, in denen die Tiere intraperitoneal (sekundäre AE) infiziert wurden. Dabei zeigten „resistente“ C57BL/10J-Mäuse eine Th1-dominante Zytokin-Sekretion (IL-2, IFN $\gamma$ ), die mit einem langsamen Wachstum des Parasiten assoziiert werden konnte. Schnelles Wachstum dagegen war bei dem „empfindlichen“ Mausstamm C57BL/6J mit der Sekretion von Th2-Zytokinen (IL-10) verknüpft. Bauder *et al.*, (1999) konnten dagegen diese Unterschiede in der Immunreaktion beider Mausstämme nach oraler Infektion (natürlicher Weg) nicht erkennen. Eine gemischte Th1/Th2 scheint zumindest für den progressiven Verlauf der murinen primären Alveolären Echinokokkose wahrscheinlich zu sein (Bauder *et al.*, 1999).

Frühere Studien zeigten, dass auch durch die unspezifische Stimulation des zellulären Arms der Immunantwort mit Bacille Calmette Guerin oder Isoprinosin das proliferative Wachstum und eine Ausbreitung des Parasiten deutlich reduziert werden konnte (Rau & Tanner, 1975; Reuben & Tanner, 1983; Sarciron *et al.*, 1992). Untersuchungen mit dem Ziel, mittels Applikation bestimmter Zytokine (IL12, IFN $\alpha$ -2a) die Immunantwort des Wirtes Richtung Th1-dominierte Antworten zu modulieren und so das Wachstum des Parasiten zu stoppen, waren nicht nur im Mausmodell der sekundären AE (Emery *et al.*, 1998; Godot *et al.*, 2003), sondern teilweise auch im Menschen erfolgreich (Harraga *et al.*, 1999). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass der Parasit in der Lage ist, die Wirtsimmunantwort in Richtung Th2-dominiert zu modulieren. Besondere Bedeutung wird hierbei der Laminarschicht des Parasiten zugesprochen (Dai *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2004).

### 1.3 Vakzinierung gegen Zestoden

Die Grundlage für eine Vakzinierung gegen Zestoden wurde schon in den 1930er Jahren gelegt, als Miller entdeckte, dass Ratten, die mit *Taenia taeniaeformis* (damals *Cysticercus fasciolaris*) infiziert waren, immun gegen eine weitere Infektion mit diesem Parasiten sind (Lightowlers, 2006). Später konnte gezeigt werden, dass diese Immunität auf sekretierte Antigene von Onkosphären beruht (Rickard & Bell, 1971). Eine Vielzahl von Experimenten bestätigten, dass protektive Immunantworten gegen die Larvalstadien von Zestoden vor allem durch eine Immunisierung mit Onkosphärenderivaten induziert werden können (Dempster *et al.*, 1992; Heath *et al.*, 1981; Rajasekariah *et al.*, 1982). Auf dieser Basis wurden zwischenzeitlich effektive rekombinante Vakzinen entwickelt, mit denen in verschiedenen Studien Schutz vermittelt werden konnte (*T. ovis*, *T. saginata*, *T. solium*, *E. granulosus*; Übersicht in Lightowlers *et al.*, 2006). Obwohl dadurch gezeigt wurde, dass es möglich ist, gegen komplexe metazoale Parasiten zu impfen, bleiben diese Erfolge auf die Gruppe der Zestoden beschränkt. Die Vakzine To45W gegen *Taenia ovis* (Johnson *et al.*, 1989) bildete die Basis für nachfolgende Impfstoffe. Homologe zu den Antigenen To45W, wie auch To18 (Harrison *et al.*, 1996) wurden in den Genomen der Arten *Taenia saginata* (Lightowlers *et al.*, 1996b) und *T. solium* (Gauci *et al.*, 1998) identifiziert, welche zu einer Entwicklung rekombinanter Antigene gegen diese Spezies führte. Die schon frühe Entdeckung, dass eine Kreuz-Immunität zwischen *Taenia*-Spezies und *Echinococcus granulosus* besteht (Gemmell, 1966), ließ vergleichbare Ansätze zur erfolgreichen Identifikation von schutzgebenden Onkosphären-Proteinen gegen die Larvalstadien von *Echinococcus granulosus* führen (Lightowlers *et al.*, 1996a). Der experimentelle Einsatz der rekombinanten Vakzine EG95 erzielte in mehreren Studien einen Schutz bei Schafen von mehr als 97 % (Lightowlers *et al.*, 1999; Lightowlers *et al.*, 1996a).

Experimente, in denen mittels passiven Transfers Serum oder Kolostrum von infizierten Tieren auf naive Tiere übertragen wurden, ergaben ebenfalls hohe Schutzraten (Dempster *et al.*, 1991; Dempster & Harrison, 1995; Gemmell *et al.*, 1990). Die hierbei erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine unbestreitbare Rolle der komplementbindenden Antikörper in den schützenden Mechanismen der rekombinanten Antigene hin. Obwohl andere Immun-Effektor-Mechanismen nicht ausgeschlossen werden können, genügen die durch rekombinante Antigene erzeugten Serum-Antikörper aus, um einen hohen Grad an Immunität zu erzeugen (Lightowlers, 2006).

#### 1.3.1 Immunisierungstudien gegen *Echinococcus multilocularis*

Die Immunisierung von Mäusen mit in *Escherichia coli* synthetisierten Antigenen von *Echinococcus multilocularis* führte in verschiedenen Versuchen zur protektiven Immunität gegen eine Alveoläre Echinokokkose.

Erstmals gelang es mittels eines rekombinanten *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Typhimurium (im weiteren Text wird die Schreibweise *Salmonella typhimurium* verwendet) Impfstamms (Zoosaloral H®), der konstitutiv das *Echinococcus*-Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EMGAPDH) exprimierte, schützende Immunantworten gegen *E. multilocularis*-Infektionen zu induzieren (Müller-Schollenberger, 1995; Müller-Schollenberger et al., 2001). Eine zuvor durchgeführte subkutane Immunisierung mit rekombinatem EMGAPDH in Kombination mit dem Adjuvans STP konnte zwar humorale Antworten auslösen (Bildung spezifischer Antikörper), jedoch kein Schutz gegen eine orale Belastungsinfektionen vermitteln. Erst nachdem EMGAPDH in den attenuierten *Salmonella typhimurium* Stamm kloniert und dieser Stamm zur oralen und intraperitonealen Immunisierung eingesetzt wurde, konnte in einem Versuch eine signifikante Verringerung der Zystenbildung in der Leber erzielt werden. Allerdings wurden keine EMGAPDH-spezifischen Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen daher in Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit anderen Taenien erzielt wurden, bei denen antikörpervermittelte Immunantworten im Vordergrund standen.

In einem weiteren Versuch gelang es, mit dem rekombinanten Antigen EM95 unter Einsatz konventioneller Strategien (subkutane Immunisierung, Adjuvans Saponin) bei Mäusen Schutz gegen orale *E. multilocularis*-Infektionen zu induzieren (Gauci et al., 2002; Merli, 2001). Neben der Homologie zu dem *E. granulosus*-Antigen EG95, besitzt EM95 einige weitere Eigenschaften, die auch andere protektive Antigene verschiedener Taenien innehaben (Lightowers et al., 2003). Die Struktur von EM95, abgeleitet von der Aminosäure-Sequenz, lässt auf ein sekretorisches Signal, eine FibronektinIII-Domäne, sowie eine Transmembran-Domäne schließen, welche vermuten lassen, dass dieses Protein extrazelluläre Eigenschaften aufweist und somit sekretiert werden muss. In dem erwähnten Experiment wurde EM95 als GST-Fusionsprotein – Glutathion-S-Transferase von *Schistosoma japonicum* (SjGST) – exprimiert und subkutan mit dem Adjuvans Saponin appliziert. Mäuse, welche diese Vakzinierung erhielten entwickelten bis 97,6 % weniger *E. multilocularis* – Zysten als die entsprechende Kontrollgruppe. Obwohl die ebenfalls ausgeführte Kontrollimmunisierungen, die nur mit SjGST (und Saponin) durchgeführt wurden, nur zu einer geringeren Reduktion der Metazestodenlast (21 % bzw. 56 %) führten (Merli, 2001), besteht über den Beitrag von SjGST zu den schützenden Mechanismen gegen *E. multilocularis* Klärungsbedarf. Zudem wurde an anderer Stelle gezeigt, dass eine Vakzinierung mit rekombinatem GST von Schistosomen (Sm28GST, Sh28GST) zu schützenden Immunreaktionen gegen diese Parasiten führte (Capron et al., 2001; Capron et al., 1992).

Ähnlich hohe Schutzraten (97%) nach parenteraler Immunisierung wurden mit dem rekombinanten Antigen EM14-3-3 erzielt (Siles-Lucas et al., 2003). Die vermehrte Expression des 14-3-3 Proteins bei *E. multilocularis*-Metazestoden gegenüber adulten *E. multilocularis*-

Würmern und *E. granulosus*-Metazestoden wird in einen engen Zusammenhang mit dem typischen proliferativen Wachstum von *E. multilocularis*-Metazestoden gebracht (Siles-Lucas *et al.*, 1998). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass 14-3-3 auch von Onkosphären exprimiert wird (Siles-Lucas *et al.*, 2008; Siles-Lucas *et al.*, 2003).

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, durch experimentelle Vakzinierung gegen *Echinococcus multilocularis* im Zwischenwirt zu dem Verständnis immunologischer Mechanismen einer Infektion und möglicher schützender Immunkomponenten beizutragen.

Der Grundgedanke der hier durchgeführten Versuche lag darin, die schützenden Eigenschaften der *E. multilocularis*-Antigene EM95 und EMGAPDH durch die Anwendung und die Gegenüberstellung unterschiedlicher Immunisierungsstrategien zu testen und zu vergleichen. Dazu wurden die Gene *em95* und *emGAPDH* zur Synthese der entsprechenden rekombinanten Antigene in neue Konstrukte kloniert, welche durch die Kombination mit einem 6HIS-Tag ohne größeren Fusionspartner exprimiert werden konnten. Das Antigen EM95 wurde durch das Entfernen der terminalen sekretorischen Einheit und der Transmembrandomaine modifiziert, um eine Beteiligung dieser Komponenten auf die schützenden Eigenschaften zu untersuchen. Ferner lag ein bedeutender Schwerpunkt dieser Arbeit in der Konstruktion eines Immunisierungssystems, in dem diese eukaryotischen Antigene erstmalig von Salmonellen, als Antigencarrier exprimiert und in den extrazellulären Raum exportiert werden. Immunisierungsversuche mit diesen neuen *Salmonella*-Vakzinen, sowie durch subkutane Applikation der modifizierten Antigene EM95 und EMGAPDH, unter Verwendung von Saponin als Adjuvans, können Aufschluss über die Immunantworten bzw. einer möglichen Immunsuppression geben. Zur Aufklärung beteiligter Immunmechanismen sollten v.a. die humoralen Aspekte näher betrachtet werden, sowie die Expression von ausgewählten Zytokinen, die erstmalig mittels quantitativer Analyse der mRNA-Expression, untersucht werden.

Zusätzlich sollte bei erfolgreicher *prae-infectionem* Immunisierung mit EM95 geklärt werden, inwieweit dieses Antigen durch eine Vakzinierung *post-infectionem* in der Lage ist, die Entwicklung des sich etablierenden Metazestoden zu beeinflussen bzw. zu verhindern.



### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere, Parasitenmaterial und Infektionsmodus

##### 3.1.1 *Mus musculus* (BALB/c)

Für die Immunisierungs-Studien wurden weibliche, 6 – 9 Wochen alte Inzucht-Mäuse des Stammes BALB/c (Harlan Winkelmann) verwendet. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen auf Streu unter Standardbedingungen bei 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Der Zugang zu Wasser und Futter erfolgte ad libidum.

##### 3.1.2 *Microtus arvalis* (Feldmaus)

Vorversuche zur Infektiosität der gewonnenen *E. multilocularis*-Eier erfolgten an Feldmäusen (*Microtus arvalis*) aus institutseigener Zucht. Die Tiere wurden, nach Geschlecht getrennt, in Plastikkäfigen auf Streu unter Standardbedingungen gehalten. Der Zugang zu Wasser und Futter erfolgte ad libidum.

##### 3.1.3 Herkunft des Parasitenmaterials

Die infektiösen *E. multilocularis*-Eier stammten von natürlich infizierten Füchsen. Diese wurden von Jägern erlegt und im Rahmen von Studien zur *Echinococcus multilocularis* – Prävalenz auf der zentralen Schwäbischen Alb in Hohenheim untersucht. Zusätzlich wurden Eier von Fuchsdärmen isoliert, welche von Staatlichen Veterinärmedizinischen Untersuchungsämtern (Aulendorf, Fellbach, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden.

##### 3.1.4 Isolation von *E. multilocularis*-Eiern

Aufgrund der Tatsache, dass die in dieser Arbeit verwendeten *E. multilocularis*-Eier humanpathogen sind, wurden alle Arbeiten unter adäquaten Sicherheitsbedingungen durchgeführt. Die Benutzung eines Hochsicherheitslabors (L3), sowie der Gebrauch von Einmal-OP-Kitteln, Handschuhen und Mundschutz waren somit obligat.

Die vorbereiteten Fuchsdärme wurden mit einer Darmschere eröffnet und mit Objektträgern Proben von der Mukosa in Abständen von ca. 10 cm abgeschabt. Diese wurden auf quadratischen Petrischalen gequetscht und unter einem Stereomikroskop auf *Echinococcus*-Befall untersucht. Stark befallene Darmabschnitte wurden in PBS überführt. Später erfolgte das sorgfältige Abschaben der Darmmukosa mit anschließender Überführung der entstandenen Suspension in einen Standzylinder (500 – 1000 ml). Dieser wurde mit einer 4%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgefüllt. Nach wenigstens 30-minütiger Inkubationszeit konnte ein Großteil des Mukus gelöst und durch Dekantieren entfernt werden. Nach mehrtägigem Sedimentieren in

PBS wurde der erhaltene Bodensatz über ein 20%iges Percoll<sup>®</sup>-Kissen geschichtet und 5 Minuten bei 2500xg abzentrifugiert. Dabei wandern reife Proglottiden und Eier durch das Percollkissen, Darmzotten und unreifes Material verblieben im Überstand und wurden verworfen. Die mit Proglottiden angereicherte Suspension wurde mit Kollagenase B (75 mU/ml) und Proteinase K (5 mg/ml) für 30 – 60 Minuten im Wasserbad bei 37°C verdaut. Die Trennung der freigesetzten Eier von den unverdauten Proglottiden erfolgte mittels Zentrifugation durch ein 60%iges Percollkissen. Nach wiederholtem Waschen wurden die erhaltenen *Echinococcus*-Eier in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Die Infektiosität wurde durch die orale Infektion von Feldmäusen (*Microtus arvalis*) überprüft.

### 3.1.5 Bestimmung der Infektiosität

In Vorversuchen wurde die Infektiosität für jede Eicharge getrennt ermittelt. Zur Ermittlung der Infektionsdosis und Infektiosität der erhaltenen *E. multilocularis*-Eiern wurden Feldmäuse (*Microtus arvalis*) mit verschiedenen Eidosen (1000 – 3000 Eier/Tier) oral mittels Knopfkanüle infiziert. Da die Entwicklung des Parasiten in Feldmäusen wesentlich schneller verläuft als in *Mus*-Arten, konnte bereits nach 7 Tagen die Sektion und die Auszählung der Metazestoden in der Leber erfolgen.

### 3.1.6 Infektion von BALB/c-Mäusen

Die Infektion erfolgte abhängig von der Infektiosität der aufgereinigten Isolate mit 3000 – 4000 Eiern. Für Immunisierungsstudien wurden ausschließlich Ei-Chargen eingesetzt, welche eine sehr hohe Infektiosität (> 50 Zysten/1000Eier) im natürlichen Zwischenwirt *Microtus arvalis* zeigten. Die zu erwartende Anzahl sich entwickelnder Metazestoden ist bei gleicher Infektionsdosis bei BALB/c-Mäusen im Vergleich zu Feldmäusen normalerweise um ca. 2/3 reduziert (ermittelte Erfahrungswerte).

Zur oralen Infektion wurde die zu verwendende Anzahl von *E. multilocularis*-Eiern pro Tier auf ein zweckmäßiges Volumen verdünnt (100 – 200 µl PBS), aufgenommen und mittels einer gebogenen Knopfkanüle verabreicht. Die Tiere wurden zunächst für 3 - 6 Tage im L3-Labor gehalten und dann unter Wechsel des Käfigs in die normale Tierversuchshaltung eingebracht. Käfige und Einstreu wurden nach dem Umsetzen der Tiere dekontaminiert.

### 3.1.7 Bestimmung und Auswertung der Metazestodenzahl

Zur Quantifizierung der Metazestoden wurde die Leber des jeweiligen Versuchstieres in mehrere Stücke geschnitten und in einem Trichinellen-Kompressorium gequetscht. Die Auszählung der Metazestoden wurde bei 8 - 12facher Vergrößerung von mindestens zwei

Personen unabhängig voneinander durchgeführt. Mit zunehmender Infektionsdauer (> 6 wpi) wird diese Methode jedoch unzuverlässig, da einzelne Metazestodenherde nicht mehr klar abzugrenzen sind. Die Infektionsdosis wurde nach Vorversuchen (vgl. 3.1.5) so eingestellt, dass nach oraler Applikation der Eier bei naiven BALB/c-Mäusen im Mittel zwischen 25 und 50 Metazestoden resultierten. Bei einer Gabe von 3000 – 5000 infektiösen Eiern entsprach dies einer Ansiedlungsrate der Metazestoden von ca. 1 %. Der optimale Sektionszeitpunkt ergab sich aus empirischen Werten vorangegangener Experimente (Bilger, 1999; Merli, 2001), wobei die Metazestoden gut erkennbar (zählbar) sein mussten und sich noch keine Konglomerate gebildet haben durften. Die Metazestoden wurden nach Quetschung der Leber in Trichinellen-Kompressorien unter dem Binokular ausgezählt (Abb. 3.1.6a und 3.1.6b).

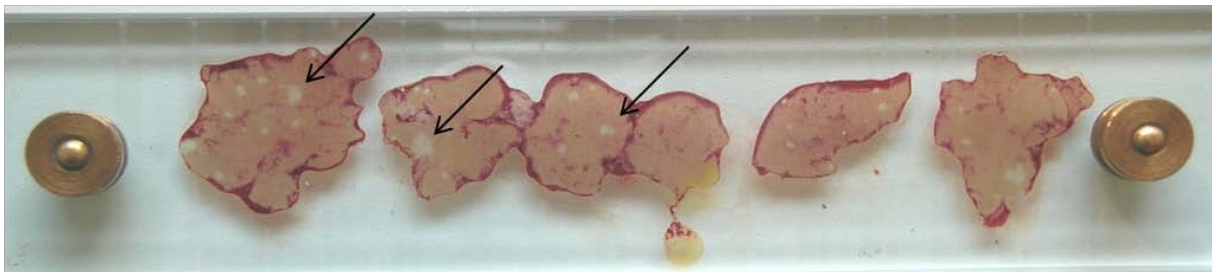


Abb. 3.1.6a Metazestoden im Quetschpräparat einer Leber 7wpi. (Pfeile deuten auf sichtbare Läsionen)

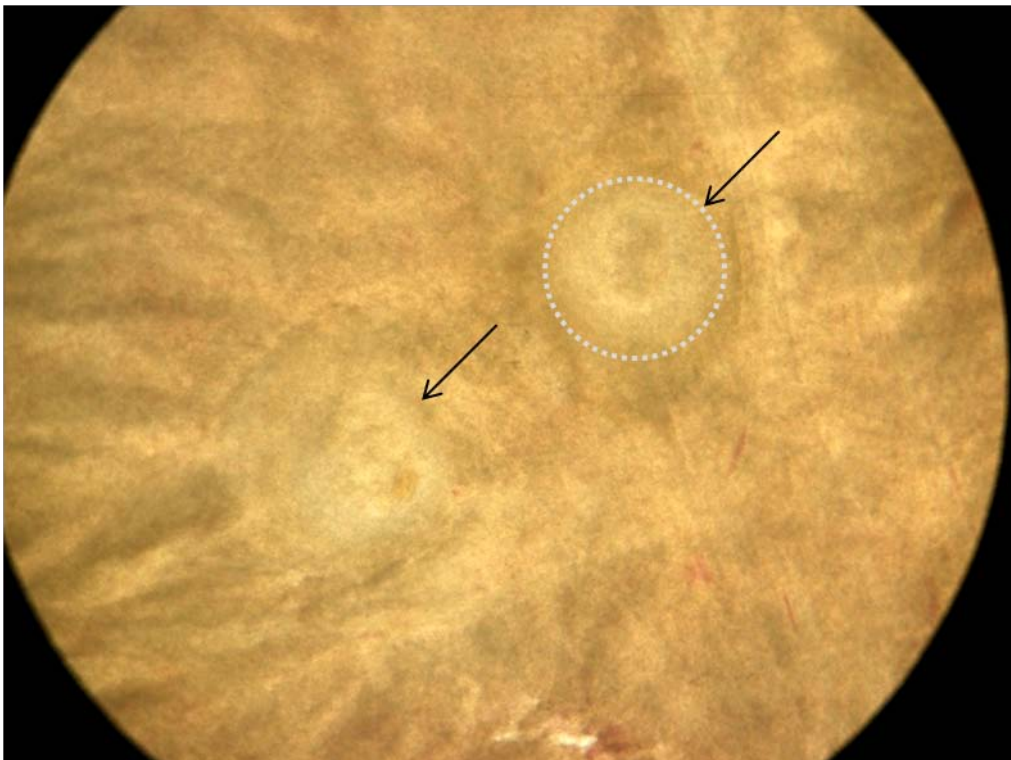


Abb. 3.1.6b Metazestoden im Lebergewebe (Pfeile).

### 3.1.8 Immunisierung mit rekombinanten Antigenen

Für die Immunisierungsversuche wurden weibliche BALB/c-Mäuse verwendet, da bei diesen die Auswertung immunologischer Daten im Vergleich zu den genetisch heterogenen Feldmäusen eindeutigere Ergebnisse erwarten ließ. Die Tiere wurden je dreimal im Abstand von 14 Tagen subkutan an zwei Stellen im hinteren Rückenbereich mit insgesamt 20 µg (2 x 10 µg) Antigen in 200 µl PBS immunisiert. Zur Förderung der Immunreaktion wurde das Adjuvans Saponin (je 50 µg) zugegeben. Die orale Belastungsinfektion mit *E. multilocularis*-Eiern erfolgte zwei Wochen nach der letzten Immunisierung. Eine Blutentnahme erfolgte vor der ersten Immunisierung (Präimmunserum), vor der Belastungsinfektion (1. Immunserum) und zum Sektionszeitpunkt (2. Immunserum). Die Sektion der Versuchstiere erfolgte 4 – 6 Wochen nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt waren die sich entwickelnden Metazestoden makroskopisch gut auszählen.

### 3.1.9 Immunisierung mit Salmonellen als Carrier

Da der hier verwendete *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. *Typhimurium* – Stamm Zoosaloral H® in dieser veränderten Form bisher nicht für Immunisierung von BALB/c-Mäusen eingesetzt wurden, musste zunächst eine geeignete Impfdosis ermittelt werden. Richtwerte dazu gaben die Arbeiten von Müller-Schollenberger (Promotion 1995). Die Salmonellen sollten einerseits starke immunologische Reaktionen hervorrufen, jedoch nicht zum Tod der Versuchstiere führen. Es musste weiterhin getestet werden, ob die Bakterien trotz ihrer Attenuierung und des zusätzlichen Plasmides in der Lage waren, in innere Organe vorzudringen und dort zu persistieren.

Die in Vorversuchen ermittelten Korrelationen der optischen Dichte der Bakterienkultur mit der Anzahl der zu erwartenden Kolonien ergeben folgendes Protokoll: Die Salmonellen (getestete Reisolat) wurden ÜN in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 120 rpm, 37°C geschüttelt und davon 500 µl Kultur in 50 ml vorgewärmten Medium bis zur einer  $OD_{600} = 1$  angezogen. Davon wurden im Anschluss 25 ml abzentrifugiert (3500xg, 12 min bei RT) und das erhaltene Pellet in 10 ml PBS mit 0,02 % Gelatine resuspendiert. Diese Suspension wurde erneut zu vorher genannten Bedingungen zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 200 µl PBS mit 0,2 % Gelatine, sowie 10 % Natriumhydrogencarbonat („Bicarbonat“) zur Neutralisierung der Magensäure aufgenommen. Pro Maus wurden 2 x 25 µl (entspricht ca.  $10^8$  -  $10^9$  KbE) dieser Suspension oral verabreicht. Vor der Immunisierung wurden den Mäusen für 4 Stunden Nahrung und Wasser entzogen.

### Gewinnung von Reisolaten

Zur Sicherstellung einer ausreichenden Invasivität sowie zur Überprüfung der *in vivo*-Stabilität der verwendeten Salmonellenstämme wurden Mäuse mit den Vakzinierungsstämmen ZpVDL9.3EM95 und ZpVDL9.3EMGAPDH testweise infiziert. Drei bis vierzehn Tage nach oraler Salmonellen-Infektion wurden die Mäuse getötet. Die Leber und Milz wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und in einem Mörser mit Quarzsand bei gleichzeitigem Spülen mit PBS (10 ml) homogenisiert. 1ml dieser Suspension wurde in 10 ml LB-Medium mit Antibiotika überführt, sowie 100 µl der Suspension direkt auf Agar ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Anzahl der KbE gezählt, sowie Einzelkolonien zur weiteren Überprüfung (nochmaliger Test auf Expression und Export der gewünschten Proteine) gepickt.

#### 3.1.10 Blutentnahme, Gewinnung und Lagerung von Seren

Verschiedene Methoden der Blutentnahme kamen je nach Untersuchungsziel und Versuchszeitpunkt zur Anwendung:

a) Blutentnahme am getöteten Tier durch Herzpunktion (> 500 µl):

Sofort nach der Tötung der Tiere wurde mit einer Kanüle (0,6 x 25 mm) das Herz punktiert und das Blut mittels einer 1 ml-Spritze entnommen.

b) Anritzen der Schwanzvene (100 – 200 µl):

Um Aufschluss über Antikörper-Produktion etc. während des Versuches zu erhalten, genügte es, den Tieren mit einer Skalpellklinge eine Schwanzvene vorsichtig anzuritzen und das austretende Blut mit einem Hämatokrit-Röhrchen (Kapillareffekt) abzusaugen und in einem Reaktionsgefäß aufzufangen. Um die Durchblutung zu fördern, wurden die Tiere zuvor für wenige Minuten mit einer handelsüblichen Rotlichtlampe bestrahlt.

Das gewonnene Blut wurde zur Agglutination der Blutzellen zuerst bei Raumtemperatur für 30 bis 60 min belassen. Nach einer einstündigen Lagerung bei 4°C wurde das Blut bei 15000xg für 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Seren (Überstand) wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.2 Bakterien, Plasmide, Klonierung

#### 3.2.1 Verwendete Bakterienstämme

##### Escherichia coli

|            |   |
|------------|---|
| Top10F'    | F' {lacIq Tn10 (TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG (Invitrogen®)  |
| DH5α       | F-(f80d lacZDM15)D(lacZYA argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK,mK+), supE44, l-thi-1, gyrA96, relA1 (GIBCO BRL)   |
| M15[pREP4] | NaI <sup>S</sup> , Str <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Thi <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>+</sup> , Gal <sup>+</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup> .<br>(Quiagen) |
| JM 101     | supE thi D(lac-proAB) F'(traD36 proAB+ lacIq lacZDM15)<br>(Yanisch-Perron; Viera; Messing (1985))   |

##### Salmonella enterica ssp. enterica ser. Typhimurium

|               |  |
|---------------|--|
| χ3730         | Streptomycin-resistenter, Restriktionsendonukleasen-defizienter, Methylase-positiver Salmonellenstamm zur Zwischenklonierung, der zusätzlich DL-αε-Diaminopimelinsäure (DAP) benötigt. Curtiss-System, <i>S. typhimurium</i> , asd <sup>-</sup> , m <sup>+</sup> , r <sup>-</sup> ; (R. Curtiss, Universität Washington) |
| Zoosaloral H® | Doppelmutante von <i>Salmonella enterica ssp. enterica ser. Typhimurium</i> Wildstamm M415, die auxotroph für Histidin und Adenin ist. (Salmonellen-Impfstamm Dessau)  |

#### 3.2.2 Kultivierung von Bakterien

##### Verwendete Medien

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| LB-Medium                       | 1 % (w/v) Trypton (Difco); 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Difco)<br>1 % (w/v) NaCl, ad H <sub>2</sub> O bid. (Millipore)   |
| Agar-Platten                    | LB-Medium + 1,5 % (w/v) Bacto-Agar (Difco)   |
| SOB-Medium                      | Hefeextrakt 0,5 % (w/v); Trypton 2 % (w/v); NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; Mg <sup>2+</sup> -Lösung (1M MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O; 1M MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O, pH 7 - Zugabe kurz vor Gebrauch) |
| SOC-Medium                      | SOB-Medium plus 20 mM Glucose  |
| DL-αε-Diaminopimelinsäure (DAP) | SL: 50 mg/ml in HCl (1M)      GL: 50 µg/ml   |

Alle Medien wurden autoklaviert, Agar-Platten unter sterilen Bedingungen gegossen. Antibiotika wurden nach Bedarf 1 – 2 Stunden vor Aussaat der Bakterien den Agar-Platten zugefügt.

#### Antibiotika

|                              |                                   |               |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| Ampicillin (Sigma)           | SL: 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O  | GL: 50 µg/ml  |
| Chloramphenicol (Boehringer) | SL: 34 mg/ml in Ethanol           | GL: 170 µg/ml |
| Kanamycin (Boehringer)       | SL: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O  | GL: 50 µg/ml  |
| Streptomycin (Boehringer)    | SL: 200 mg/ml in H <sub>2</sub> O | GL: 400 µg/ml |
| Tetracyclin (Boehringer)     | SL: 5 mg/ml in Ethanol            | GL: 50 µg/ml  |

Die Kultivierung aller Bakterien erfolgte in Nährmedien bzw. -böden, welche mit der Resistenz der jeweiligen Bakterienstämme entsprechenden Antibiotika versetzt wurden. Auf Agarplatten wurden Bakterien mit dem Trigalsky-Spatel ausplattiert und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Flüssigkulturen wurden mit auf Nährböden kultivierten Einzelkolonien bzw. mit Bakterien aus „Stocks“ (eingefrorene Dauerbestände) beimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C (120 – 200 rpm) inkubiert. Bei Kultivierung des *Salmonella typhimurium* – Stammes  $\chi$ 3730 wurde dem Medium DL- $\alpha$ -Diaminopimelinsäure (DAP, 50 µg/ml) zugegeben. DAP ist eine essentielle Komponente der Zellwand von Gram-negativen Bakterien, an dessen Synthese das Enzym Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd-Dehydrogenase beteiligt ist, welches durch das ASD-Gen kodiert wird. ASD-Mutanten, wie der verwendete Salmonella-Stamm  $\chi$ 3730, lysieren daher in Abwesenheit von DAP.

#### 3.2.3 Lagerung von Bakterien

##### Glycerinkulturen

Glycerinlösung: 65 % Glycerol (v/v); 0,1 M MgSO<sub>4</sub>; 0,025 M Tris pH 8.0;  
ad H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (autoklavieren)

Zu 1 ml gesättigter Bakterienkultur (ÜN) wurden 1 ml (gleiches Volumen) der Glycerollösung gegeben, vermischt und zügig mittels Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei –20 °C bzw. –80°C.

DMSO-Kulturen

Die pelletierten Zellen einer 10 ml ÜN-Bakterienkultur wurden in 2,4 ml frischem LB-Medium suspendiert und nach Zugabe von 0,6 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert.

## 3.2.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Kurzzeitige Kompetenz

Lösungen: für *E. coli*:  $\text{CaCl}_2$ -Lösung ( $\text{CaCl}_2$  50 mM, Tris 10 mM)

für *S. typhimurium*:  $\text{MgCl}_2$ -Lösung (100 mM);  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (100 mM)

1 ml einer Übernachtskultur wurde in 50 ml Standard-Medium überimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt, bis die  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 erreicht wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min,  $250\times g$ ) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 50 ml eiskalter  $\text{CaCl}_2$ - bzw.  $\text{MgCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Bakterien erneut zu den oben beschriebenen Bedingungen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 25 ml eiskalter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation (10 min), wurde das erhaltene Pellet in 200  $\mu\text{l}$  eiskalter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Die Bakterien wurden bis zur Transformation auf Eis gelagert und waren unter diesen Bedingungen für mehrere Stunden kompetent.

Längerfristige Kompetenz

Lösungen: TFB1 Puffer:  $\text{RbCl}$  100 mM,  $\text{MnCl}_2$  50 mM, K-Acetat 30 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Glycerin 15 %, pH 5,8 (mit Essigsäure einstellen, Puffer sterilfiltrieren, in autoklavierte Flasche abfüllen)

TFB2 Puffer: MOPS 10 mM,  $\text{RbCl}$  10 mM,  $\text{CaCl}_2$  75 mM, Glycerin 15 %, pH 8 (mit Natronlauge einstellen, Puffer autoklavieren)

1 ml einer Übernachtskultur wurde in 50 ml Standard-Medium überimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterien 10 min abzentrifugiert ( $2000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ), der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wurden die Bakterien erneut zu den oben beschriebenen Bedingungen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde bei stetiger Kühlung in 100  $\mu\text{l}$  Portionen aliquotiert, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Bakterien waren damit für einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten kompetent.



### 3.2.5 Verwendete Plasmid-Vektoren

|           |  |
|-----------|--|
| pGEX-2TEX | modifiziertes Plasmid der pGEX-Serie (Pharmacia©)                  |
| pQE30     | Quiagen: The QIAexpressionist™, fifth edition 2003                 |
| pLG612-1B | Tzschaschel <i>et al.</i> , 1996 (W. Beyer, Universität Hohenheim) |
| pVDL9.3   | Tzschaschel <i>et al.</i> , 1996 (W. Beyer, Universität Hohenheim) |
| pDrive    | Quiagen: PCR cloning Kit (2001)                                    |

### 3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion - PCR

|              |                                       |
|--------------|---------------------------------------|
| Materialien: | Taq DNA Polymerase (Fermentas, Roche) |
|              | Sawady PWO-DNA-Polymerase (Peqlab)    |
|              | dNTP-Mix (Fermentas, Roche)           |

Bei der von Kary Banks Mullis 1983 entwickelten Polymerasekettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) werden gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden, zyklisch amplifiziert. Dabei werden durch Hitzedenaturierung ( $> 90^{\circ}\text{C}$ ) die DNA-Doppelstränge gelöst und die Primer (einsträngige synthetisch hergestellte Oligonukleotide) können sich an die komplementären Bereiche der DNA-Matrize binden (Annealing). Die Neusynthese des komplementären Stranges erfolgt unter Verlängerung der Primer durch den Einbau von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP's) und wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert (Elongation). Durch 20- bis 40-fache Wiederholung dieses Vorgangs, kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Stückes. Die konstruierten Primer wurden von der Fa. Biomers hergestellt und nach Lieferung auf eine Konzentration von 100pmol/ $\mu\text{l}$  mit Reinstwasser verdünnt. Diese Lösung wurde weiter 1 : 5 mit Reinstwasser verdünnt und daraus je 50  $\mu\text{l}$  für den Primermix (forward und reverse) entnommen. Die dNTP's wurden auf eine Konzentration von 5 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP je 1,25 mM) mit Aqua bidest verdünnt.

Ein 100  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz mit dem entsprechenden Primerpaar beinhaltet folgendes Reaktionsgemisch:

|                       |  |
|-----------------------|--|
| DNA                   | variabel (50 – 500 ng)                   |
| Primermix             | 10 $\mu\text{l}$ (je 20 pmol)            |
| MgCl <sub>2</sub>     | variabel (je nach Primer-Paar)           |
| dNTP-Mix              | 16 $\mu\text{l}$ (je 200 $\mu\text{M}$ ) |
| Taq-Puffer (10x)      | 10 $\mu\text{l}$                         |
| Polymerase            | 0,5 $\mu\text{l}$ (2,5 U)                |
| H <sub>2</sub> O bid. | ad 100 $\mu\text{l}$                     |

Amplifikationsbedingungen :

|               |       |   |
|---------------|-------|---|
| Denaturierung | 95°C  | 4 min (Fast-Start-Taq), 10min (Hot-Start-Taq) |
| Denaturierung | 95°C  | 30 sec  |
| Annealing     | 55°C* | 30 sec (*Temperatur primerabhängig)           |
| Elongation    | 72°C  | 60 sec  |
| Endsynthese   | 72°C  | 4 min   |

### 3.2.7 Primer

Die Konstruktion der verwendeten Primer richtete sich nach den vorhandenen DNA-Sequenzen, wobei auf einem ausgewogenen GC-Gehalt und eine angegliche Annealing-Temperatur besonderes Augenmerk gelegt wurde. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers hergestellt.

#### Verwendete Primer:

Die angefügten Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

| Primer     | Sequenz  |
|------------|--|
| EmGAPDHfor | 5' – ACA <u>TGC ATG CAA</u> GCC CCA GGT TGG TAT CAA CGG – 3'   |
| EmGAPDHrev | 5' – TCC <u>CCC GGG</u> ATG ATC CCT CTT GAA CAT GTA GCT G – 3' |
| Em95for    | 5' – CGA <u>GCA TGC</u> GAG ATT TTG TTT GCG ACT TC – 3'        |
| Em95rev    | 5' – TCC <u>CCC GGG</u> TCA AGT AAG GAC AAT TAC TAT GCA GC -3' |
| Em95GWfor  | 5' – CGA <u>GCA TGC</u> CAG GAA TAC AGA GGA AGG G – 3'         |
| Em95Grev   | 5' – CCT <u>CCC GGG</u> GGC GGA TCC ACT AGT CAT TAC – 3'       |
| Em95Wrev   | 5' – CCT <u>CCC GGG</u> GGT GCT TTC TTT CTC GCC AAT G – 3'     |

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| IL-10 for* | 5' – GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA – 3' |
| IL-10 rev* | 5' – ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT – 3' |

|                     |   |
|---------------------|---|
| IFN- $\gamma$ for*  | 5' – TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA – 3' |
| IFN- $\gamma$ rev*  | 5' – TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG – 3'     |
| TGF- $\beta$ for*   | 5' – TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G – 3'   |
| TGF- $\beta$ rev*   | 5' – GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC – 3'     |
| $\beta$ -actin for* | 5' – AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC – 3'      |
| $\beta$ -actin rev* | 5' – CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT – 3'     |

\* modifiziert nach Overbergh *et al.* (1999)

### 3.2.8 Präparation von Plasmid-DNA

#### Lösungen, Chemikalien:

Alkal-Lyse-Lösung 1 (GET): 50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Alkal-Lyse-Lösung 2: 0,2 M NaOH; 1% SDS (w/v)

Alkal-Lyse-Lösung 3: 3 M K-Acetat (pH4,8); 11,5% (v/v) Eisessig

TE - Puffer 10 mM Tris-HCl (pH7,6); 1 mM EDTA

Phenol-Chloroform, Isopropanol, TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA)

#### Kits:

High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)

Perfectprep Plasmid Isolation Kit (Eppendorf)

Die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini) erfolgte entweder mittels eines Präparationskits der Firmen Roche bzw. Eppendorf oder gemäß dem nachfolgend beschriebenen Prinzip der alkalischen Hydrolyse mit dementsprechend geringerem Einsatz von Mengen an Alkal-Lyse-Lösungen.

Größere Mengen Plasmid-DNA (Midi) wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (verändert nach Sambrook *et al.*, 1989) isoliert. Dazu wurden die Bakterien einer 25 ml ÜN-Kultur abzentrifugiert (6000xg, 4°C, 15 min). Das erhaltene Pellet wurde in 500  $\mu$ l eiskalter Alkal-Lyse-Lösung 1 resuspendiert und weiter mit 800  $\mu$ l Alkal-Lyse-Lösung 2 (frisch angesetzt) gemischt (nicht gevortext) und 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 600  $\mu$ l Alkal-Lyse-Lösung 3. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min auf Eis wurde erneut abzentrifugiert (10000xg, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert (10000xg, 4°C,

15 min). Die entstandene obere Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol die darin enthaltene DNA gefällt. Diese wurde abzentrifugiert (10000xg, RT, 5 min), und nachdem der Überstand entfernt worden war, für einige Minuten angetrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet einmal mit 1 ml 70%igem, unvergälltem Ethanol gewaschen (resuspendiert und folgend 3 min abzentrifugiert), und danach in 100 µl TE (pH 8,0 mit 20 µg/ml RNase) aufgenommen. Die DNA wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösungen erfolgte photometrisch in Quarzküvetten bei 260 nm (Verdünnung 1 : 100 bzw. 1 : 20). Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA (RNA, einzelsträngige DNA) einer Konzentration von 50 (40, 33) µg/ml. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (welches das Absorptionsmaximum von Proteinen darstellt) wird zur Bemessung der Reinheit von Nukleinsäuren verwendet. Der Quotient dieser beiden Spektren liegt bei reinen Lösungen zwischen 1,8 und 2,0.

### 3.2.10 Agarosegelelektrophorese von DNA

#### Lösungen:

Agarose NEE0 (Roth); Ethidiumbromid (Roth); DNA-Molekulargewichtsmarker (O'RangeRuler™ and O'GeneRuler™; Fermentas); 6X Loading Dye Solution (Fermentas)

TBE-Puffer: 90 mM Tris; 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; 2,5 mM EDTA

Die Auftrennung von Nukleinsäuren zur Identifikation, Größenbestimmung und Isolation erfolgte mittels der Agarosegelelektrophorese. Durch die Wahl verschiedener Agarosekonzentrationen wird die Auftrennung in einem bestimmten Molekulargewichtsbereich optimiert. Die hier bevorzugte Konzentration von 1 % ist für DNA-Fragmente von 250 bp bis 12 kb zweckmäßig. In einem Erlenmeyer-Kolben wurde dazu TBE-Puffer mit der entsprechenden Agarose-Menge vermischt und im Mikrowellenherd bis zur vollständigen Auflösung gekocht. Danach wurde der Kolben unter Wasser abgekühlt und zur Visualisierung der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid (0,02 µl/ml) versetzt. Dieser Farbstoff lagert sich unspezifisch zwischen einzelne Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls an und fluoresziert rot-orangefarbig bei UV-Licht-Bestrahlung (560 nm).

Die Auspolymerisierung des Gels erfolgte in einer Kammer, welche mit einem, dem aufzutragendem Volumen entsprechenden, taschenbildenden Kamm versehen wurde. Das ausgehärtete Gel wurde mit TBE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden vor dem Einbringen in die Gel-Taschen mit Ladepuffer vermischt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 30 – 100 V (3 – 5 V/cm Gellänge). Nach

Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit einem Dokumentationssystem (Bio-Profil®) ausgewertet.

### 3.2.11 DNA-Elution aus Agarosegelen

Kits:

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science)

Perfectprep Gel Cleanup – Kit von Eppendorf

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Nutzung der oben erwähnten Kits nach Anleitung des Herstellers. Dabei wird die entsprechende Bande unter UV-Licht ausgeschnitten, in einem bindenden Puffer erwärmt und die DNA mittels einer Spin-Säule extrahiert.

### 3.2.12 Restriktionsverdau von DNA

Die Reaktionsbedingungen für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurden gemäß den Angaben des Enzymherstellers (Fermentas) gewählt. Gemäß der eingesetzten DNA-Menge erfolgte die Restriktion bei den für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen. Bestand die Notwendigkeit zur Dephosphorylierung (um eine Selbstligation des Plasmids zu verhindern) wurde Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) in der vom Hersteller angegebenen Konzentration 30 min vor Beendigung des Restriktionsverdaus dem Mix hinzu gegeben.

### 3.2.13 DNA-Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte durch das Enzym T4-Ligase. Die T4-Ligase katalysiert die kovalente Bindung von passenden DNA-Abschnitten durch Ausbildung von Phosphodiester-Verbindungen zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden der DNA. Der Reaktionsansatz enthielt je 1 µl T4-Ligase und 10x Puffer, sowie 4 – 8 µl der zu ligierenden DNA-Fragmente. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 12°C. Erfolgte eine Ligation von geraden Enden (blunt-ends) wurde dem Reaktionsgemisch 5 % PEG (Polyethylene glycol) zugefügt. PEG erhöht die Ligationseffizienz, indem es das sogenannte „macromolecular crowding“ verstärkt und somit die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens der DNA-Enden erhöht.

### 3.2.14 Transformation

Die Transformation erfolgte bei allen Bakterienstämmen unter folgenden Bedingungen: 40 µl der kompetenten Bakterien wurden mit 2 – 3 µl DNA aus einer Ligation oder 0,5 µl aus einer

Plasmidpräparation gemischt und für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss dessen wurde dieser Transformationsansatz einem Hitzeschock ausgesetzt (40 sec, 42°C), für mehrere Minuten auf Eis gekühlt und mit 160 µl vorgewärmtem (37°C) Medium versetzt. Die Kultur wurde bei 37°C für 1 Stunde geschüttelt und danach in unterschiedlichen Verdünnungen auf Agarplatten mit einem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

### 3.2.15 Bestimmung der Plasmidstabilität in Salmonellen

Um eine effiziente Antigenpräsentation durch die rekombinante Lebendvakzine zu gewährleisten, ist eine hohe Stabilität des Expressionsplasmids ohne Selektion durch Antibiotika erforderlich. Die Stabilität der Plasmide (Salmonellenkonstrukte pVDL9.3Em95G und pVDL9.3EmGAPDH) *in vitro* wurde durch mehrmaliges Passagieren der Bakterien ohne Antibiotikaselektion untersucht. Dazu wurden 10 ml LB -Medium mit 100 µl einer stationären ÜN-Kultur inokuliert und bei 30°C schüttelnd inkubiert. Nach jeweils 12 h wurden Verdünnungsreihen der Kulturen auf selektivem (mit Antibiotikum) und nichtselektivem Agar-Platten ausplattiert sowie wiederum LB-Medium für weitere Passagen von 12 h inokuliert. Der Vergleich der Anzahl der koloniebildenden Einheiten ließ auf einen eventuellen Verlust des Plasmides schließen. Die Stabilität der Plasmide *in vivo* wurde nach der Reisolation der Salmonellen aus Milz und Leber von Versuchstieren 4 bzw. 7 Tage nach Testimmunisierung ermittelt. Auch dabei wurde die Anzahl entstehender KbEs auf selektiven (Chloramphenicol) und nicht selektiven Agar-Platten verglichen.

## 3.3 Proteinextraktion und Westernblot

### 3.3.1 Präparation von *E. multilocularis* – Gesamtantigen

Für die Herstellung von Metazestoden-Antigen wurde vitales Metazestodengewebe nach gründlicher Entfernung von angrenzendem Wirtsgewebe in kleine Stücke geschnitten und in eiskaltes PBS überführt. Die weitere Zerkleinerung erfolgte mittels Metallsieben (250 µm Maschenweite) und Ultraschall. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation pelletiert und der Überstand nach Bestimmung der Proteinkonzentration bei - 80°C aufbewahrt. Vor der Anwendung wurde das Gesamtantigen steril filtriert.

### 3.3.2 Proteinextraktion aus Bakterien (His-Tag-Protein-Aufreinigung mittels Ni-NTA)

#### Materialien:

|   |  |
|---|--|
| Isopropyl-b-D-thiogalaktosid (IPTG, für Expression in M15[pREP4]) | 1 mM f.C.  |
| Ni-NTA-Agarose (Quiagen)  |  |
| Lysozym (1 mg/ml)   |  |
| Lysis-Puffer:   | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol (pH 8,0)  |
| Wasch-Puffer  | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol (pH 8,0)  |
| Elutions-Puffer   | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol (pH 8,0) |

Um die gewünschten Proteine aufzureinigen, wurden diese während der Synthese in den Bakterien mit einem Hexapeptid der Aminosäure Histidin fusioniert. Dieser His-Tag bindet spezifisch an Agarose-Beads mit zweiwertigen Nickel-Ionen. Ni<sup>2+</sup> ist auf diesen Beads durch Nitritotriessigsäure (NTA)-Reste gebunden und kann mit den Histidin-Resten des Proteins im Austausch gegen Wasser interagieren. Dabei entsteht ein stabiler Chelat-Komplex. Diese Spezifität gewährleistet, dass nur das Fusionsprotein an das Säulenmaterial bindet. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt mit Imidazol, welches das Histidin des Proteins kompetitiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt.

10ml Medium (versetzt mit den entsprechenden Antibiotika) wurde mit den gewünschten Bakterien inokuliert und ÜN bei 37°C kultiviert. 5ml dieser Kultur wurden am folgenden Tag mit 100ml vorgewärmtem Medium versetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (f.C. 1mM) induziert und die Kultur für weitere 4 – 5 h unter den gleichen Bedingungen inkubiert und anschließend pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in Lysis-Puffer (1 ml pro g Pellet) resuspendiert und zur weiteren Lyse mit Lysozym 30 Minuten auf Eis inkubiert. Optional wurde diese Suspension mit Ultraschall (10x 10 sec, 200 – 300 Watt) behandelt. Im Anschluss daran wurde die Suspension für 20 – 30 Minuten zentrifugiert (10000xg, 4°C). Von dem erhaltenem Überstand wurden 50 µl als Kontrolle abgenommen (L1) und der Rest mit 50%iger Ni-NTA versetzt (1 ml Ni-NTA zu 4 ml Lysat). Dieser Mix wurde für 60 min bei 4°C geschüttelt und anschließend auf eine chromatographische Säule (10 ml) gegeben und der Durchfluss als Kontrolle (L 2) aufgehoben. Die abgesetzten Agarose-Baeds wurden nun zweimal mit Waschpuffer (4 ml) gewaschen und der von dem erhaltenen Durchfluss wiederum ein Teil als Kontrolle (L 3) aufgehoben. Diese Kontrollen sind notwendig, um bei möglichen Fehlern das Verbleiben des Proteins zurückverfolgen zu können. Danach erfolgt die Elution des Proteins mit Eluationspuffer, wobei dieser Schritt dreimal wiederholt wird (E 1, E 2, E 3). Nachdem alle Eluate erhalten wurden, erfolgt eine Kontrolle des Proteins mittels SDS-PAGE und eine Proteinbestimmung.

### 3.3.3 TCA-Fällung

#### Lösungen:

Präzipitationslösung: 20% (w/v) TCA in 50% (v/v) Aceton und 20 mM DTT

Waschlösung: 80% (v/v) Aceton

Zur Anreicherung und Nachweis von extrazellulären Proteinen aus dem Kulturmedium wurde die Trichloressigsäure (TCA) – Fällung angewendet. Dazu wurde eine 50 bzw. 200 ml Kultur 10 Minuten abzentrifugiert (6000xg, 4°C) und der Überstand mit gleichem Volumen TCA-Präzipitationslösung versetzt. Dieses Gemisch wurde intensiv gemischt (vortex) und für 2 – 3 Stunden auf Eis gelagert. Der Überstand wurde nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 16000xg, 4°C) verworfen und das Pellet in 1 – 2 ml 80%igem Aceton (Waschlösung) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation mit anschließendem Waschen wurde das nun TCA-freie Protein-Pellet für 5 Minuten getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen.

### 3.3.4 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

#### Materialien:

30% Acrylamid-/Bisacrylamid-Fertiglösung „Rotiphorese Gel 30“ (Roth)

Coomassie Brilliant Blau R250 oder G250 (Merk)

Ammoniumpersulfat (Fluka)

TEMED, Methanol (Roth)

Eisessig (Riedel-de-Haen)

Protease Inhibitor Cocktail (Calbiochem®)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Probenpuffer 2x: 0,09 M Tris-HCl, pH 6,8; 20% (v/v) Glycerol; 2% (w/v) SDS;  
0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 M DTT

Probenpuffer 5x: 0,225 M Tris-HCl, pH 6,8; 50% (v/v) Glycerol; 5% (w/v) SDS;  
0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 M DTT

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 200 mM Glycin, 0,05 % (w/v) SDS

Sammelgelpuffer: 120 mM Tris-HCl; pH 6,8

Trenngelpuffer: 375 mM Tris-HCl; pH 8,8

Coomassie-Färber: 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Eisessig, 0,1% (w/v) Coomassie

Entfärbe-Lösung: 10 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Eisessig

Gel drying film. 25,5 × 28 cm (Promega®Boehringer)



verwendete Gellösungen:

|                                | Sammelgel <sup>1</sup> | Trenngel <sup>1</sup> |          |
|--------------------------------|------------------------|-----------------------|----------|
|                                | 4%                     | 12,5%                 | 16%      |
| Acrylamid „Rotiphorese Gel 30“ | 0,675 ml               | 4,125 ml              | 5,325 ml |
| Ultrapure Wasser               | 3 ml                   | 3,125 ml              | 2 ml     |
| Trenngelpuffer (pH8,8)         | -                      | 2,5 ml                | 2,5 ml   |
| Sammelgelpuffer (pH 6,8)       | 1,25 ml                | -                     | -        |
| TEMED                          | 5 µl                   | 5 µl                  | 5 µl     |
| 10% SDS                        | 50 µl                  | 100 µl                | 100 µl   |
| 10% APS <sup>2</sup>           | 50 µl                  | 100 µl                | 100 µl   |

<sup>1</sup> Volumina für zwei Gele    <sup>2</sup> Zugabe kurz vor Gebrauch

Zur Analyse der Proteine wurde die SDS-PAGE angewendet. Als Trennmedium bei dieser Form der Elektrophorese dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Zusätzlich kommt Natriumdodecylsulfat zum Einsatz. Dieses anionische Detergens überführt die Proteingemische in Polyanionen, die dann aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte in Gelapparaturen der Firma Bio-Rad. Zuerst wurde dazu ein 12,5 bzw. 16%iges Trenngel zwischen zwei im Giesstand fixierte Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach beendeter Polymerisation wurde das Isopropanol abgenommen und auf das Trenngel ein 4%iges Sammelgel gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Taschenkamm (entsprechend der aufzutragenden Probenmenge) eingeschoben. Nachdem dieses ausgehärtet war, konnte die Gelapparatur in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laufpuffer aufgefüllt werden.

Vor dem Auftragen der Proteinproben mit einer Hamiltonspritze wurden diese mit SDS-Probenpuffer (2x oder 5x) verdünnt und für 5 – 10 min gekocht. Zusätzlich zu den Proben wurde stets ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 – 110 V durchgeführt und bei Austritt der Bromphenol-Lauffront aus dem unteren Gelrand abgestoppt. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele vorsichtig entnommen und entweder zum Blotting in Transferpuffer gelegt oder sofort zur Visualisierung

der Proteine in Coomassie gefärbt. Nach der Coomassie-Färbung wurden die Gele für die Dauer von mind. 20 – 30 min in Entfärber gelegt. Bei Bedarf wurden die Gele zur dauerhaften Konservierung, nach einer zweistündigen Wässerung zwischen zwei Blättern Gel-Drying-Film im Trockenrahmen gespannt und über mehrere Stunden bei RT getrocknet. Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit einem Dokumentationssystem protokolliert.

### 3.3.5 Western-Blot (Nitrozellulose)

#### Materialien:

|                 |   |
|-----------------|---|
| Transferpuffer: | 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3  |
| Substrat-SL:    | 300 mg 4-Chloro-1-Naphtol in 100 ml Methanol  |
| Substrat-GL:    | 3 ml Substrat-SL; 50 ml PBS; 15 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  |
| Blockpuffer:    | 3% BSA in PBST  |
| PBS 10x:        | 2,0 g KCl; 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 80 g NaCl; 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; ad 1 l Aq.bid |
| TBS:            | 100 mM Tris-HCl (pH7,5); 100 mM NaCl; 3 mM MgCl <sub>2</sub>  |
| PBST/TBST:      | PBS bzw. TBS mit 0,05% Tween  |

Ponceau S

BioRad Mini-Gel Blotapparatur; Nitrocellulose Blotting Membran 0,45 µm Porengröße (Sartorius); Filterpapier (Whatman)

Beim Western-Blot werden die zuvor durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid-Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. An der Membranoberfläche bleiben diese aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung wird dabei erhalten, gleichzeitig wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Dadurch können die Proteine renaturieren und partiell ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen. Die gesuchten Proteine werden nach dem Blotten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert. In der hier gewählten Methode ist der zuerst verwendete Antikörper spezifisch gegen das entsprechende Protein (z.B. den angefügten His-Tag) gerichtet und der zweite Antikörper gegen den zuvor gewählten. Die Detektion erfolgt mittels einer Chemilumineszenzreaktion zwischen der an den zweiten Antikörper gebundenem HRP (Horseradish Peroxidase) und der Substratlösung (Chlornaphtol).

4 (bzw. 2, je nach verwendeter Stärke) Filterpapiere und 1 Nitrocellulosefolie wurden auf die entsprechende Größe zugeschnitten und in Transferpuffer für einige Minuten eingeweicht. Nach der Beendigung der SDS-PAGE wurden die Gele ebenfalls für kurze Zeit in Transferpuffer gelegt. Der Transfer-Einsatz der Blotapparatur wurde nach folgendem „Sandwich“-Prinzip komplettiert (Richtung von Anode nach Kathode): - Schaumstoffmatte - 2 Filterpapiere - NC-Folie – Gel – 2 Filterpapiere – Schaumstoffmatte. Insbesondere wurde dabei auf das

luftblasenfreie Auflegen der Gele und Filterpapiere geachtet. Anschließend wurde der Einsatz so in die Transferwanne eingeschoben, dass die Nitrocellulose zum positiven Pol orientiert und vollständig mit Transferpuffer bedeckt war. Die Wanne wurde daraufhin mit einem Rührfisch und Kühlelement versehen, auf ein Magnetrührer gestellt und der Transfer bei einer angelegten Spannung von 250 mA für 1 bis 1,5 h durchgeführt. Im Anschluss an den Blotvorgang wurde die Apparatur auseinander genommen und die Gele in Coomassie-Färbelösung gelegt. Die Nitrocellulose wiederum wurde für die Antikörper-Inkubation vorbereitet indem sie als Erstes in Ponceau S überführt und geschwenkt wurde, um die Proteine sichtbar zu machen. Nachdem die übertragenen Banden sichtbar wurden, konnte die Folie auf die benötigte Größe zugeschnitten und das Ponceau S mit PBS wieder ausgewaschen werden. Die Nitrocellulose wurde anschließend in Block-Puffer für 1h geschüttelt. Dem folgte ein dreimaliges Waschen für je 3 min in PBST und die Inkubation des Blots mit der 1. Antikörper-Lösung für 1 – 2 h. Nach diesem Schritt wurde erneut dreimal gewaschen und die Nitrocellulose mit der 2. Antikörperlösung (Peroxidase-Konjugat) inkubiert. Diese Inkubation wurde entweder 2 h bei RT oder ÜN bei 4°C durchgeführt. Nach nochmaligem Waschen wurde die Nitrocellulose in die frisch angesetzte Substrat-Gebrauchslösung überführt, mit welcher die Farbreaktion zur Visualisierung der Protein-Banden ausgelöst wurde. Sobald deutliche Banden zu erkennen waren, konnte die Reaktion durch das Austauschen der Substratlösung mit PBS oder destilliertem Wasser abgestoppt werden. Die erhaltenen Blots wurden im Anschluss fotografiert.

### 3.4 Quantitative PCR

#### 3.4.1 Präparation von RNA aus Gewebe (Milz)

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Milzen erfolgte teils von Hand mittels Trizol®, teils wurde der Einsatz von Kits aufgrund der höheren Effizienz bevorzugt.

##### Verwendete Kits:

Absolutely RNA® Miniprep Kit (Stratagene)

High Pure RNA Isolation Kit (Roche)

##### Lösungen:

Trizol®Reagenz; DEPC-Wasser (Diethylpyropcarbonat)-Lösung 0.01%; Chloroform;  
Isopropanol; 75% EtOH

Entscheidend für eine erfolgreiche RNA-Präparation ist die Vermeidung von einer Kontamination aller eingesetzten Verbrauchsmaterialien mit RNAsen. Dies wurde durch die Behandlung aller eingesetzten Verbrauchs-Materialien mit DEPC erzielt. Alternativ wurde Glas bzw. Metall für ein Minimum von 8 h bei 180°C inkubiert.

50 – 100 mg einer Milz wurde in 1 ml Trizol homogenisiert und im Anschluß 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu ermöglichen. Nach anschließendem Vortexen des Gemisches wurde dieses mit 200 µl Chloroform pro ml Trizol versetzt und das Reaktionsgefäß für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 2 – 3 min bei Raumtemperatur. Danach wurde das Gemisch bei 4°C und ca. 12000xg für 15 Minuten abzentrifugiert. Die entstandene obere Phase (mit RNA) wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Zur Präzipitation der RNA wurde dem Gemisch 0,5 ml Isopropanol pro ml Trizol zugesetzt, invertiert und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4°C, 12000xg, 15 min) war die RNA als semitransparentes Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es folgten 2 Waschschrte mit 75%igem Ethanol (150 µl), jeweils mit 5 minütigem Abzentrifugieren und anschließender Trocknung des Pellets (5 – 10 min). Das Pellet konnte nun in 20 – 50 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

## 3.4.2 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) / cDNA Präparation

Materialien:

MMLV-RT Puffer 5x (Promega)  
 MMLV-RT 200 U/μl (Promega)  
 Random Hexamere / Oligo(dT)-Primer (Promega)  
 dNTPs (Perkin Elmer, Fermentas)  
 RNAsin 40 U/μl (Promega)  
 RNase-free DNase I 10 U/μl (Roche)

Kits:

Transcriptor First Strand cDNA Synthese Kit (Roche)

PCR product high purification Kit (Roche)

In der Reversen Transkription werden RNA-Moleküle mit einer spezifischen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase aus Retroviren (MMLV, murines Moloney Leukämievirus) in cDNA umgeschrieben.

Dieser Vorgang wurde in folgenden 3 Schritten durchgeführt:

- |                  |                    |              |
|------------------|--------------------|--------------|
| 1. DNase-Verdau: | RNA                | 5 μl (~2 μg) |
|                  | 5x MMLV Puffer     | 10 μl        |
|                  | H <sub>2</sub> O   | 22 μl        |
|                  | RNase free DNase 1 | 1 μl         |

Dieses Reaktionsgemisch wurde für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend die DNase für 5 Minuten bei 95°C inaktiviert.

2. cDNA Synthese:

Nachdem das Gefäß auf Eis gekühlt worden war, wurden zugesetzt:

|                  |               |
|------------------|---------------|
| dNTPs (10 mM)    | 8 μl          |
| RNAsin           | 1 μl          |
| Oligo(dT)-Primer | 1 μl (2,5 μM) |
| MMLV RT          | 2 μl          |

Die Synthese der cDNA erfolgt für 90 Min bei 37°C, gefolgt von einer 10 minütigen Inaktivierung der Enzyme bei 80°C

3. cDNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der cDNA wurde mit dem PCR high purification Kit von Roche durchgeführt, jedoch erfolgte die Elution mit TE Puffer.

Desweiteren wurde ein Teil der cDNA-Präparation mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthese Kit (Roche) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.4.3 Lightcycler - Real-time PCR

Materialien/Kits:

QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen)

LightCycler® Capillaries (Roche)

Die Real-Time-PCR bietet ein zeitsparendes Verfahren zur Quantifizierung von mRNA. Sie beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht dabei aber eine Quantifizierung der erhaltenen DNA-Menge. Diese wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, welche während der einzelnen Zyklen erfasst werden. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit dargestellt werden. Der hier verwendete DNA-Farbstoff SYBR-Green I bindet sich (interkaliert) an die „kleinen Gruben“ der neu amplifizierten doppelsträngigen DNA. Die Spezifität der PCR wurde mittels einer anschließenden Schmelzkurven-Analyse getestet. Die Auswertung erfolgte mittels der Software REST08 (Relative Expression Software Tool 2008; © Corbett Research; M. Pfaffl; TU München).

#### Generierung eines externen Standards

Um für einzelne Zytokine einen externen Standard im Lightcycler zu erhalten, wurden mittels konventioneller PCR spezifische Amplifikate gewonnen. Die PCR wurde mit der cDNA aus den im Tierversuch erhaltenen Milzen durchgeführt. Die Amplifikate wurden direkt im Anschluß an die PCR in Plasmide (pDrive) kloniert und diese wiederum in den *E.coli* -Stamm DH5 $\alpha$  transformiert. Nach Kultivierung dieser Bakterien konnten die Plasmide extrahiert, aufgereinigt und photometrisch gemessen werden, um die Kopienzahl in der Lösung zu berechnen. Die Plasmide wurden nach der Aufreinigung mittels geeigneter Restriktionsenzyme linearisiert, da dies der Amplifikationseffizienz genomischer DNA bzw. cDNA eher entspricht als die „supercoiled“ Konformation von geschlossenen Plasmiden.

Nach kolorimetrischer Bestimmung der Plasmid-DNA Konzentration wurde die Kopienzahl nach folgender Formel berechnet:

$$(X \text{ g}/\mu\text{l DNA} / [\text{Plasmidlänge in Basenpaaren} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} = Y \text{ Kopien}/\mu\text{l}$$

Auf diese Weise stand für jedes Zytokin eine Plasmidsuspension mit bekannter Konzentration an spezifischer Zytokin-dsDNA zur Verfügung, welche nunmehr als externer Standard (Standard-Verdünnungsreihen) im LightCycler eingesetzt werden konnte.

Ein 20 µl RT-PCR-Ansatz beinhaltet folgendes Reaktionsgemisch:

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| cDNA                       | 5 µl     |
| FW-Primer (10pmol/µl)      | 0,25 µl  |
| RV-Primer (10pmol/µl)      | 0,25 µl  |
| Master Mix 2x (SYBR-Green) | 10 µl    |
| H <sub>2</sub> O bid.      | ad 20 µl |

Um Primer-Annealing zu minimieren, wurde ein 1:1 Primer- Mix vor dem Einsatz in die RT- qPCR bei 95°C für 10min denaturiert.

Die Amplifikationsbedingungen waren für alle Zytokine identisch:

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Initial-Denaturierung | 95°C 5min                                 |
| 45 Zyklen:            | Denaturierung 95°C 20sec (Slope 20°C/sec) |
|                       | Annealing 55°C 20sec (Slope 20°C/sec)     |
|                       | Elongation 72°C 20sec (Slope 20°C/sec)    |

Im Anschluss an jede PCR erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse (95°C – 65°C; Slope 20°C/sec) zur Überprüfung der Amplifikationsprodukte (siehe 3.4.5).

#### 3.4.4 Schwellenwert- und Cp- Wert- Bestimmung

Als Schwellenwert wird der Zyklus bezeichnet, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Berechnung dieses Schwellenwertes kann automatisch von der LightCycler2.0 Software erfolgen oder manuell eingestellt werden. Die manuelle Einstellung erfolgt durch Anpassung der Cp-Werte („crossing point“ auch Ct („cycle threshold“)-Werte für Schwellenwert-Zyklus) der Negativ- Kontrolle an die maximale Zyklenzahl oder Cp´s der mitgeführten Standardverdünnungen.

#### 3.4.5 Schmelzkurvenanalyse

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die zuvor amplifizierte DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur kontinuierlich erhöht wird (hier 65°C → 95°C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird der SYBR Green wieder freigesetzt, was zu einer Fluoreszenzabnahme führt. Dies ermöglicht eine Unterscheidung von gewünschtem Amplifikaten und Primer-Dimeren.

#### 3.4.6 Normalisierung

Die gemessenen CP- Werte der Quantifizierung werden für jede Probe mit dem entsprechenden Referenzgen-Wert (hier β-actin) normalisiert. Die Normalisierung erfolgt mit folgender Formel:  $\text{Zielgen normalisiert} = \text{CP Zielgen} / \text{CP Referenzgen}$

### 3.4.7 Effizienzberechnung

Die Berechnung der Amplifikations- Effizienz erfolgte entweder direkt mit der internen Software des LightCycler® 2.0 oder mittels REST09©, kann aber auch manuell durch die Formel:  $E = 10^{-1/m}$  berechnet werden (m = Steigung der Standard-Kurve).

### 3.4.8 Berechnungsgrundlage der relativen Quantifizierung – Die $\Delta\Delta\text{CP}$ - Methode

Die  $\Delta\Delta\text{CP}$ - Methode ist die Grundlage der hier verwendeten Software REST09©, kann aber auch manuell zur Berechnung von Expressionsunterschieden eingesetzt werden. Die Berechnung durch die  $\Delta\Delta\text{CP}$ - Methode normalisiert zuerst die CP- Werte des Zielgens mit denen des Referenzgens, und subtrahiert diesen Wert von dem einer Kontrollgruppe:

$$\Delta\text{CP} = \text{CP}_{\text{Zielgen}} - \text{CP}_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP}_{\text{Proben}} - \Delta\text{CP}_{\text{Kontrolle}}$$

Der relative Expressionsunterschied ergibt sich dann aus folgender arithmetischer Formel:

$$\text{Verhältnis} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

Diese Berechnung basiert jedoch auf einer optimalen PCR- Effizienz von 2,0. Da diese Effizienz in der Praxis fast nie erreicht werden kann, wurde ein Effizienz- korrigiertes Berechnungs- Modell entwickelt:

$$\text{Verhältnis} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})} / (E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}$$

REST09© ist die automatisierte Anwendung dieser Formel, welche eine Versuchsgruppe mit einer Kontrollgruppe vergleicht. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in BoxPlots, jedoch wird nur bei signifikanter Änderung der Expressionsverhältnisse ein Rückschluss auf eine Regulierung nach unten oder oben ausgegeben. Die benötigte Effizienz wird von REST09© durch Eingabe der Standardverdünnungen und der dazu erhaltenen CP- Werte berechnet und in die Berechnung der relativen Werte eingesetzt.



### 3.5 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

#### Materialien:

|  |   |
|--|---|
| Beschichtungspuffer:                             | Lösung A: 4,2 g NaHCO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O ad 1000 ml<br>Lösung B: 5,3 g Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O ad 1000 ml<br>Lösung B zu Lösung A geben bis pH 9,6 |
| Waschpuffer:                                     | PBS + 0,05% Tween20 (Spritzflasche)   |
| Nachbeschichtungspuffer:                         | PBS + 3% BSA  |
| Probenverdünnungspuffer:                         | PBS + 0,5% (1%) BSA   |
| Substratpuffer:                                  | 105,1 g Diethanolamin<br>0,1 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O<br>→ H <sub>2</sub> O ad 1000 ml, pH 9,8 einstellen   |
| Substratlösung:                                  | 1 mg/ml 4-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer   |
| Seren und Antikörper, Mikrotiterplatte für ELISA |   |

Der ELISA wurde zur Quantifizierung von Antikörperantworten der Versuchstiere gegen *E. multilocularis*-Antigene eingesetzt. Dabei werden Mikrotiterplatten mit den entsprechenden Antigenen beschichtet, an die die bei der Immunisierung gebildeten spezifischen Antikörper binden. Mittels Zugabe von enzymgekoppelten Anti-Maus-Antikörpern (Konjugat), die wiederum an die Serumantikörper binden, und eines chromogenen Substrates kann die Serumkonzentration durch Messen der Farbreaktion relativ quantifiziert werden.

Je 50 - 200 ng Antigen wurden in 50 bzw. 100 µl Beschichtungspuffer pro Kavität an Polystyrol-Mikrotiterplatten gebunden (ÜN, 4°C, feuchte Kammer oder 1,5 h bei 37°C). Nicht gebundenes Antigen wurde mit Waschpuffer ausgewaschen und die verbleibenden Bindungskapazitäten der Platte durch Inkubation mit Nachbeschichtungspuffer (100 µl) abgeblockt (4 h RT oder 30 min 37°C). Nach einem weiteren Waschschrift (3 x) wurden die vorher 1 : 100 in Probenverdünnungspuffer verdünnten Seren je 50 µl pro well aufgetragen und für 1,5 h bei 37°C (bzw. ÜN 4°C) inkubiert. Anschließend an einem erneuten Waschschrift (3 x), wurde das Konjugat zugegeben (50 µl/well) und nach vierstündiger Inkubation bei RT – alternativ ÜN bei 4°C (bzw. 1,5 h bei 37°C) – die enzymatische Farbreaktion durch Zugabe der Substratlösung (50 µl/well) durchgeführt. Nach einer Entwicklungsdauer von 30 – 60 min (RT und Dunkelheit) erfolgte die Messung durch ein Plattenphotometer (405 nm, Referenz 630 nm).

## 3.5.1 Schachbrett-Titration

Die Bestimmung geeigneter Antigen- und Serumkonzentrationen erfolgte mittels Schachbrett-Titration. Dieses Vorgehen ist insbesondere bei der Verwendung neuer Chargen von Antikörperkonjugaten und Antigenlösungen von Wichtigkeit. Auch durch eine längere Lagerung dieser Komponenten kann es zu Beeinträchtigungen der Affinität oder von anderen Funktionseigenschaften kommen. Mit der Schachbrett-Titration wird die Antikörperverdünnung und Beschichtungsverdünnung (Antigen) ermittelt, welche die höchste Differenz zwischen positivem und negativem Serum aufweist und somit die aussagekräftigsten Ergebnisse des ELISAs erwarten lässt. Exemplarisch sind die Ergebnisse der Titration für IgG-Gesamtantikörper in dem Diagramm 3.5.1a dargestellt.

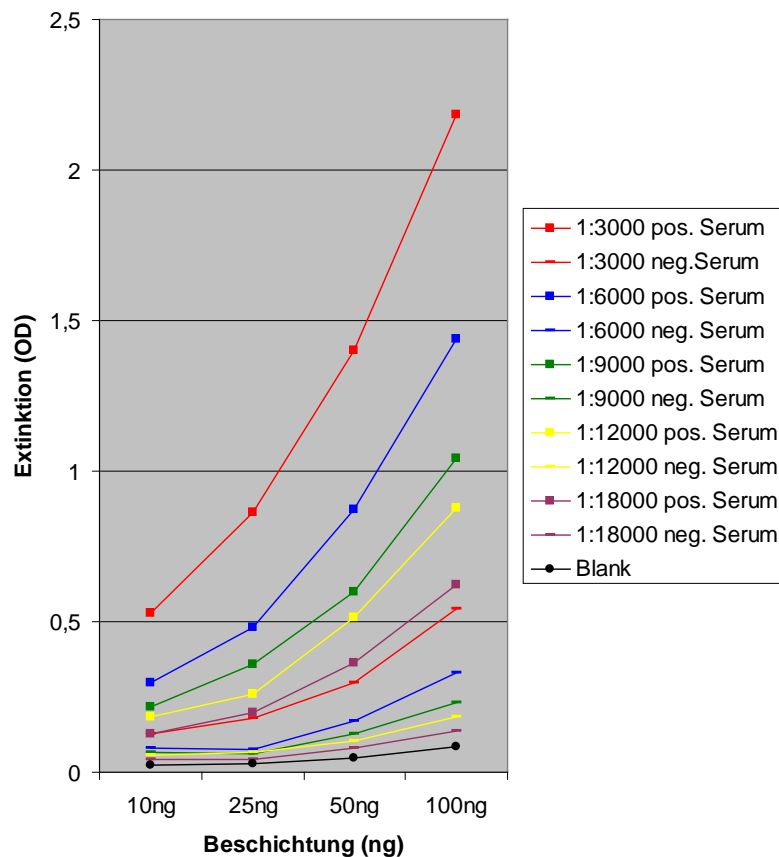


Abb. 3.5.1a Schachbrett-Titration der Verdünnungsreihe des Antikörper-Konjugats IgG-Gesamt gegen die Beschichtung des *E. multilocularis*- Gesamt-Antigens zur Ermittlung der optimalen Einsatz-Mengen für den entsprechenden ELISA (positiv und negativ Seren in jeweils gleicher Farbe). Größte Differenz bei der Antikörperverdünnung von 1 : 3000 und einer Beschichtung von 100 ng EM-crude.

## Konzentrationen der verwendeten Konjugate und Antigene

| Konjugat    | Verdünnung                               | Antigen-Konzentration/well                               |
|-------------|--|--|
| IgG (whole) | je nach Charge<br>1 : 2000 bis 1 : 12000 | EM95: 100 ng<br>EMGAPDH: 100 ng<br>EM-crude: 50 – 100 ng |
| IgG1        |  |  |
| IgG2a       |  |  |
| IgG2b       |  |  |
| IgG3        |  |  |

### 3.6 Milz Zellproliferation

#### 3.6.1 Zellkultur von Milzzellen

##### Medien:

RPMI – fertiges Zellkulturmedium

RFP (450 ml RPMI, 50 ml FCS (fötales Kälberserum), 5 ml Glutamat, 5ml Pen/Strep)

Erylysepuffer (4,17 g NH<sub>4</sub>Cl, 18,5 mg EDTA, 0,5 g NaHCO<sub>3</sub> – ad 500 ml H<sub>2</sub>O bid.)

steriles PBS

Die Versuchstiere wurden euthanasiert und zur Desinfektion mit Ethanol (70 %) abgesprüht. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in RPMI aufbewahrt. Zur Vereinzelung der Zellen wurde die Milz durch ein engmaschiges Sieb mittels Stempel passiert und im Anschluß durch auf- und abpipettieren homogenisiert. Die nun erhaltene Zellsuspension wurde abzentrifugiert (250xg, 10 min, 15°C), der Überstand verworfen und das Pellet in Erylysepuffer (5 - 10 ml) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde die Zellsuspension erneut abzentrifugiert und das Pellet in RFP (10 - 20 ml) resuspendiert. Mittels Filtration durch einen Zellstrainer wurden die bindegewebigen Anteile der Milz entfernt. Nach anschließender Verdünnung der Suspension (1 : 10 bzw. 1 : 100) wurde die Zellkonzentration mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde auf 10<sup>6</sup> Zellen pro ml verdünnt und je 2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro well in einer 96well Mikrotiterplatte ausgesät.

## 3.6.2 Proliferationsassay

Kits:

## Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) – Roche

Die Kultivierung der Milzzellen auf einer 96well Mikrotiterplatte wurde so gewählt, dass für jede zu untersuchende Versuchsgruppe mindestens 6 Duplikate pro Stimulation zur Verfügung standen. Nach Aussaat der Milzzellen (einige Stunden im Brutschrank) wurden die jeweiligen Kavitäten mit den entsprechenden Antigenen stimuliert. 24 Stunden später erfolgte die Stimulation mit dem T-Lymphozyten stimulierenden Mitogen Concanavalin A. Nach einer anschließenden Kultivierung der Milzzellen von 2 Tagen wurde die Zellkultur mit Bromdesoxyuridin (BrdU, 10 µM) versetzt ("pulsen"), welches von den Zellen aufgenommen und phosphoryliert werden kann und anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Gefolgt von einer weiteren Inkubation der Zellkultur von 24 h, wurde diese mit Hilfe eines Inversmikroskops kontrolliert, wobei nicht verwertbare Wells (Verunreinigungen etc.) notiert wurden. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugieren der Mikrotiterplatte (300xg, 10 min bei RT) an diese gepresst und der Überstand abgenommen. Danach erfolgte eine Trocknung der Zellen (60 min bei 60°C oder 15 min mit Hilfe eines Föns) um eine Fixierung mit Fix-Denat-Solution (Kit, 30 min RT) zu ermöglichen. Nach Entfernen der Fix-Denat-Solution wurde die Zellkultur mit 100 µl Anti-BrdU-POD-Lösung für 90 min inkubiert, anschließend 3 x mit PBS gewaschen und mit Substratlösung für 5 - 30 min inkubiert (Blaufärbung). Die Farbreaktion wurde mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Proliferationsrate (Einbau von BrdU) im ELISA-Reader gemessen (450 nm).

| Stimulanz        | Konzentration pro 10 <sup>5</sup> Zellen |
|------------------|--|
| EM95             | 2,5 µg                                   |
| EmGAPDH          | 2,5 µg                                   |
| ConA             | 0,5 µg                                   |
| Emcrude          | 5 µg                                     |
| Salmonella-crude | 5 µg                                     |

### 3.7 Geräte und Software

Agarosegel-Elektrophoreseapparatur, Easy Cast Electrophoresis System (AGS)

Axiophot-Photomikroskop (Zeiss)

Autoklav (HICLAVE™)

Blot-Apparatur (BioRad)

Bio-Photometer (Eppendorf)

CO<sub>2</sub>-Inkubator (Kendro)

Dokumentationsystem Bio-Profil® (LTF Labortechnik)

Gelapparatur für SDS-PAGE, Micro Protean II™ (BioRad)

Hamilton-Spritze

Invertmikroskop, Axiovert 25 (Zeiss)

Knopfkanülen gebogen 1,0 x 40 mm (Heiland)

Kühlzentrifuge 5415D (Eppendorf) AG

Kühlzentrifuge J2-HS (Beckman)

Lightcycler 2.0 (Roche)

Mehrkanalpipetten (Costar)

Metallsiebe verschiedener Maschenweite (Sigma)

Mikrotiterplatten-Waschautomat (Dynatech)

Milli-Q® Plus (Millipore)

Neubauer Kammer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup> (Assistent)

Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell)

Pipetten (Gilson, Eppendorf)

Plattenphotometer Mr 7000 (Dynatech)

Schüttelinkubator ITE (Infors)

Spannungsgeber (Pharmingen)

Stereomikroskop, Binocular (Zeiss)

Sterilbank (Heraeus®)

Thermocycler (GeneAmp®PCR System 2400, PerkinElmer)

Ultraschallgerät (Branson)

Vortex Genie (Bender und Hobein)

Waagen 2254 1000G X 0.01; BP 3100 P (Sartorius)

Wasserbad (Julabo)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gewinnung von Echinococcus multilocularis – Eiern

Die Gewinnung von *E. multilocularis* Eiern gestaltete sich im gesamten Verlauf der Dissertation als schwierig. So wurden in einem Zeitraum von über 3 Jahren (2006 bis 2009) allein aus dem Untersuchungsgebiet Schwäbische Alb 431 Füchse sezirt, von denen, trotz relativ hoher Infektionsrate, lediglich 15 Tiere eine Masseninfektion (> 1000 Würmer pro Abstrich) aufwiesen. Von diesen waren nur zwei Chargen infektiös, d.h. bei einer Testinfektion im natürlichen Endwirt *Microtus arvalis* bildeten sich ausreichend (> 70) Läsionen. Weiterhin wurden über 400 weitere Füchse aus dem Untersuchungsgebiet Bayrischer Wald sowie über 1200 Fuchs-Därme aus den veterinär-medizinischen Instituten in Heidelberg und Fellbach und der Wildforschungsstelle Aulendorf untersucht, von denen insgesamt 5 infektiöse Eichargen isoliert werden konnten (Abb. 4.1).

| <b>Bsp. 1: Untersuchungsgebiet Schwäbische Alb</b> |                           |                        |                        |
|--|---------------------------|------------------------|------------------------|
|  | <b>untersuchte Füchse</b> | <b>Masseninfektion</b> | <b>davon infektiös</b> |
| <b>2006</b>  | <b>164</b>                | <b>4</b>               | <b>1</b>               |
| <b>2007</b>  | <b>166</b>                | <b>10</b>              | <b>1</b>               |
| <b>2008</b>  | <b>101</b>                | <b>1</b>               | <b>-</b>               |

| <b>weitere „Bezugsquellen“ 2007/2008</b>  |                                   |   |
|---|-----------------------------------|---|
| <b>Herkunft</b>                           | <b>Därme bzw. Füchse pro Jahr</b> | <b>davon mit infektiösen Massenbefall</b> |
| <b>Wildtierforschungsstelle Aulendorf</b> | <b>ca. 400</b>                    | <b>2</b>                                  |
| <b>Heidelberg/Fellbach</b>                | <b>ca. 400</b>                    | <b>2</b>                                  |
| <b>Bayrischer Wald (beködert)</b>         | <b>ca. 300</b>                    | <b>1</b>                                  |

Abb. 4.1 Bezugsquellen von Füchsen und Därmen zur Isolierung von *E. multilocularis*-Eiern

#### 4.2 Klonierung von *E. multilocularis* Antigenen

Zur Durchführung der Immunisierungsversuche war es notwendig, die Metazestoden-Antigene EM95 und EMGAPDH einerseits für eine subkutane Applikation aufzureinigen und andererseits für eine orale Applikation mittels *Salmonella typhimurium* in einen geeigneten Expressionsvektor zu klonieren. Dieser Vektor sollte die Eigenschaft aufweisen, die Proteine nach der Expression in den extrazellulären Raum zu exportieren. Für erstere Anwendung wurden die Gene *em95* und *emGAPDH* in das Plasmid pQE30 (Quiagen) eingefügt. Dadurch wurde eine gute Detektierbarkeit sowie eine problemlose Aufreinigung der rekombinanten Antigene mittels des Plasmid-eigenen HIS-Tags gewährleistet. Durch den Einsatz des Expressionsvektors pVDL9.3 sollte ein Export der rekombinanten Antigene durch das Hämolyisin-Transportsystem gewährleistet werden. Damit wurde die Voraussetzung geschaffen, diesen Vektor in die, als Antigen-Carrier dienende, Salmonelle zu transformieren, um Vakzinierungsstudien durchzuführen. Die Klonierung erfolgte über den Zwischenvektor pLG612-1B, um die Verbindung zur prokaryotischen Export-Kassette im Endvektor pVDL9.3 zu erzielen (Abb. 4.1).

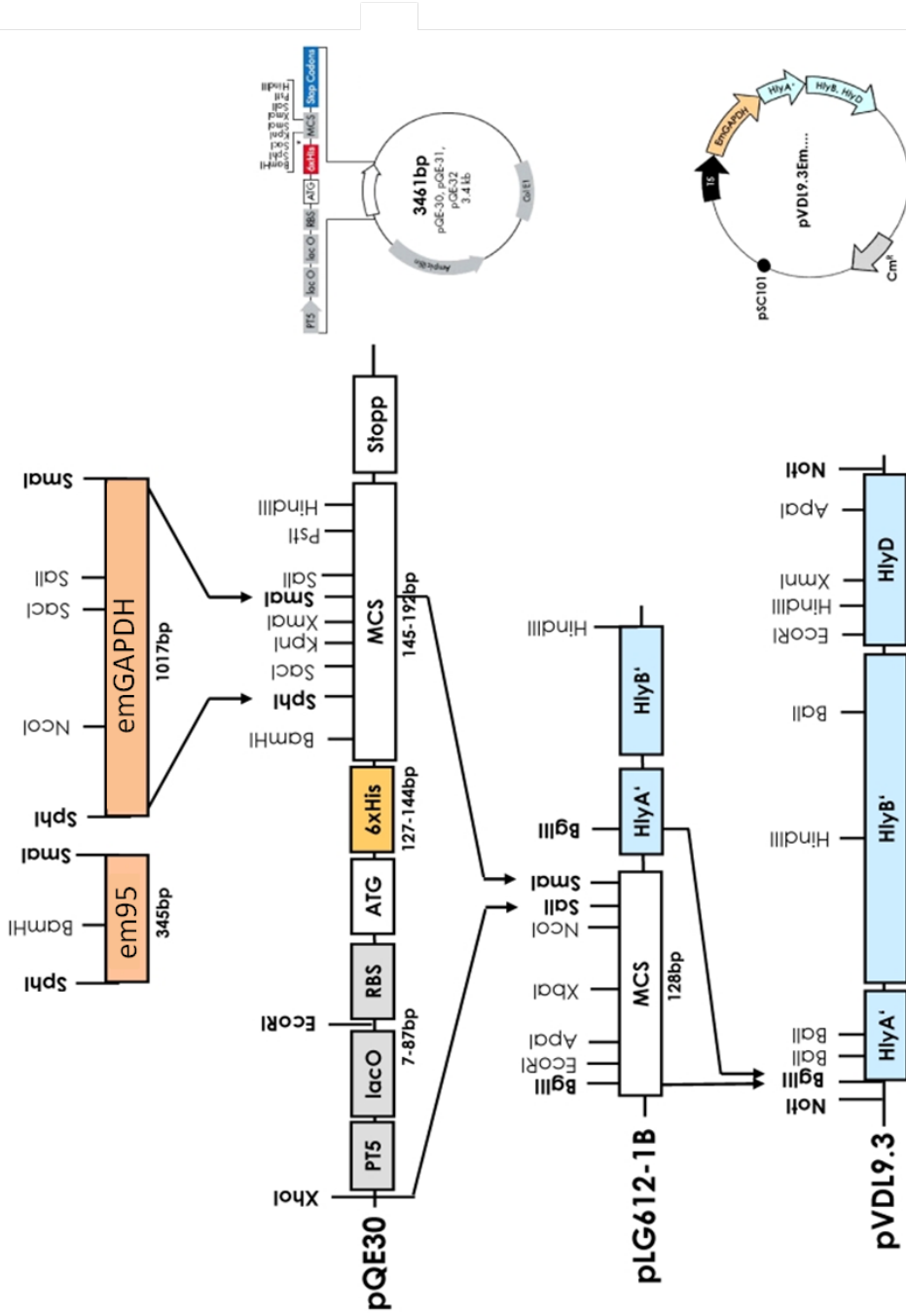


Abb. 4.1 Klonierungsschema der Gene emGAPDH und em95 in den Vektor pVDL9.3. Der verwendete Zwischenvektor pQE30 beinhaltet neben Startkodon, ribosomaler Bindungsstelle auch ein 6-His-Tag und erlaubt daher die Aufreinigung der synthetisierten Proteine, um diese zu detektieren und in separaten Vakzinierungsstudien zu verwenden. Der Vektor pLG612-1B fügt diese mit der Signalsequenz von Hämölysin A zusammen. Das erhaltene Vektorkonstrukt pVDL9.3emGAPDH resp. pVDL9.3em95 ermöglicht den Export des Antigens mittels des Hämölysin-Transportsystems (Zeichnung nicht maßstabsgetreu).



#### 4.2.1 Klonierung von emGAPDH in den Expressionsvektor pQE30

Ausgangsprodukt war die von Müller *et al.* (2001) beschriebene Sequenz von *Echinococcus multilocularis* Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (*emGAPDH*, GenBank Accession Nr. EMU19101). Die kodierende Sequenz von *emGAPDH*, mit Ausnahme des Start und Stop-Kodons, wurde mit PCR-Primern amplifiziert, wobei diese mit entsprechenden Schnittstellen (5': SphI, 3': SmaI) zur Integration in das Plasmid pQE30 flankiert wurden (siehe 3.2.7). Die Größe des erhaltenen Fragments betrug 1017 Basenpaare. Das „low-copy“ Plasmid pQE30 beinhaltet einen Phagen T5 Promotor und die synthetische ribosomale Bindestelle RBSII, welche zu einer hohen Translationsrate beiträgt und daher für eine hohe Expressionsrate von Proteinen verwendet wird. Nach der Ligation der Fragmente pQE30 und *emGAPDH* wurde das Produkt in die *E. coli*-Bakterienstämme Top10F' bzw. M15 transformiert. Die erfolgreiche Insertion in das Plasmid wurde durch Gelelektrophorese nachgewiesen (Abb. 4.2.1a). Die Expression des durch den pQE30-eigenen N-terminalen HIS-Tags verlängerten Proteins mit einem theoretischen Gewicht von 36 kDa, wurde anhand einer SDS-PAGE (Abb. 4.2.1b) sowie eines Western Blots (Anti-His-Tag-Antikörper) nachgewiesen.

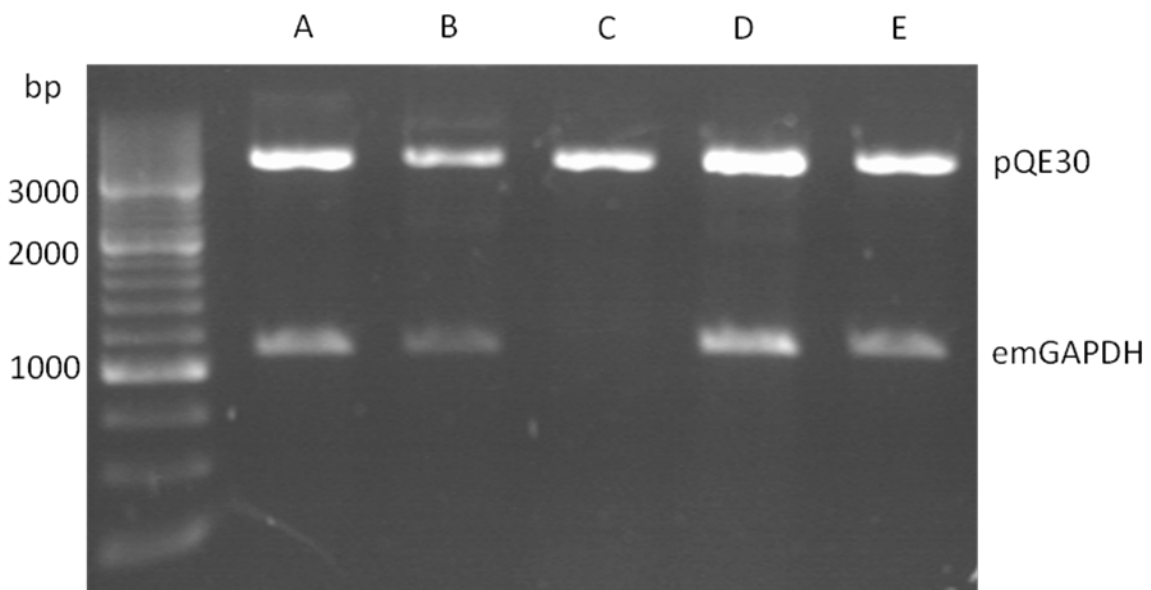


Abb. 4.2.1a Agarosegelelektrophorese: Restriktionsverdau von pQE30emGAPDH mit EcoRI/SmaI zum Nachweis der Integration von *emGAPDH* (vgl. Abb. 4.1). A, B, D, E zeigen eine erfolgreiche Klonierung. C weist auf eine nicht erfolgreiche Klonierung hin.

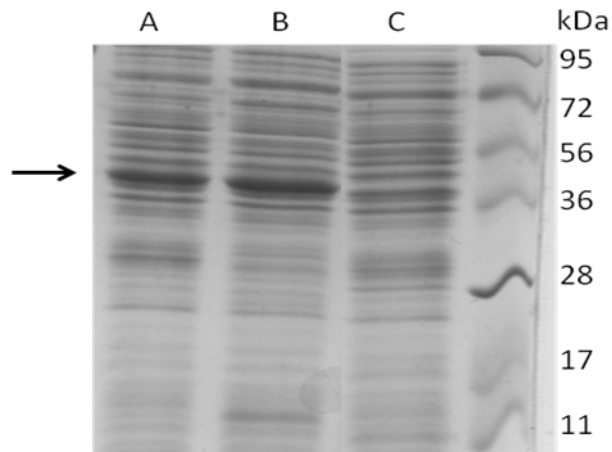


Abb. 4.2.1b SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression von EMGAPDH in Top10F'(Pfeil). A und B mit pQE30emGAPDH, C Kontrolle (Top10F') ohne Plasmid.

Zur Kontrolle der korrekten Insertion in Bezug auf das Leseraster wurden die weiter verwendeten Klone des Plasmides pQE30emGAPDH sequenziert. Die Sequenz des klonierten *emGAPDH*-Fragments wich an mehreren Loci von der ursprünglichen Sequenz (Genbank Accession Nr. EmU19101, Müller *et al.* 1994) ab. Ein Alignment mit einer in jüngerer Zeit von Brehm (2005) angelegten larvalen *E. multilocularis* cDNA-Bank (436bp, Genbank Accession Nr. DR748883), sowie ein weiterer Vergleich mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenasen weiterer Helminthen (*Schistosoma mansoni*, M92359; *Caenorhabditis elegans*, NP508535) zeigten identische Abweichungen. Die hoch konservierten Bereiche der Protein-Primärstruktur waren bei allen getesteten Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenasen identisch. Somit konnte sichergestellt werden, dass in dieser Arbeit mit dem Protein EMGAPDH gearbeitet wurde (Abb. 4.2.1c).

```

90  GA EY I V E S T G  I N T T V E K A S A  H F Q G G A K K V I  I S A P S A D S S H  V R V G V N H E K Y  EmU919101 (E. multilocularis)
*****
***** A P M F V ***** EmGAPDH-2A(E. multilocularis)
***** A P M F V ***** DR74883 (E. multilocularis)
**D*V***** V F ** I ** N *  * L K *****  ***** A P M F V ***** NP_508535 (C. elegans)
***V***** V F ** L ** K P  * I E *****  ***** A P M F V M ***** AAS02311 (L. polyphemus)
***V***** V F ** M ** G P  * L K ** R ** *  ***** A P M F V M ***** AAH85315 (M. musculus)

```

Abb. 4.2.1c Alignment von konservierten Bereichen der Proteinprimärstruktur verschiedener Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenasen (Position 90 – 139). Hervorgehoben sind die Bereiche, welche von der von Müller *et al.* eingestellten *emGAPDH*-Sequenz (EmU19101) abweichen.

#### 4.2.2 Klonierung von *emGAPDH* in den Expressionsvektor pVDL9.3

Aus *E. coli* (Top10F', M15) Klonen, welche pQE30*emGAPDH* integriert und das Protein erfolgreich exprimiert hatten, wurde das Plasmid isoliert und mit den Restriktionsenzymen XhoI und SmaI gespalten. Durch den Verdau entstand ein neues Fragment von 1159bp, welches das Startkodon und HIS-Tag vom Plasmid pQE30 enthält. Das Fragment wurde in das Plasmid pLG612-1B mittels der erwähnten Schnittstellen kloniert, um eine Fusion von *emGAPDH* mit dem 5'-Anteil der *E. coli* HämolyisinA (HlyA') kodierenden Region, welches die Signalsequenz von HlyA darstellt (Tzschaschel *et al.*, 1996), zu erhalten. Nach erfolgtem Test von Insertion und Expression wurde von dem Konstrukt pLG612-1B-*emGAPDH* nun die Expressionskassette mittels des Restriktionsenzym BglII herausgeschnitten und in das Plasmid pVDL9.3 kloniert (Abb. 4.1). Das Plasmid pVDL9.3 enthält bereits die zur Expression benötigten Anteile des Hämolyisin-Export-Systems (HlyA', HlyB und HlyD). Dadurch wurde das HIS-*emGAPDH*-HlyA'-Fragment zu der kompletten Expressionskassette fusioniert. Die richtige Ausrichtung des BglII-Fragments mit einer Größe von 1654 bp wurde durch einen Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI getestet. Bei korrekter Insertion war ein Fragment mit der Länge von 5500 bp zu erwarten. Eine falsche Insertion konnte durch zwei Fragmente (1300 und 4300 bp) detektiert werden (Abb. 4.2.2a und 4.2.2b).

Alle Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm Top10F' transformiert und in diesem auf Expression und Proteinexport (pVDL9.3) getestet. Obwohl für das theoretische Gewicht des nun synthetisierten Proteins (*emGAPDH* in Fusion mit HlyA') ein Wert von 59 kDa errechnet wurde, konnte im Western-Blot nur eine Bande bei ca. 36 kDa detektiert werden. Dieses Ergebnis entsprach der Größe von His-*emGAPDH* ohne das HlyA'-Fusionselement. Da das Protein jedoch im Blot durch einen Anti-His-Antikörper nachgewiesen wurde, war zumindest eine erfolgreiche Expression erzielt worden. Die TCA-Fällung zum Nachweis von *emGAPDH* im Kulturüberstand der Bakterien ergab nur eine sehr geringe Menge des Proteins im Medium (4.2.2c). Dieses Ergebnis widerspricht einem erfolgreichen Export des Proteins.

Zur Nutzung der mittlerweile gewonnenen *Echinococcus multilocularis* - Eicharge (siehe 4.1), welche nur eine begrenzte Haltbarkeit aufweist, wurde das erhaltene Plasmid pVDL9.3*emGAPDH* dennoch für Vakzinierungsstudien in den Salmonellenstamm Zoosaloral H® transformiert.

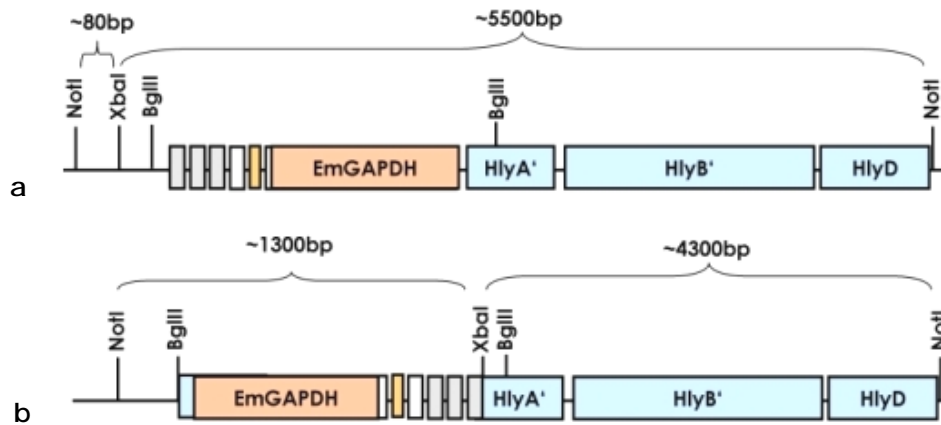


Abb. 4.2.2a. Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung der Kontrolle der korrekten Insertion des pLG612-1B-emGAPDH-BglIII-Fragments in den Vektor pVDL9.3. a) korrekte Insertion (Fusion von HlyA' mit emGAPDH); B) falsche Richtung der Insertion

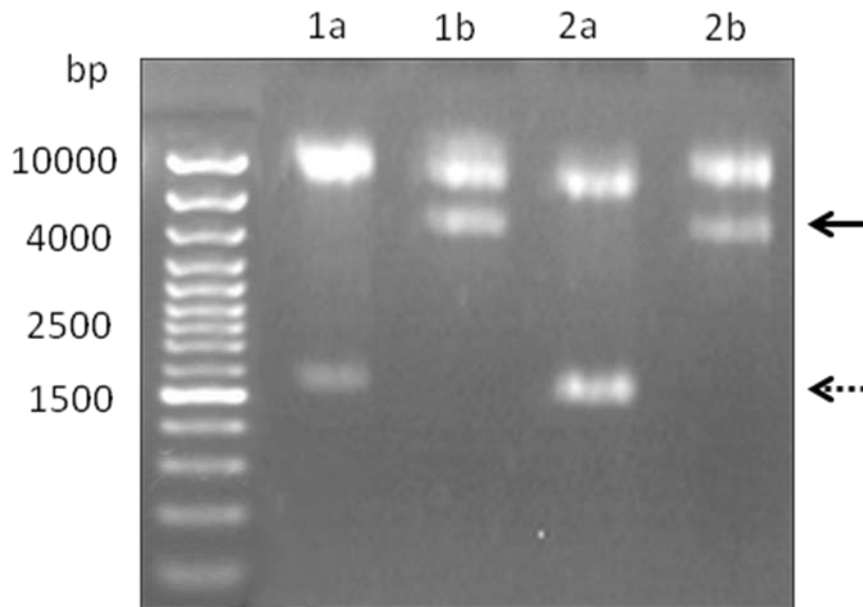
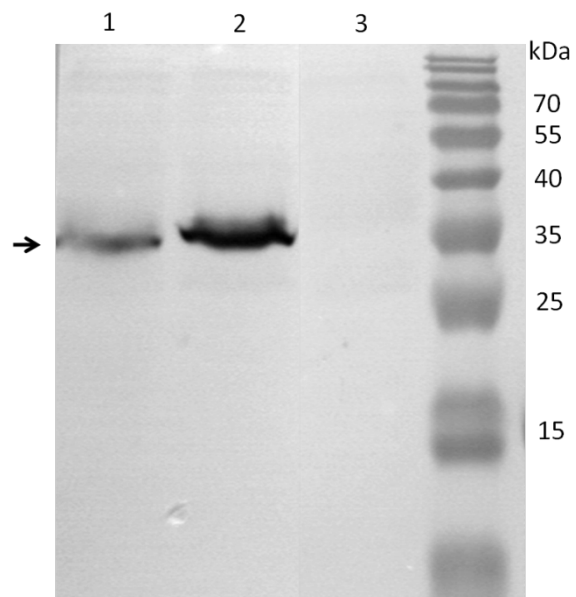


Abb. 4.2.2b Restriktionsverdau zweier Klone von pVDL9.3emGAPDH mit BglIII (1a u. 2a) zur Überprüfung der Integration des pLG612-emGAPDH-Fragments (~1,7kb, gestrichelter Pfeil) und mit NotI/XbaI (1b und 2b) zum Nachweis der korrekten Verbindung von emGAPDH mit der Hämolyisin-Kassette im Plasmid pVDL9.3 (~5,5kb, Pfeil). Vergleiche Abb. 4.2.2a

A



B

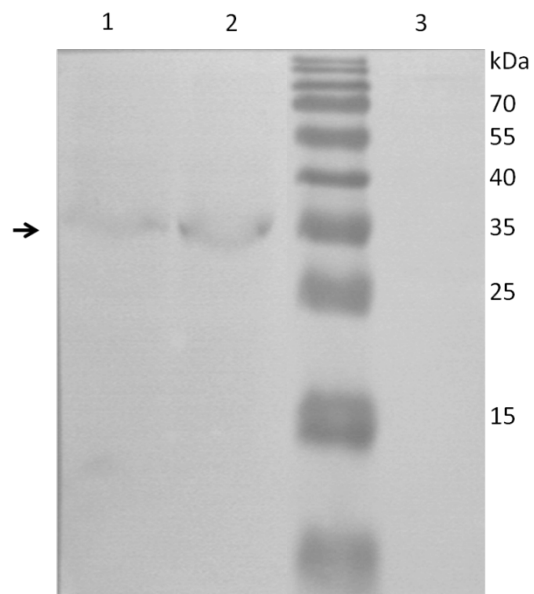


Abb. 4.2.2c Western Blot: 1. AK: Anti-His-Tag aus Maus, 2.AK: Anti-Maus-POD; A) pVDL9.3-emGAPDH Bakterien-Lysat (1,2), Kontrolle Top10F'(3). B) pVDL9.3-emGAPDH Bakterien- Überstand (1,2), Kontrolle Top10F'(3).

#### 4.2.3 Klonierung von *em95* in den Expressionsvektor pQE30

Die Klonierung von *em95* (Genbank Accession Nr. AY062921) in den Expressionsvektor pQE30 verlief analog zu der von *emGAPDH* (Abb. 4.1). Trotz stabilem Bakterienwachstums konnte eine Expression von EM95 im pQE30-Vektor nicht erzielt werden. Als Ursache wurde eine toxische Wirkung der hydrophoben Termini von EM95 vermutet. Aus diesem Grunde wurden zwei verkürzte Varianten (*em95G* und *em95W*) des ursprünglich eingesetzten *em95* mittels PCR amplifiziert. Nach vorhergehender Analyse der Proteinsequenz in Bezug auf deren Hydrophobizität (Abb. 4.2.3a) wurden beide Versionen am 5'-Ende um das sekretorische Signal verkürzt. Bei *em95G* wurde zusätzlich auf ein Teil, bei *em95W* auf die komplette Transmembrandomäne verzichtet (Abb. 4.2.3b). Die erhaltenen Konstrukte hatte nunmehr eine Länge von 366bp (*em95G*) bzw. 345bp (*em95W*). Nach Integration in den pQE30-Vektor und Transformation in die *E.coli*-Stämme Top10F', M15(pREP4) und SG13009(pREP4) wurde diese nach Induktion auf Expression getestet. Diese verlief bei beiden Protein-Varianten positiv (Abb. 4.2.3c), wobei sich die Expression durch den Bakterien-Stamm M15(pREP4) als am ergiebigsten erwies. EM95G hat ein theoretisches Gewicht von 15,8 kDa, EM95W 13,7 kDa. Die EM95-Varianten lassen sich durch eine zusätzliche BamHI-Schnittstelle in *em95G* anschaulich unterscheiden (Abb. 4.2.3d).

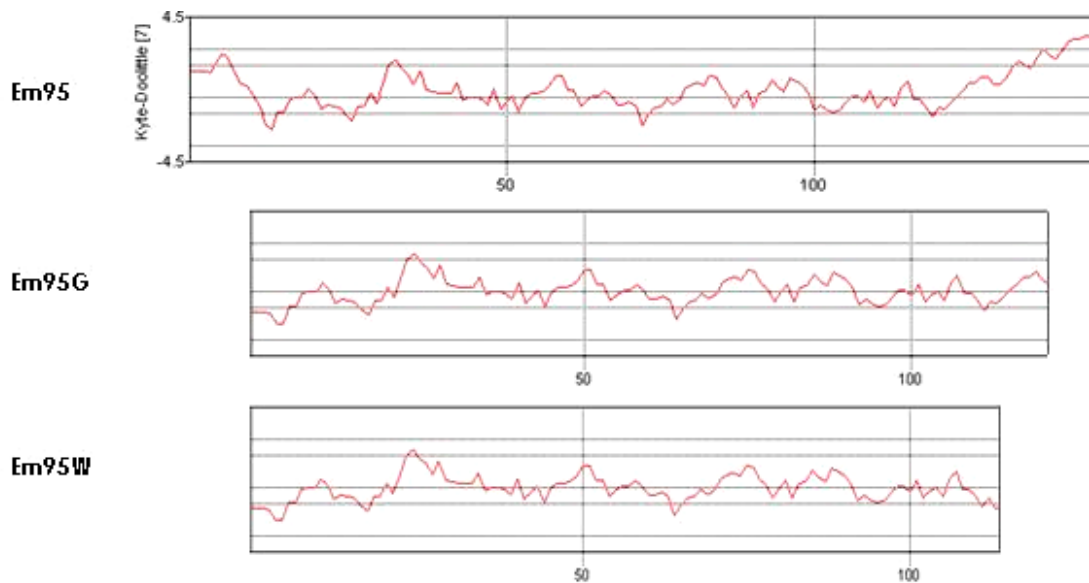


Abb. 4.2.3a Hydrophobizitäts-Blot (Software GENTle) der verschiedenen EM95-Varianten. Deutlich erkennbar ist die hohe Hydrophobizität am Beginn (sekretorisches Signal) und am Ende (Transmembran-Domain) der ursprünglichen Sequenz.

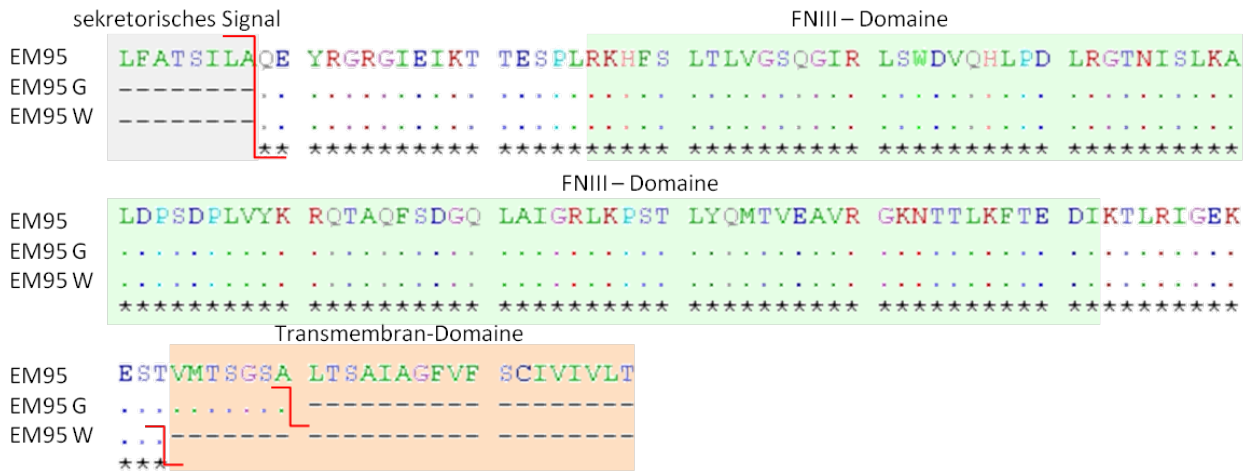


Abb. 4.2.3b Aminosäure-Alignment des ursprünglichen EM95 und der verkürzten Versionen EM95G und EM95W.

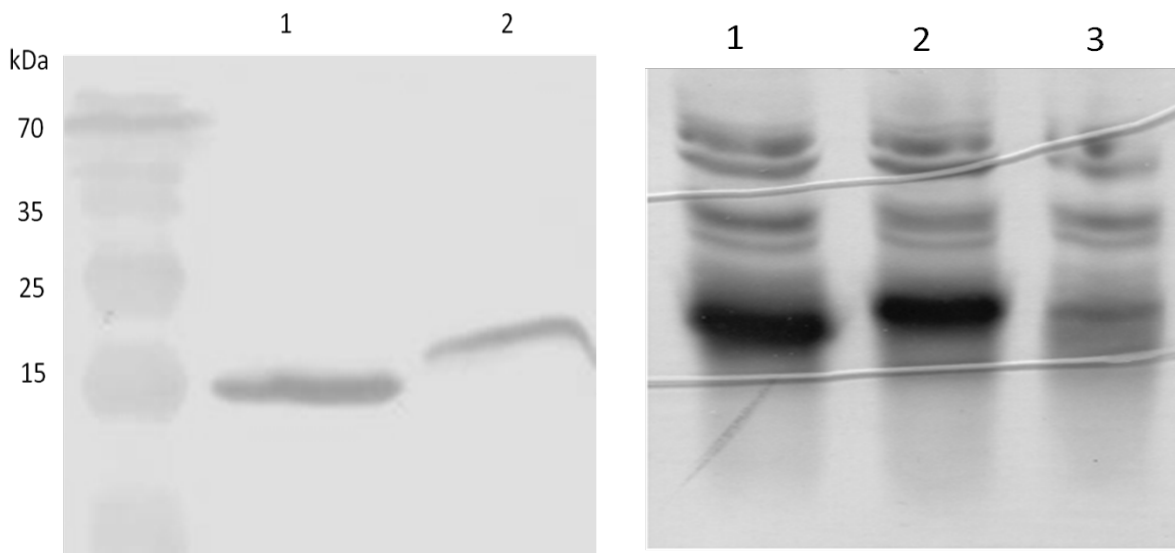


Abb. 4.2.3c Expression von EM95 W (1) und EM95 G (2). (A) Western-Blot (B) Coomassie-Gel, Kontrolle (3)

#### 4.2.4 Klonierung von *em95* in den Expressionsvektor pVDL9.3

Aus *E. coli* (Top10F') Klonen, welche pQE30em95W bzw. pQE95em95G integriert und die Proteine erfolgreich exprimiert hatten, wurden die Plasmide isoliert und diese mit den Restriktionsenzymen XhoI und SmaI geschnitten, so dass neue Fragmente, inklusive des Start und His-Tag vom Plasmid pQE30, mit einer Länge von 520bp bei *em95G* und 499bp bei *em95W* erhalten wurden. Diese wurden in das Plasmid pLG612-1B mittels der erwähnten Schnittstellen integriert, wodurch die XhoI-Schnittstelle aufgehoben wurde. Es entstand dadurch eine Gen-Fusion von *em95* mit dem 5'-Anteil der *E. coli* HämolyisinA (HlyA') kodierenden Region, welches die Signalsequenz von HlyA darstellt (Tzschaschel *et al.*, 1996). Die erhaltenen Konstrukte pLG612-1B-em95W und pLG612-1B-em95G wurden auf Expression und Export der Proteine getestet, wobei aufgrund des geringen Protein-Exports durch pLG612-1B-em95W, nur mit dem gut funktionierenden pLG612-1B-em95G weiter gearbeitet wurde. Aus dem Plasmid pLG612-1B-em95G wurde nun die Expressionskassette mittels des Restriktionsenzym BglII herausgeschnitten und in das Plasmid pVDL9.3 kloniert (Abb. 4.1). Dadurch wurde das HIS-em95G-HlyA'-Fragment zu der vollständigen Expressionskassette fusioniert. Die fehlerfreie Ausrichtung des BglII-Fragments mit einer Größe von 1004 bp wurde mittels eines Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI geprüft (analog pVDL9.3-emGAPDH, vgl. Abb. 4.2.2a). Hierbei konnte eine hohe Neigung zur gegensätzlichen Integration des Fragments festgestellt werden, so dass nur ca. 10% der getesteten Klone positiv waren. Das theoretische Gewicht des nun synthetisierten Proteins (*em95G* in Fusion mit HlyA') ergab einen Wert von 36 kDa, welches mittels SDS-PAGE bestätigt werden konnte (Abb. 4.2.4). Im Gegensatz zu *emGAPDH* blieb der HlyA'-Anteil während des Exports erhalten. Das erhaltene Plasmid pVDL9.3Em95W konnte nun zu Vakzinierungszwecken in den Salmonellen-Stamm Zoosaloral H® transformiert werden.

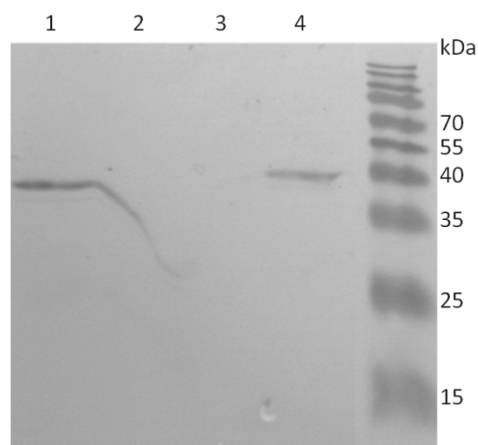


Abb. 4.2.4 Western Blot zum Nachweis des Exports von EM95 durch ZpVDL9.3em95G in den extrazellulären Raum mit Hilfe des Hly-Transportmechanismus. Während des Transfers wird der HämolyisinA-Anteil nicht entfernt, was zu einer Protein-Größe von 36kDa führt. 1 und 4 positive Klone.



#### 4.2.5 Transformation der Plasmide pVDL9.3-em95 und pVDL9.3-emGAPDH in Zoosaloral H<sup>®</sup> (*Salmonella typhimurium*)

Das abschließende Vorgehen bestand nun darin, die entstandenen Plasmidkonstrukte pVDL9.3-Em95G und pVDL9.3-EmGAPDH in den Impfstamm Zoosaloral H<sup>®</sup> zu transformieren. Bei diesem *Salmonella typhimurium* - Stamm (= *S. enterica* ssp. *enterica* ser. *Typhimurium*) handelt es sich um eine Doppelmutante, die auxotroph für Histidin und Adenin ist. Dieser, üblicherweise bei Hühnern eingesetzte Stamm, besitzt eine ausreichende Invasivität, um über den Magen und durch die Darmmukosa über Makrophagen in Organe wie Milz und Leber zu gelangen. Aufgrund seiner Auxotrophie ist Zoosaloral H<sup>®</sup> allerdings ausreichend attenuiert, um nur wenige Generationen zu überdauern. Diese Eigenschaften lassen Salmonellen zu geeigneten Vakzinekandidaten werden, zudem entspricht dessen oraler Applikationsmodus der Infektionsroute der Onkosphären von *Echinococcus spec.* weitgehend. Eine direkte Transformation des Plasmids aus einem *E. coli*-Stamm in Salmonellen ist aufgrund des verschiedenartigen Methylierungsmusters der Plasmid-DNA nicht möglich. Die Anpassung der Methylierungsstruktur erfolgte durch chemische Transformation über die Zwischenstufe des restriktions-defizienten *Salmonella* - Stammes  $\chi$ 3730. Nachdem das korrekte Plasmidkonstrukt nach Präparation aus  $\chi$ 3730 durch einen Restriktionsverdau (BglIII) und anschließender Gelelektrophores überprüft worden war (Abb. 4.2.5), erfolgte die chemische Transformation in den finalen Carrier Zoosaloral H<sup>®</sup>.

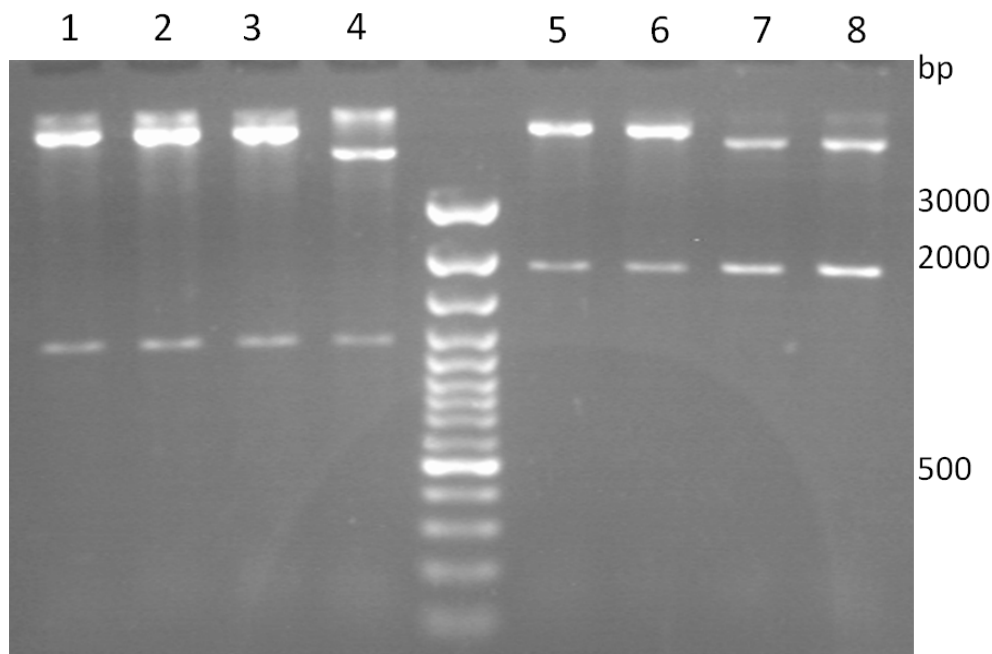


Abb. 4.2.5 Überprüfung von Klonen des Zwischenvektors  $\chi$ 3730 pVDL9.3em95 (1-4) bzw. pVDL9.3emGAPDH (5-8).

## 4.2.6 Kontrolle auf Export der Antigene EM95 und EMGAPDH in den extrazellären Raum

## EM95:

Nach erfolgreicher Transformation der Plasmids pVDL9.3-em95G in den Salmonellen-Stamm Zoosaloral H<sup>®</sup>, wurde das erhaltene Konstrukt ZpVDL9.3-em95 durch Proteinfällung des Überstandes und anschließender Western-Blot-Analyse auf Export der Antigene getestet (Abb. 4.2.6a). Nicht exprimierende Klone wurden verworfen. Für die exportierende ZpVDL9.3-EM95-Klone wurden im *Salmonella*-System stärkere Expressions- und Exportraten der Proteine festgestellt als in *E. coli*, was als Indiz für die bessere Eignung des pVDL9.3-Plasmids in Salmonellen gewertet werden kann.

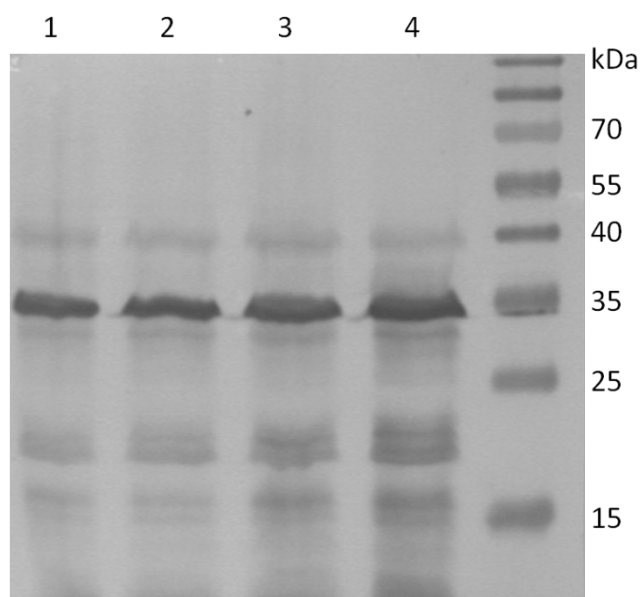


Abb. 4.2.6a Western Blot zum Nachweis des Exports des EM95 Antigens durch die Salmonelle ZpVDL9.3em95G ins Medium (TCA-Fällung des Kulturüberstandes). Alle Klone (1-4) waren positiv.

## EMGAPDH:

Ein erfolgreicher Export von EMGAPDH durch die Salmonelle konnte nicht erzielt werden. Die Ursachen dafür liegen nach eingehender Überprüfung des Klonierungsschemas im Unklaren. Sowohl die verwendeten Primer als auch die angefügten Schnittstellen (identisch mit denen von EM95) lassen die Bildung eines Stoppkodons nach *emGAPDH* und vor der *hlyA*-Kassette unwahrscheinlich erscheinen. Die frühere getätigte Annahme, dass 6HIS-EMGAPDH erfolgreich durch die Salmonelle exportiert wurde, basierte auf der Tatsache, dass EMGAPDH mittels TCA-Fällung im Überstand der Bakterienkultur nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.2.6b). Das im Überstand detektierte EMGAPDH (Abb. 4.2.6b) stammt jedoch mit größter Wahrscheinlichkeit von

zerstörten Salmonellen, wodurch das Protein freigesetzt wurde. Zudem erscheint aufgrund des fehlenden Hämolysin-Anteils ein Export unwahrscheinlich. Die Zusammenführung der Erkenntnisse, dass EMGAPDH nicht exportiert worden ist, sowie der fehlende Hämolysin-Anteil, erfolgten erst, nachdem die Tiere bereits mit infektiösen Eiern infiziert worden waren.

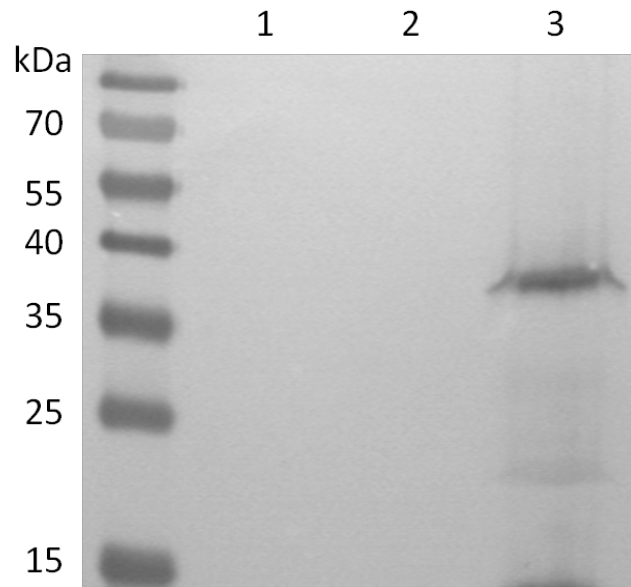


Abb. 4.2.6b Western Blot von EMGAPDH (TCA-Fällung des Kulturüberstandes). Aufgrund des ermittelten Proteingewichts von 36kDa (3) und des fehlenden Nachweises in den Proben 1 und 2 ist ein Export von EMGAPDH durch die Salmonelle ZpVDL9.3-EMGAPDH unwahrscheinlich. Klon 3 zeigt eine erfolgreiche Expression des Proteins, welches durch zerstörte Salmonellen in den Überstand gelangte.

#### 4.3 Immunisierungsstudien mit dem rekombinanten Antigen EMGAPDH

Zur Ermittlung des protektiven Potentials von EMGAPDH wurden zwei Tierversuche durchgeführt. Sechs Wochen alte BALB/c-Mäuse (n=10) wurden jeweils mit 20µg rekombinanten Antigen in Kombination mit 50µg Saponin (Adjuvans) im Abstand von 14 Tagen dreimal subkutan immunisiert (Abb. 4.3a). Jede Applikation erfolgte in einem Volumen von 200µl (Antigen + Anjuvans in PBS), verteilt an zwei lateralen Stellen im Rückenbereich (vgl. 3.1.7).

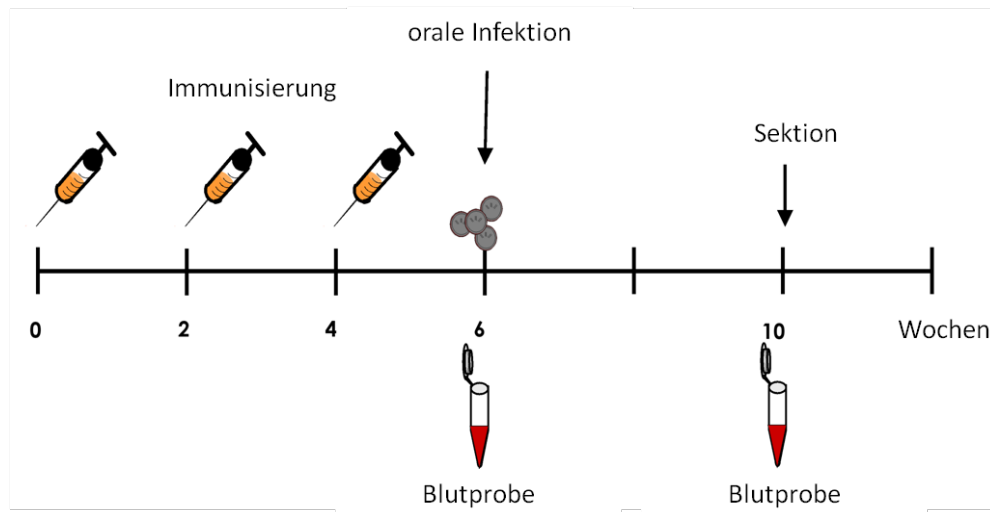


Abb. 4.3a Schema der Antigenimmunisierung

Die Kontrollen bestanden aus lediglich mit PBS („naive“ Mäuse), bzw. mit Adjuvans behandelten Tieren (PBS + Saponin) sowie einer nicht immunisierten, nicht infizierten Gruppe (je n=10). Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse mit 4000 *E. multilocularis*-Eiern, suspendiert in 200µl PBS, oral infiziert. Die Sektion erfolgte nach weiteren 4 Wochen (Tab, 4.3a und 4.3b).

Durch Immunisierungen mit EMGAPDH konnte in beiden Versuchen eine signifikante Reduktion ( $p = 0,007$  bzw.  $p = 0,00008$ , Mann-Whitney U Test) der Zystenbildung erzielt werden (Abb. 4.3b und 4.3c). Die Parasitenbürde verringerte sich gegenüber den infizierten Kontrolltieren um 76,4% im ersten Versuch und 86,1% im zweiten Versuch. Unterschiede ergaben sich in den Versuchen durch eine Kontroll-Applikation mit dem Adjuvans Saponin. Im ersten Versuch ergab diese keine Unterschiede zu den infizierten Kontrolltieren, wogegen im zweiten Versuch eine signifikante Verringerung der Läsionen ( $p = 0,00012$ ) verzeichnet werden konnte. Weiterhin war die Abnahme der Metazestodenbildung nach Immunisierung mit EMGAPDH im Vergleich zu der Adjuvans-Kontrolle im ersten Versuch signifikant, im zweiten jedoch nicht.

Tabelle 4.3a Übersicht der Versuchsgruppen von Immunisierungsstudie 1 mit EMGAPDH

| Versuchsgruppe                      | EMGAPDH                | Saponin        | Kontrolle       |
|-------------------------------------|------------------------|----------------|-----------------|
| Applikation (s.c.)                  | 6HIS-EMGAPDH + Saponin | Saponin        | PBS             |
| Infektionsdosis                     | 4000 Eier              | 4000 Eier      | 4000 Eier       |
| Überlebende Tiere                   | 10/10                  | 10/10          | 10/10           |
| Metazestoden $\bar{x} \pm SD$       | 5,4 $\pm$ 5,1          | 16,5 $\pm$ 6,5 | 22,9 $\pm$ 16,7 |
| Maximale/minimale Anzahl von Zysten | 7/1                    | 29/8           | 51/2            |

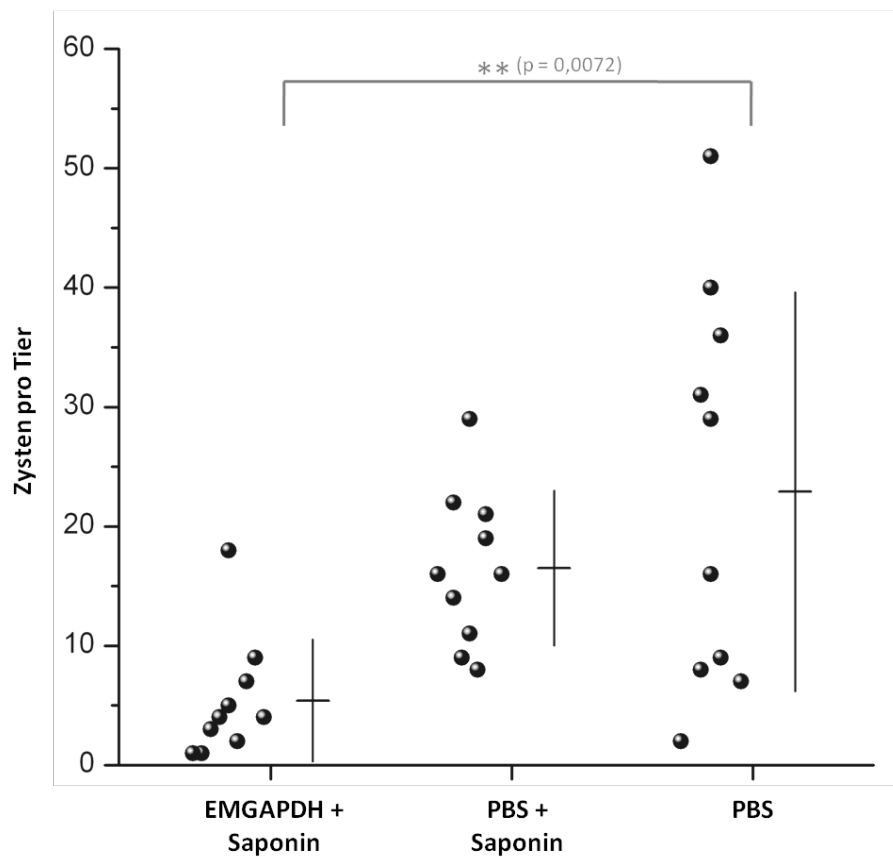


Abb. 4.3b Immunisierungsstudie 1 mit dem rekombinanten Antigen EMGAPDH. Abgebildet sind die Leber-Läsionen (Zysten pro Tier) nach oraler Belastungsinfektion, sowie die Mittelwerte mit Standardabweichung

Tabelle 4.3b Übersicht der Versuchsgruppen von Immunisierungsstudie 2 mit EMGAPDH

| Versuchsgruppe                      | EMGAPDH                | Saponin       | Kontrolle       |
|-------------------------------------|------------------------|---------------|-----------------|
| Applikation (s.c.)                  | 6HIS-EMGAPDH + Saponin | Saponin       | PBS             |
| Infektionsdosis                     | 4500 Eier              | 4500 Eier     | 4500 Eier       |
| Überlebende Tiere                   | 10/10                  | 10/10         | 10/10           |
| Metazestoden $\bar{x} \pm SD$       | 3,4 $\pm$ 3,2          | 4,3 $\pm$ 3,3 | 24,5 $\pm$ 19,2 |
| Maximale/minimale Anzahl von Zysten | 10/0                   | 8/0           | 64/6            |

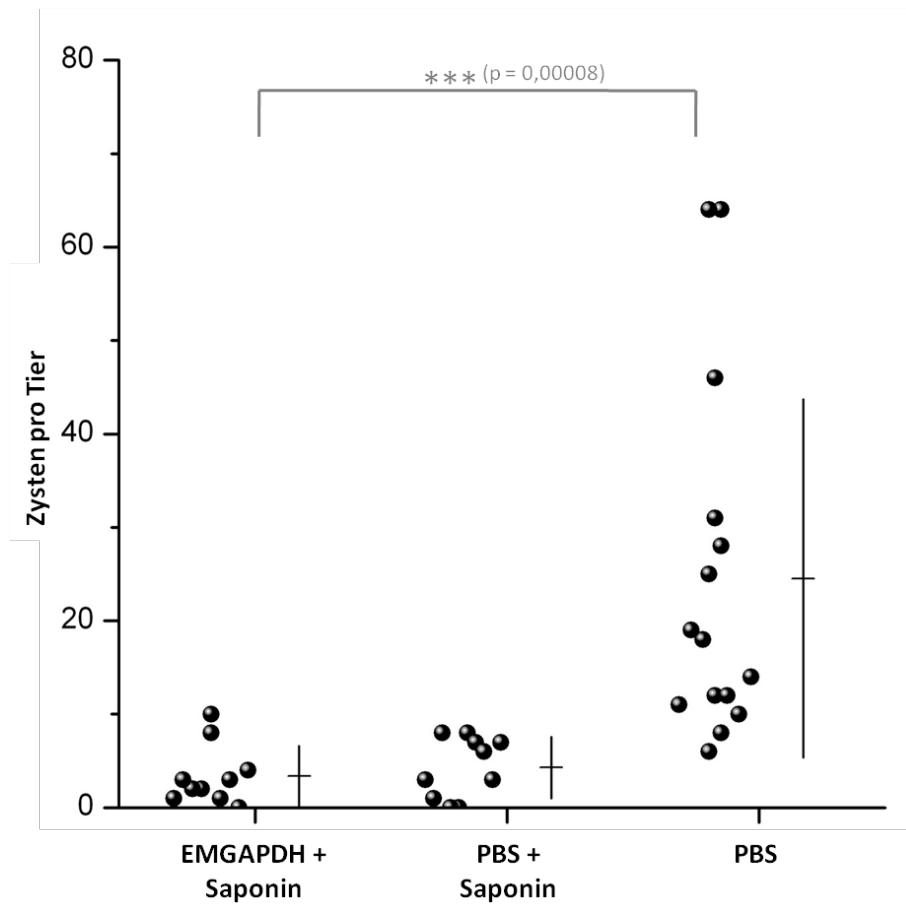


Abb. 4.3c Immunisierungsstudie 2 mit dem rekombinanten Antigen EMGAPDH. Abgebildet sind die Leber-Läsionen (Zysten pro Tier) nach oraler Belastungsinfektion, sowie die Mittelwerte mit Standardabweichung.

#### 4.3.1 Milzzellproliferationen nach subkutaner Immunisierung mit EMGAPDH

Die Milz dient als sekundäres lymphatisches Organ der Speicherung und Differenzierung von den zellulären Komponenten der erworbenen Immunantwort. Die Pulpa alba der Milz besteht einerseits aus Lymphfollikeln („Malpighi-Körperchen“), welche B-Lymphozyten enthalten und aus den periarteriellen lymphatischen Scheiden mit T-Lymphozyten. Zur Beurteilung des Einflusses der Immunisierung auf die Proliferation dieser Milzzellen wurden die Zellteilungsraten nach der Immunisierung und der oralen Infektion (4wpi) *in vitro* untersucht. Die Milzzellen von den Mäusen der jeweiligen Versuchsgruppen wurden zusammengefasst und kultiviert. Die Stimulation der Zellkulturen erfolgte mit den jeweils verwendeten, rekombinanten Antigenen sowie mit Gesamt- *E. multilocularis*-Antigen und dem Lektin ConcanvalinA (ConA, siehe 3.6.2). Die Proliferationsrate wurde durch den Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in neu synthetisierte DNA photometrisch bestimmt.

##### Milzzellproliferation nach Immunisierung mit EMGAPDH in Studie 1

Nach Stimulation mit ConA wiesen die Milzzellen der infizierten Kontroll-Tiere die höchste Zellteilungsrate auf, wobei auch die Zellen der nicht infizierten, nicht immunisierten Kontrolltiere stark proliferierten. Die Milzzellen sowohl der mit EMGAPDH immunisierten Gruppe, als auch der nur mit Saponin behandelten Tiere zeigten eine verminderte Proliferationsrate, vergleichbar mit der der nicht infizierten Kontrolltiere. Der Unterschied in der Proliferation von den Milzzellen dieser Gruppen zu den nicht immunisierten, infizierten Tieren, nach Stimulation mit ConA, ist dennoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney U Test). Auffallend ist die geringe Zellteilungsaktivität von den Milzzellen der immunisierten Gruppe sowohl nach Stimulation mit Gesamt- *E. multilocularis* Antigen als auch nach Stimulation mit EMGAPDH-Antigen. Die Differenzen zu den nicht immunisierten, nicht infizierten Kontrolltieren sind statistisch nicht signifikant. Diese ausbleibende Reaktion auf die Stimulation mit dem Antigen EMGAPDH scheint jedoch unspezifisch zu sein, da keine Unterschiede zu den anderen beiden Gruppen bestehen. Während die Milzzellen der infizierten Kontrolltiere, als auch die Milzzellen der Saponin-Gruppe nach Stimulation mit Gesamt- *E. multilocularis* – Antigen (EM-crude) eine stark erhöhte Proliferationsrate aufweisen, bleibt diese bei den mit EMGAPDH immunisierten Tieren auf dem Niveau der nicht infizierte Kontrollgruppe (Abb. 4.3.1a).

Wird die Proliferationsfähigkeit der Milzzellen der einzelnen Versuchsgruppen nach Stimulation mit ConA als die absolute Zellteilungsfähigkeit beurteilt, erweist sich EMGAPDH, wie auch EM-crude als starkes Stimulanz. Einzig die Milzzellen der infizierten Tiere in diesem Versuch zeigen eine geringe Proliferationsfähigkeit nach Stimulierung mit EMGAPDH (Abb. 4.3.1c).

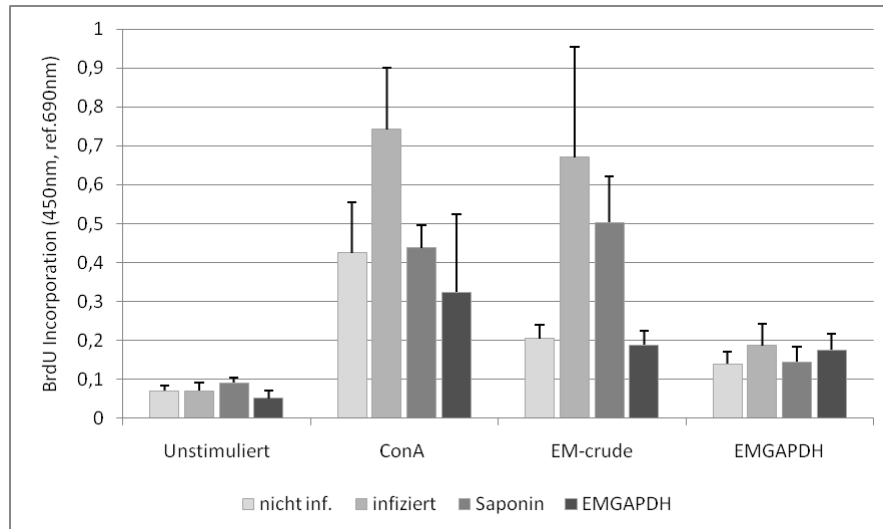


Abb. 4.3.1a Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Versuch 1 der Immunisierung mit EMGAPDH zum Sektionszeitpunkt. Dargestellt ist der Mittelwert aus je 6 Ansätzen (Pool der Milzzellen aller Tiere einer Versuchsgruppe) und die Standardabweichung. (Ninf – nicht infizierte Kontrollgruppe, Inf – infizierte Kontrollgruppe (PBS), EMGAPDH – mit EMGAPDH + Saponin immunisierte Tiere, Saponin – mit Saponin behandelte Tiere).

#### Milzellproliferation nach Immunisierung mit EMGAPDH in Studie 2

Auch in diesem Experiment zeigten die Milzzellen aller Gruppen nach Stimulation mit ConA eine stark erhöhte Zellteilungsrate, wobei die Zellen der mit EMGAPDH immunisierten Mäuse eine geringere Proliferation aufwiesen als die Saponin- und PBS-Gruppe und sich eher auf dem Niveau der nicht infizierten Kontrollgruppe befand. Abweichend vom ersten Tierversuch, bei dem die Milzzellen der mit EMGAPDH immunisierten Mäuse nach Stimulation mit EMGAPDH eine signifikant geringere Proliferationsrate aufwiesen, zeigten diese eine verstärkte Zellteilungsrate. Nach Stimulation mit EMGAPDH ist die Zellteilungsrate sowohl bei der mit EMGAPDH immunisierten Gruppe, als auch bei der nur mit Saponin behandelten Gruppe signifikant stärker als die der infizierten Kontrolltiere ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney U Test). Weiterhin resultierte auch die Stimulation der nicht infizierten, nicht immunisierten Kontrolltiere sowohl mit Gesamt - *E. multilocularis* - Antigen, als auch mit EMGAPDH in einer erhöhten Proliferation. Diese war jedoch signifikant geringer als bei den anderen Versuchsgruppen (Abb. 4.3.1b). Diese Ergebnisse sind unerwartet, zumal der einzige Unterschied zum 1. Tierversuch mit EMGAPDH in der verwendeten Eicharge bestand. Die Stimulation der Milzzellen erfolgte mit der gleichen Antigen-Charge wie im Tierversuch 1, mit welcher auch in beiden Versuchen die Immunisierung durchgeführt wurde. Diese Unterschiede zu Tierversuch 1 werden auch nach Normalisierung mit ConA deutlich (Abb. 3.2.1c). Im ersten Tierversuch zeigten nur die Zellen der nur mit Saponin behandelten Tiere eine



höhere Proliferationsrate nach Stimulierung mit EM-crude als mit ConA. Nach der Stimulierung mit EMGAPDH zeigen alle Gruppen eine deutlich geringere Proliferationsrate. Im zweiten Tierversuch proliferieren die Zellen aller Gruppen nach Stimulation mit EM-crude und EMGAPD allgemein stärker als im Tierversuch eins. Besonders deutlich wird dies bei den mit EMGAPDH immunisierten Tieren. Bei dieser Gruppe proliferieren die Zellen sowohl nach Stimulation mit EM-crude als auch nach Stimulation mit EMGAPDH stärker als nach Stimulation mit ConA, was bei dem Tierversuch eins nicht beobachtet werden konnte.

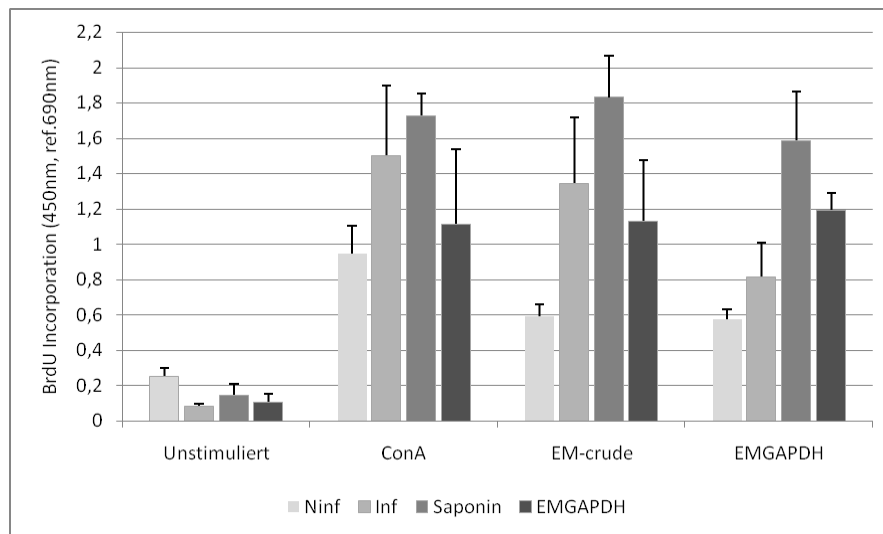


Abb. 4.3.1b Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Versuch 2 der Immunisierung mit EMGAPDH zum Sektionszeitpunkt. Dargestellt ist der Mittelwert aus je 6 Ansätzen (Pool der Milzzellen aller Tiere einer Versuchsgruppe) und die Standardabweichung.

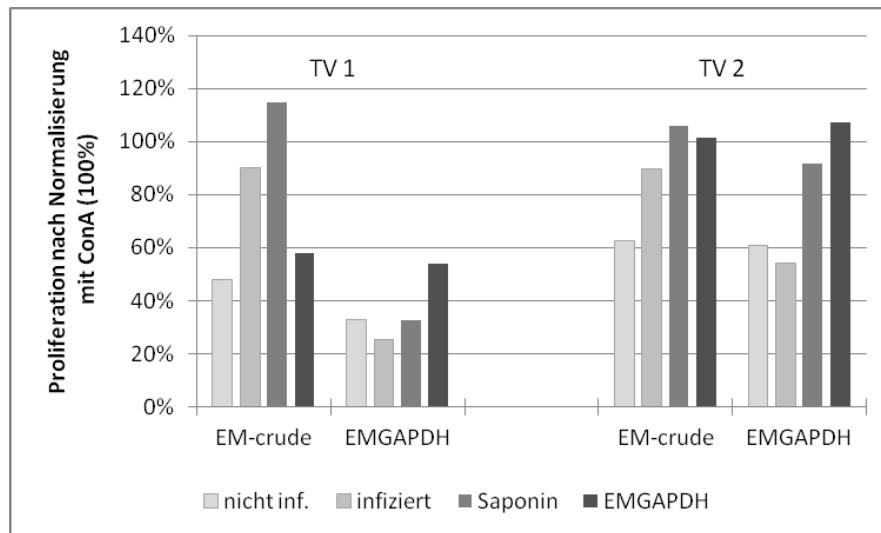


Abb. 4.3.1c Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus Versuch 1 (TV1) und 2 (TV2) nach Normalisierung mit den Werten der ConA-Stimulierung. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulierung mit Gesamt-EM-Antigen (EM-crude) und EMGAPDH der nicht infizierten und infizierten Versuchsgruppen und der mit EMGAPDH-immunisierten Tieren, sowie der nur mit dem Adjuvans Saponin behandelten Tiere in Prozent zu den ConA-stimulierten Milzzellen (100%) der einzelnen Gruppen.

#### 4.3.2 Bildung spezifischer Antikörper gegen EMGAPDH

Um eine Beteiligung der humoralen Immunantwort in Bezug auf die verwendeten Antigene zu klassifizieren, wurden die Sera der Mäuse auf Bildung von Antikörpern mittels ELISA getestet. Blut für die Serumgewinnung wurde am Vortag der Infektion mit *E. multilocularis* sowie zur Sektion entnommen. Die vorherrschenden Antikörper-Subklassen in beiden Immunisierungsstudien mit EMGAPDH, sowohl zum Zeitpunkt vor der Infektion, als auch zum Zeitpunkt der Sektion (nach 4wöchiger Infektionsdauer) gegen EMGAPDH waren IgG1 und IgG2a (Abb. 4.3.1a-i). IgG1 war zudem weitaus stärker ausgebildet als IgG2A (siehe Abb. 4.3.2a-d - Skalierung der Ordinate). Die Messung von Antikörpern der Subklasse IgG2b war nur im ersten Versuch vor der Infektion bei einem Tier signifikant höher als die der nicht immunisierten Kontrolltiere (Abb. 4.3.1e). IgG3 gegen EMGAPDH konnte zu keinem Zeitpunkt in keinen der untersuchten Seren nachgewiesen werden. Die Kontrollen bestanden aus einem Pool von Seren nicht infizierter und nicht immunisierter Tiere, sowie aus einem Pool von Seren infizierter Kontrolltiere (zum Zeitpunkt der Sektion). Bei letzterer Gruppe waren die im ELISA gemessenen OD-Werte stets auf dem Niveau der naiven Kontrolltiere und somit konnte keine IgG Antikörper-Produktion gegen EMGAPDH festgestellt werden. Da die Affinität (oder Fluoreszenzfähigkeit) der kommerziellen Antikörper je nach Charge und Lagerungszeit erfahrungsgemäß variiert, wurde zu den Messungen zum Zeitpunkt der Sektion jeweils ein Pool von Seren der gleichen Tiere zum Zeitpunkt vor der Infektion gemessen. Bis auf die

Messung der Subklasse IgG2A im Versuch 1 (Abb. 4.3.2d), entsprachen die erhaltenen Werte zum Sektionszeitpunkt denen vor der Infektion.

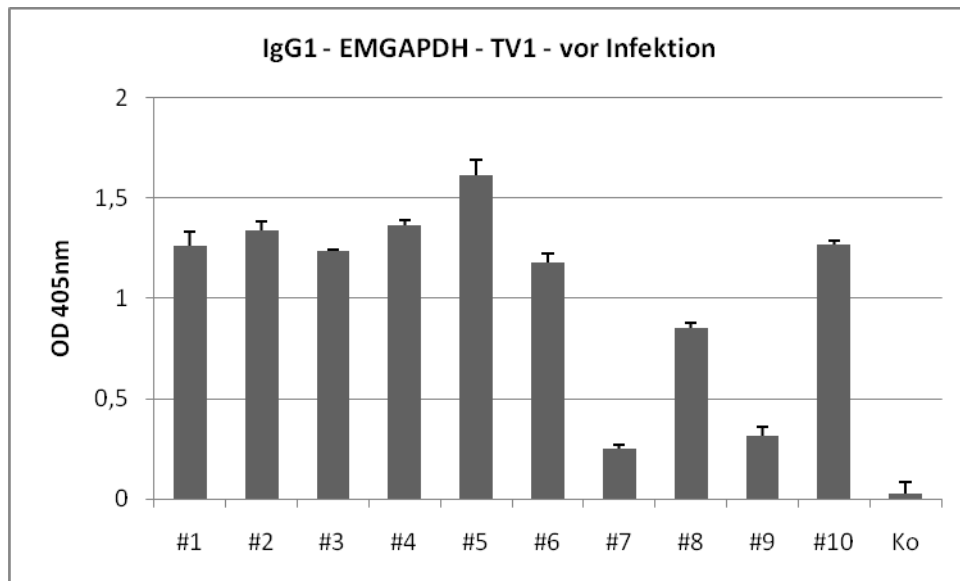


Abb. 4.3.2a EMGAPDH spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Tiere im Versuch 1 vor der Infektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).

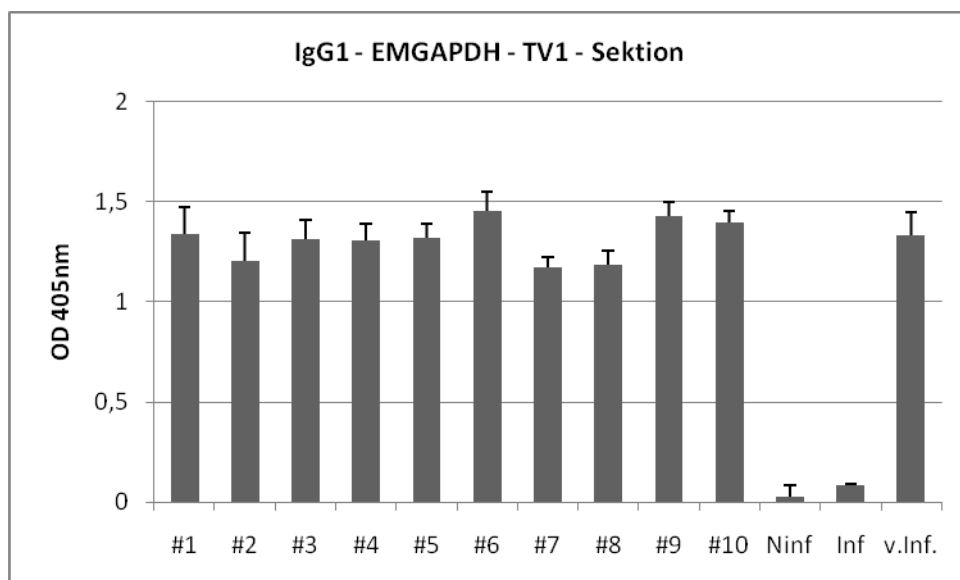


Abb. 4.3.2b EMGAPDH spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Tiere im Versuch 1 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren der immunisierten Tiere 1-5 vor der Infektion (v.Inf.; Abb. 4.3.2a).

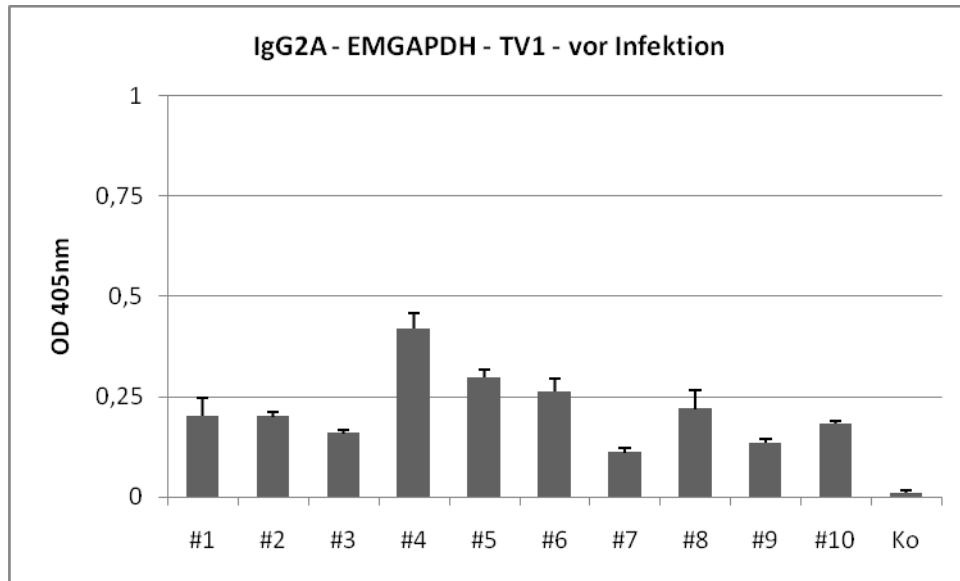


Abb. 4.3.2c EMGAPDH spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Tiere im Versuch 1 vor der Infektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).

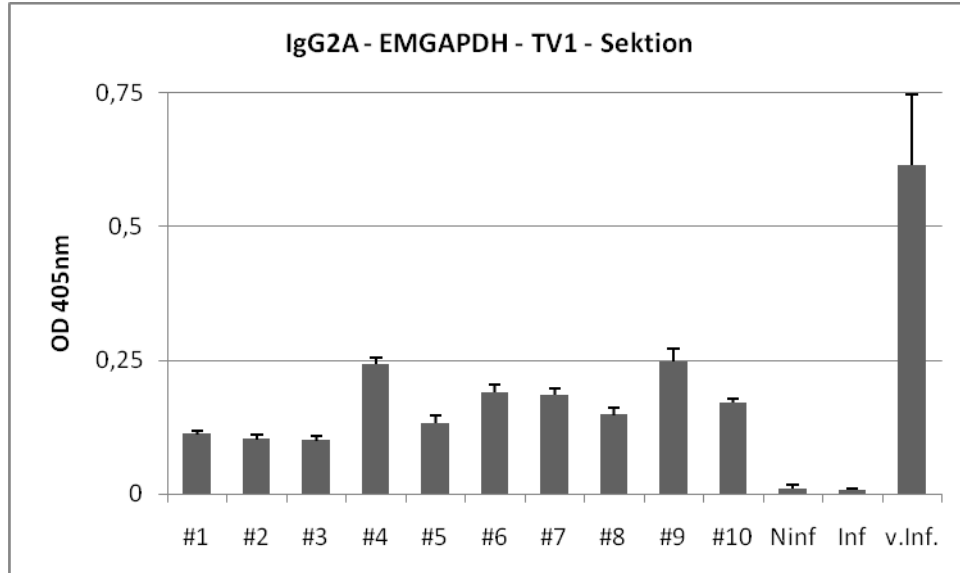


Abb. 4.3.2d EMGAPDH spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Tiere im Versuch 1 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren der immunisierten Tiere 1-5 vor der Infektion (v.Inf.; Abb. 4.3.2c),

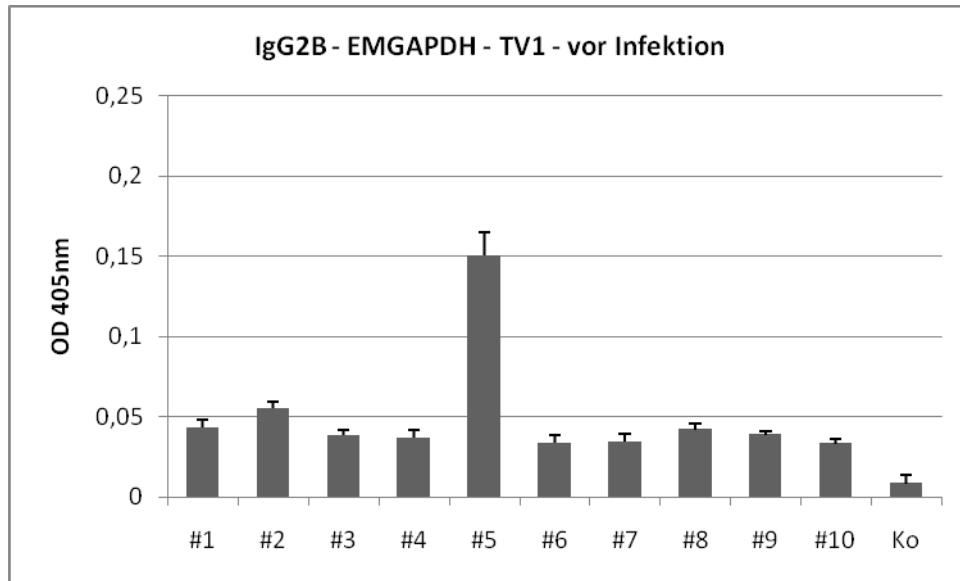


Abb. 4.3.2e EMGAPDH spezifischer IgG2b Subklassen-ELISA. Dargestellt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Versuchsgruppe im Versuch 1, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).

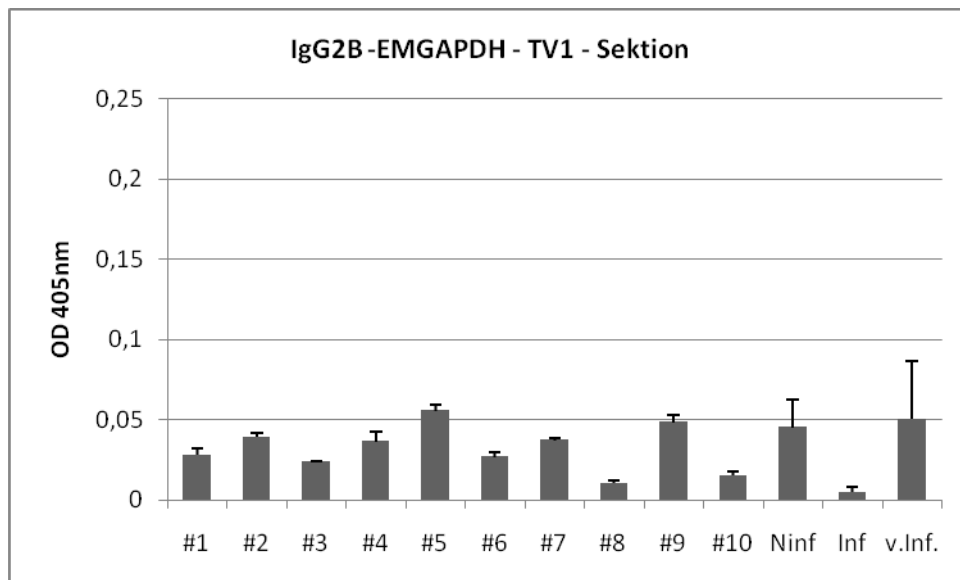


Abb. 4.3.2d EMGAPDH spezifischer IgG2B Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren(4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Tiere im Versuch 1 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), ein Pool von 4 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren von den immunisierten Tieren 1-10 vor der Infektion (v.Inf.; Abb. 4.3.2e),

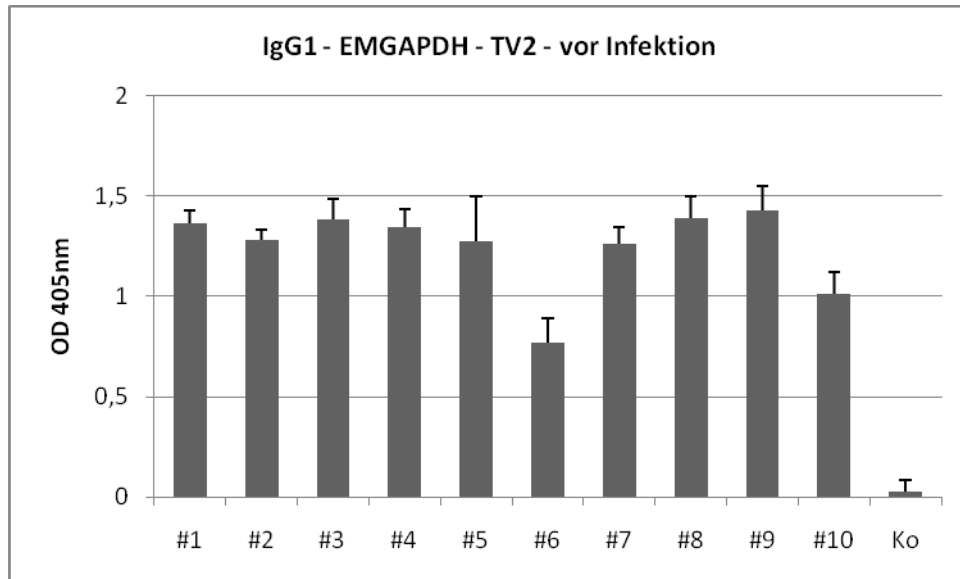


Abb. 4.3.2f EMGAPDH spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Tiere im Versuch 2 vor der Infektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).

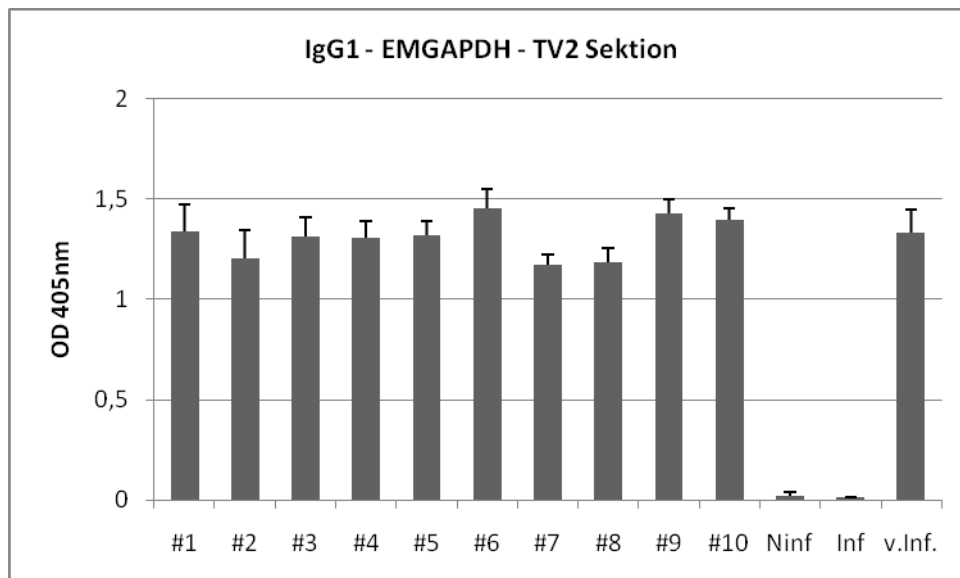


Abb. 4.3.2g EMGAPDH spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Tiere im Versuch 2 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren der immunisierten Tiere 1-5 vor der Infektion (v.Inf.; Abb. 4.3.2f).

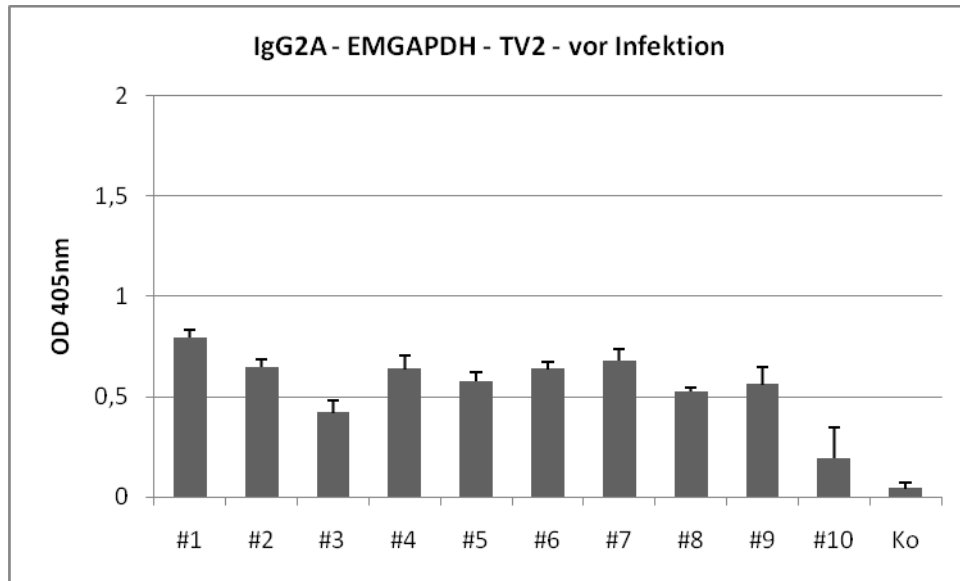


Abb. 4.3.2h EMGAPDH spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Tiere im Versuch 2 vor der Infektion, sowie ein Pool von 4 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).

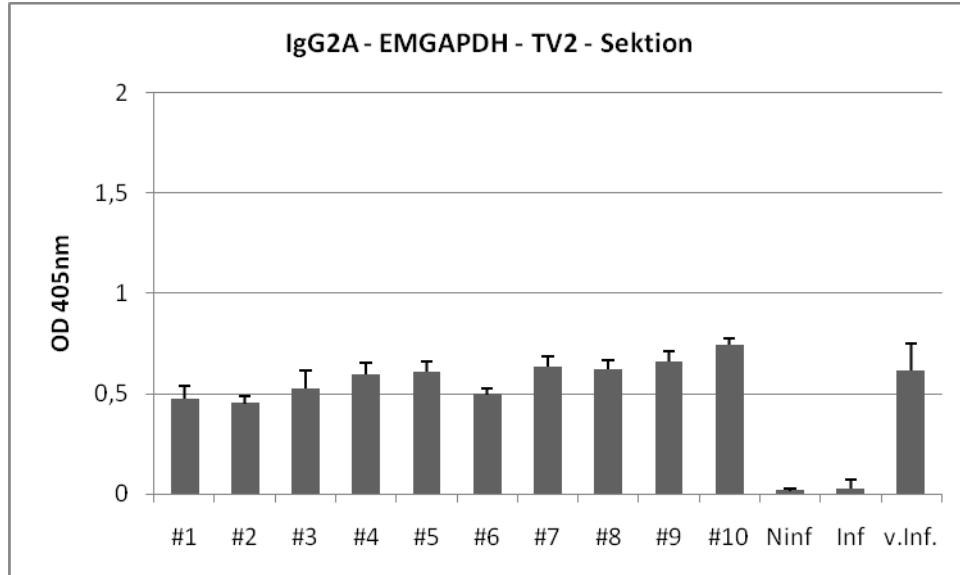


Abb. 4.3.2i EMGAPDH spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren(4 Messungen) der mit EMGAPDH immunisierten Tiere im Versuch 2 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), und ein Pool von 4 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren der immunisierten Tieren 1-5 vor der Infektion (v.Inf; Abb. 4.3.2g),

#### 4.4 Immunisierungsstudien mit dem rekombinanten Antigen EM95

Die Immunisierungsstudien mit EM95 verliefen analog zu den Versuchen mit EMGAPDH (Abb. 4.4a). Um die Anzahl der verwendeten Kontroll-Tiere gering zu halten, wurden die Versuche parallel zu den Immunisierungen mit EMGAPDH durchgeführt. Die Immunisierung erfolgte mit 20µg EM95 in Kombination mit 50µg Saponin in einem Volumen von 200µl, verteilt an zwei lateralen Stellen im Rückenbereich. Die Gruppengröße der Versuchstiere (6 Wochen alte BALB/c-Mäuse) war mit denen der EMGAPDH-Studie identisch (n=10).

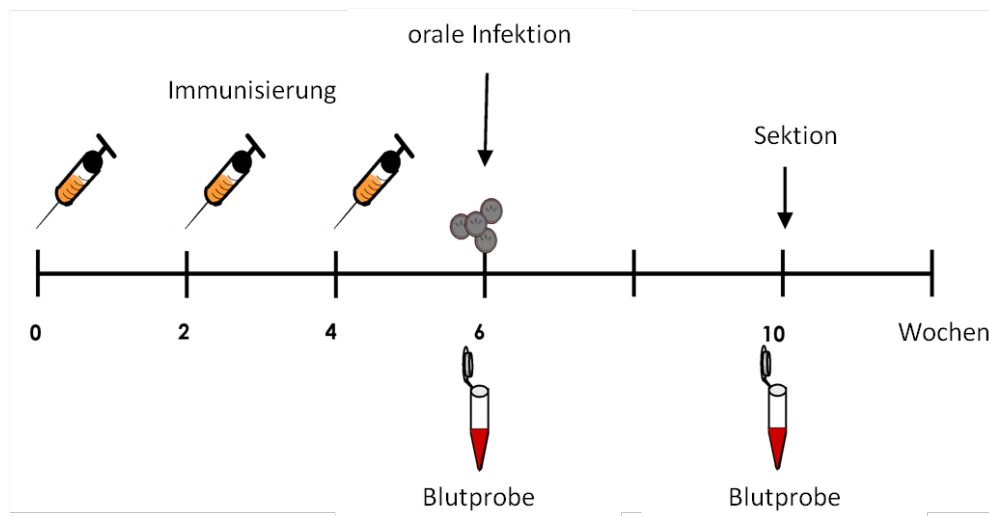


Abb. 4.4a Schema der Antigenimmunisierung

Die Immunisierung mit EM95 ergab in beiden Versuchsreihen eine hochsignifikante Herabsetzung ( $p = 0,0002$  bzw.  $p = 0,00002$ , Mann-Whitney U Test) der Parasitenlast. Im Vergleich zu nicht immunisierten Tieren wurde eine Verringerung der Läsionen um 96,9% bzw. 98,4% erzielt. In beiden Versuchen konnte bei je 6 Tieren ein vollkommener Schutz (Null Zysten) ausgebildet werden (Abb. 4.4a und b). Da bei diesen Versuchen die Kontrollgruppen parallel zu den EMGAPDH-Immunisierungen geführt wurden, waren die Ergebnisse hinsichtlich der Kontrollapplikation mit Saponin gleich (keine Herabsetzung der Parasitenbürde im ersten Versuch, signifikant weniger Läsionen im zweiten Versuch).

Vergleicht man die mit den Antigenen immunisierten Gruppen untereinander, stellt man einen deutlichen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen fest. Die mit EM95 immunisierten Tiere zeigen in den durchgeführten Studien signifikant weniger Läsionen als die mit EMGAPDH behandelten ( $p = 0,0022$  bzw.  $p = 0,0012$ , Mann-Whitney U Test).



Tabelle 4.4a. Übersicht der Versuchsgruppen von Immunisierungsstudie 1 mit EM95

| Versuchsgruppe                      | EM95                | Saponin        | Kontrolle       |
|-------------------------------------|---------------------|----------------|-----------------|
| Applikation (s.c.)                  | 6HIS-EM95 + Saponin | Saponin        | PBS             |
| Infektionsdosis                     | 4000 Eier           | 4000 Eier      | 4000 Eier       |
| Überlebende Tiere                   | 10/10               | 10/10          | 10/10           |
| Metazestoden $\bar{x} \pm SD$       | 0,7 $\pm$ 1,1       | 16,5 $\pm$ 6,5 | 22,9 $\pm$ 16,7 |
| Maximale/minimale Anzahl der Zysten | 3/0                 | 29/8           | 51/2            |

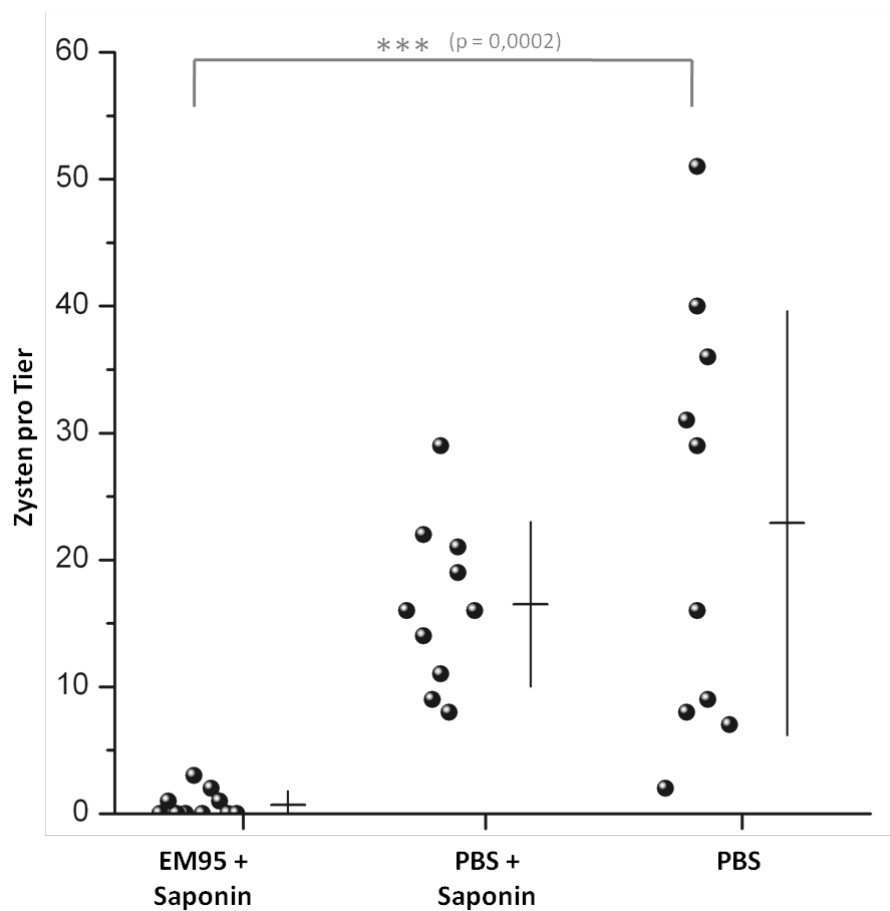


Abb. 4.4a Immunisierungsstudie 1 mit dem rekombinanten Antigen EM95. Abgebildet sind die Leber-Läsionen (Zysten pro Tier) nach oraler Belastungsinfektion, sowie die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Tabelle 4.4b Übersicht der Versuchsgruppen von Immunisierungsstudie 2 mit EM95

| Versuchsgruppe                | EM95                | Saponin       | Kontrolle       |
|-------------------------------|---------------------|---------------|-----------------|
| Applikation (s.c.)            | 6HIS-EM95 + Saponin | Saponin       | PBS             |
| Infektionsdosis               | 4500 Eier           | 4500 Eier     | 4500 Eier       |
| Überlebende Tiere             | 10/10               | 10/10         | 15/15           |
| Metazestoden $\bar{x} \pm SD$ | 0,4 $\pm$ 0,5       | 4,3 $\pm$ 3,3 | 24,5 $\pm$ 19,2 |
| Minimum/Maximum               | 1/0                 | 8/0           | 64/6            |

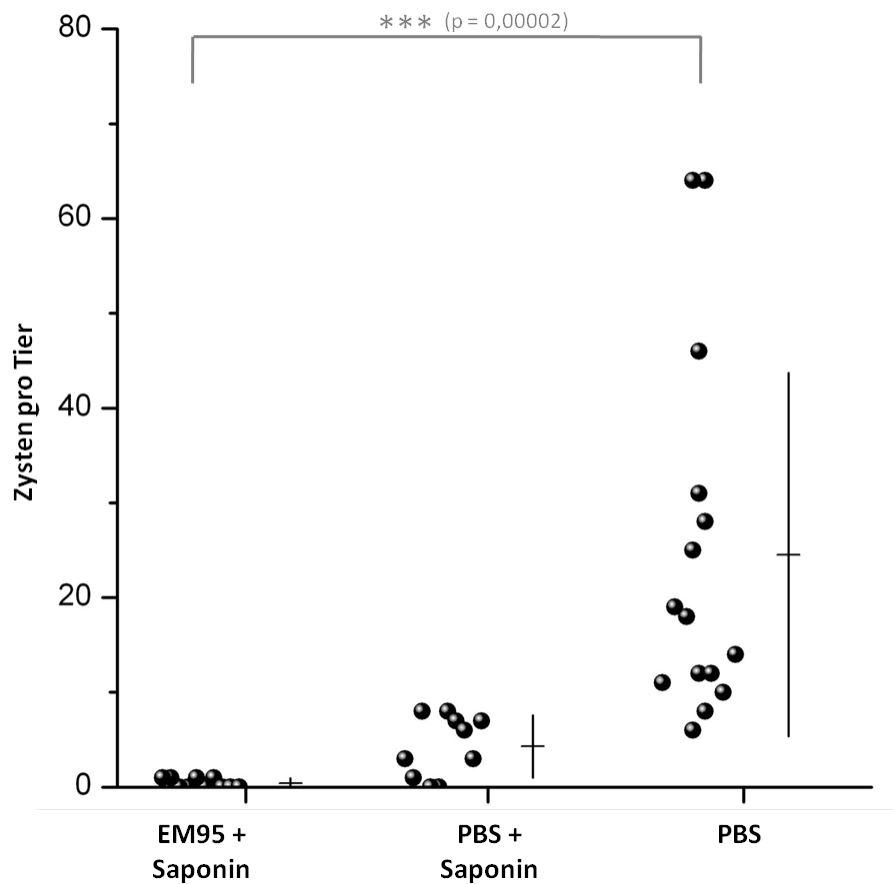


Abb. 4.4b Immunisierungsstudie 2 mit dem rekombinanten Antigen EM95. Abgebildet sind die Leberläsionen (Zysten pro Tier) nach oraler Belastungsinfektion, sowie die Mittelwerte mit Standardabweichung.

#### 4.4.1 Milzzellproliferationen nach subkutaner Immunisierung mit EM95

##### Milzzellproliferation nach Immunisierung mit EM95 in Studie 1

Nach ConA-Stimulation unterscheiden sich die nicht immunisierten Tiere im Vergleich mit den mit EM95 immunisierten Tieren signifikant ( $p = 0,037$ , Mann-Whitney U Test) in der Proliferation. Nach Stimulation mit *E. multilocularis* – Gesamtantigen (EM-crude) zeigten die nicht immunisierten, infizierten Tiere im Mittel eine annähernd zweifach verstärkte Zellteilungsrate im Vergleich zu den mit EM95 vakzinieren Tieren. Ebenfalls eine signifikant erhöhte Milzzellproliferation der infizierten Kontrolltiere konnte nach Stimulation mit dem zur Immunisierung verwendeten Antigen EM95 festgestellt werden. Die Milzzellen von Mäusen, welche nur mit Saponin behandelt wurden zeigten weder nach Stimulation mit EM-crude, noch nach Stimulation mit EM95 signifikante Unterschiede in der Proliferation zu den mit EM95 und Saponin immunisierten Tieren. Milzzellen von nicht infizierten, nicht immunisierten Kontrollgruppen reagierten nach Stimulation mit Gesamtantigen nur schwach. Ebenfalls konnte bei dieser Kontrollgruppe nach Stimulation mit EM95 keine Unterschiede zu den unstimulierten, nur im Kulturmedium befindlichen Zellen festgestellt werden (Abb. 4.4.1a). Dieses wird insbesondere nach Normalisierung nach Stimulierung mit ConA deutlich (Abb. 4.4.1c).

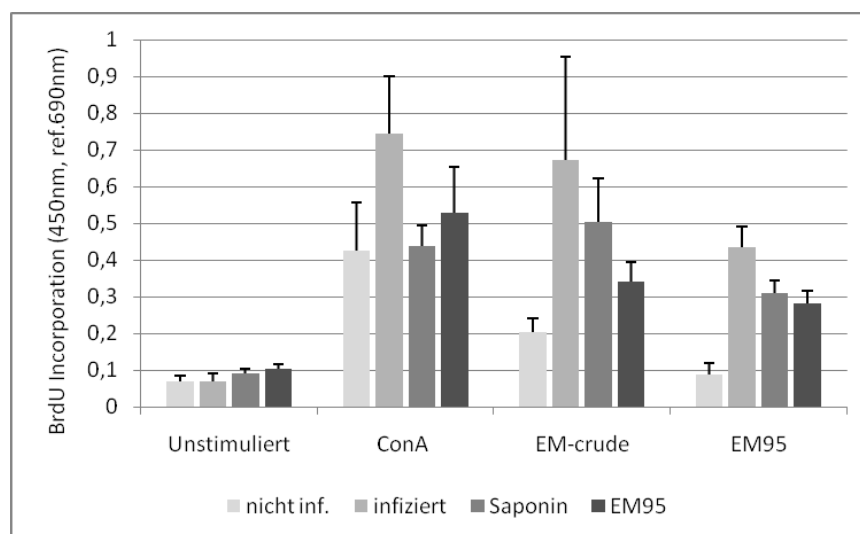


Abb. 4.4.1a Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Versuch 1 der Immunisierung mit EM95 zum Sektionszeitpunkt. Dargestellt sind der Mittelwert aus je 6 Ansätzen (Pool der Milzzellen aller Tiere einer Versuchsgruppe) und die Standardabweichung.

## Milzellproliferation nach Immunisierung mit EM95 in Studie 2

Analog zu der Milzellproliferation des ersten Immunisierungsversuches mit EM95 zeigen die einzelnen Versuchsgruppen keine Unterschiede nach Anregung durch ConA. Nach Stimulation mit Gesamt – *E. multilocularis* Antigen weist die nicht immunisierte, infizierte Gruppe, wie auch die mit Saponin behandelte Gruppe eine signifikant erhöhte Zellteilungsrate gegenüber der mit EM95 immunisierten Gruppe auf. Jedoch konnte durch die Stimulation mit dem zur Vakzinierung eingesetzten EM95 kein Unterschied in Bezug auf die Proliferationsrate zwischen den immunisierten und nicht immunisierten bzw. nur mit Saponin behandelten Versuchsgruppen festgestellt werden. Milzzellen von nicht infizierten, nicht immunisierten Kontrollgruppen reagierten sowohl auf die Stimulation mit Gesamtantigen, als auch auf Stimulation mit EM95 nur schwach (Abb. 4.4.1b).

Durch die Immunisierung mit EM95 kann somit eine deutlich verminderte Proliferationsfähigkeit der Milzzellen nach Stimulation mit Gesamt- *E. multilocularis* – Antigen festgestellt werden. Dass diese Unterschiede der Proliferationsfähigkeit auf die Immunisierung und nicht auf die jeweilige Stimulation zurückzuführen ist, wird nach der Normalisierung mit den ConA-stimulierten Milzzellen deutlich (Abb. 4.4.1c).

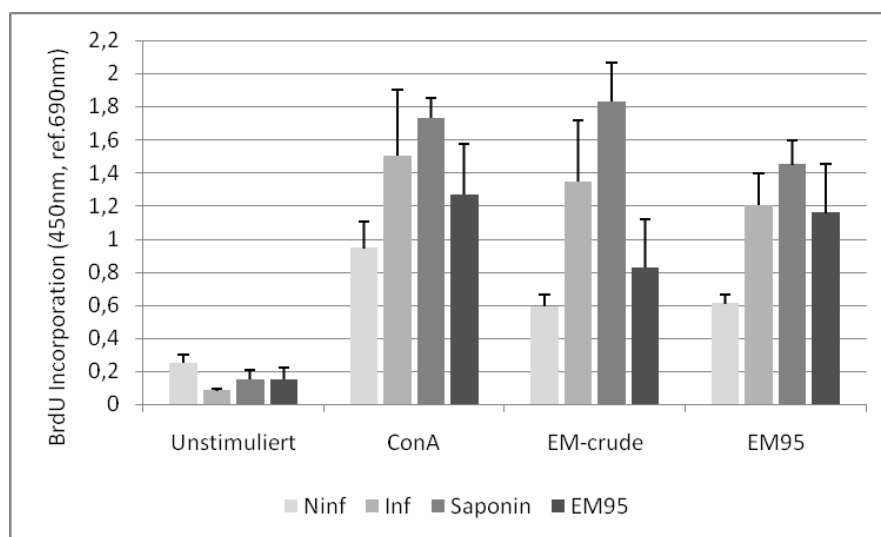


Abb. 4.4.1b Proliferation von Milzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Versuch 2 der Immunisierung mit EM95 zum Sektionszeitpunkt. Dargestellt ist der Mittelwert aus je 6 Ansätzen (Pool der Milzzellen aller Tiere einer Versuchsgruppe) und die Standardabweichung.

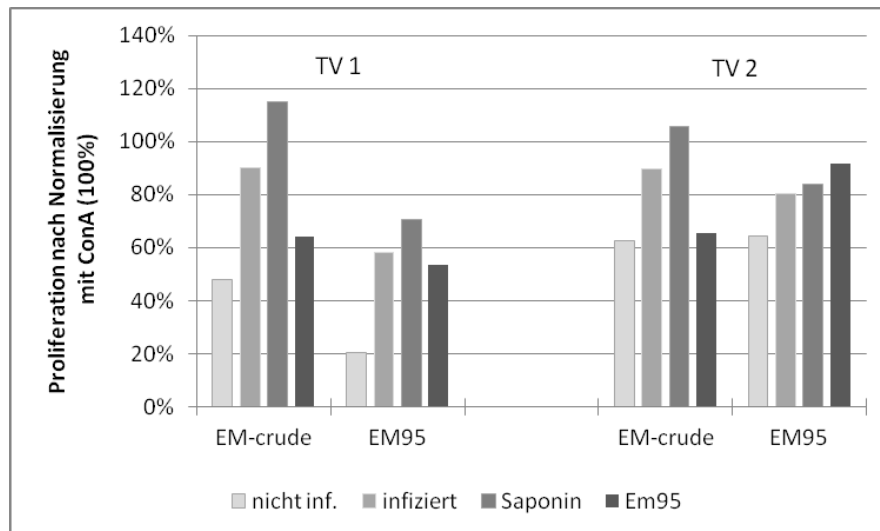


Abb. 4.3.1c Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus Versuch 1 (TV1) und 2 (TV2) nach Normalisierung mit den Werten der ConA-Stimulierung. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulierung mit Gesamt-EM-Antigen (EM-crude) und EM95 der nicht infizierten und infizierten Versuchsgruppen und der mit EM95-immunisierten Tieren, sowie der nur mit dem Adjuvans Saponin behandelten Tiere in Prozent zu den ConA-stimulierten Milzzellen (100%) der einzelnen Gruppen

#### 4.4.2 Bildung spezifischer Antikörper gegen EM95

Die Immunisierung mit EM95 resultierte in beiden Versuchen in einem hohen EM95-spezifischen IgG Antikörper-Titer. Die gebildeten Antikörper lassen sich, sowohl vor der Infektion, als auch zum Zeitpunkt der Sektion, vorwiegend den Subklassen IgG1 und IgG2a zuordnen (Abb. 4.4.2a – d, g – j). Bei allen Tieren konnten auch gering erhöhte IgG2b-Werte festgestellt werden (Abb. 4.4.2e und k). Da die Seren der immunisierten Tiere des Versuchs 2 aufgrund eines Defekts des Kühlschranks nicht mehr zu verwenden waren, kann zu dem IgG2B und IgG3 – Level zum Sektionszeitpunkt keine Aussage getroffen werden. Mäuse, welche keine Läsionen aufwiesen (kompletter Schutz), zeigten keine erkennbaren Unterschiede in der Antikörperbildung als Tiere, die trotz der Immunisierung wenige Läsionen ausbildeten. Keines der Tiere zeigte eine signifikant erhöhte IgG3 Antikörperbildung gegenüber den nicht infizierten Kontrolltieren (Abb. 4.4.2d, dargestellt nur Ergebnisse des Versuchs 1). Die auffallend abweichende Höhe der Extinktionswerte des ELISA im ersten und zweiten Tierversuch sind auf die verwendeten Sekundärantikörper (Benutzung einer neuen Charge im zweiten Versuch) und die damit verbundenen kürzeren Inkubationszeiten zurückzuführen. Somit kann auch hier eine vergleichende Quantifizierung der gebildeten Antikörper nur innerhalb eines Versuchs erfolgen.

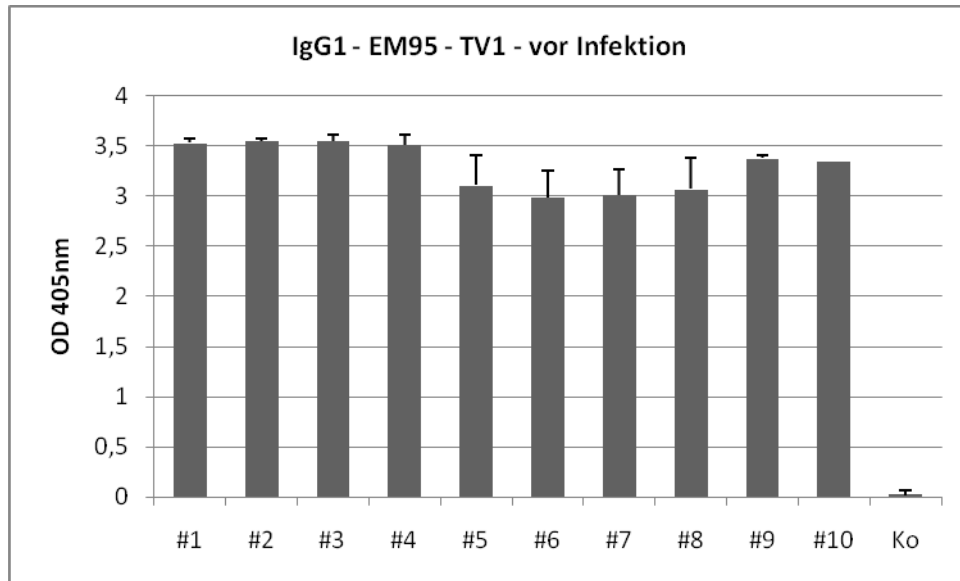


Abb. 4.4.2a EM95 spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 1 vor der Infektion, sowie ein Pool von 8 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).

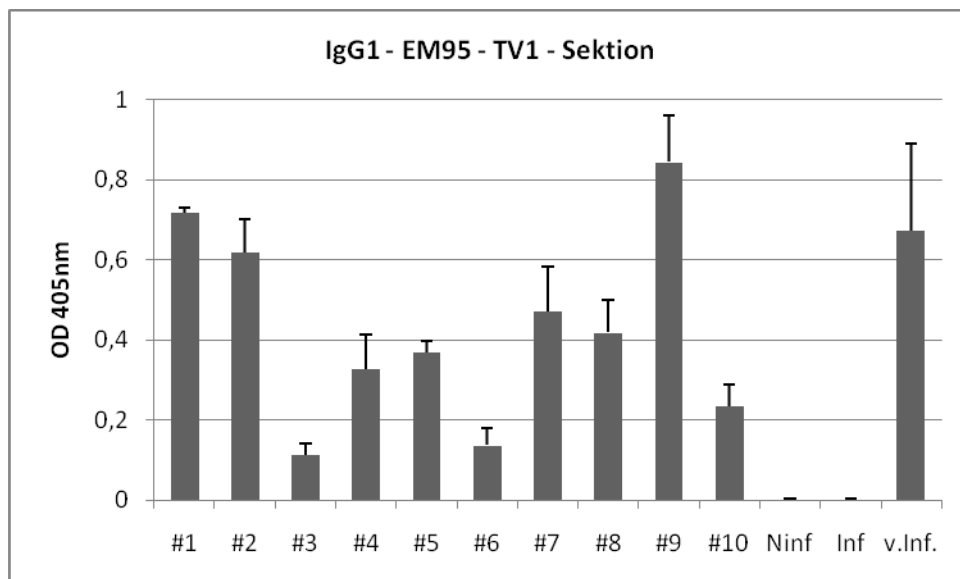


Abb. 4.4.2b EM95 spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (je 4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 1 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 4 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), ein Pool von 10 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren von den immunisierten Tieren 1-5 vor der Infektion (v.Inf; Abb. 4.4.2a),

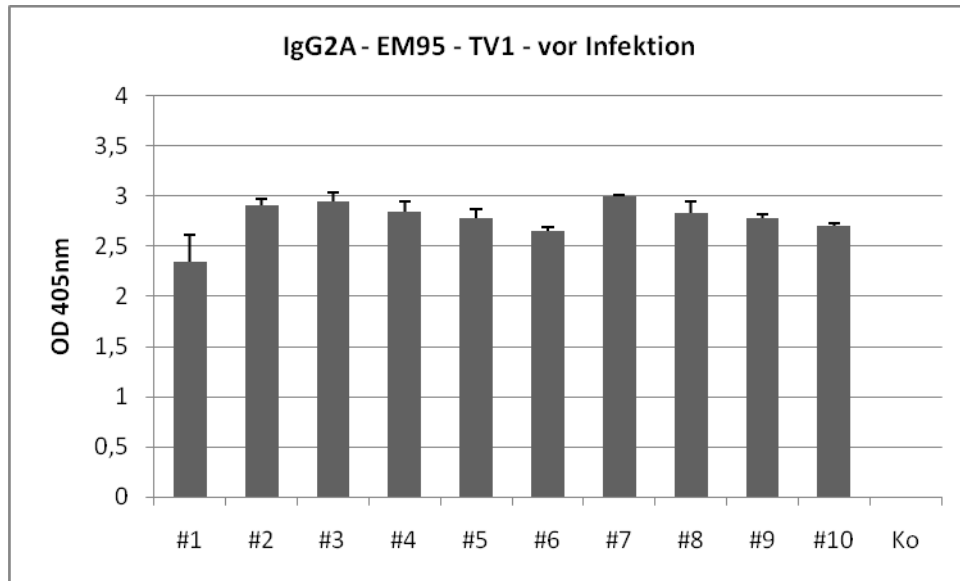


Abb. 4.4.2c EM95 spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 1 vor der Infektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).

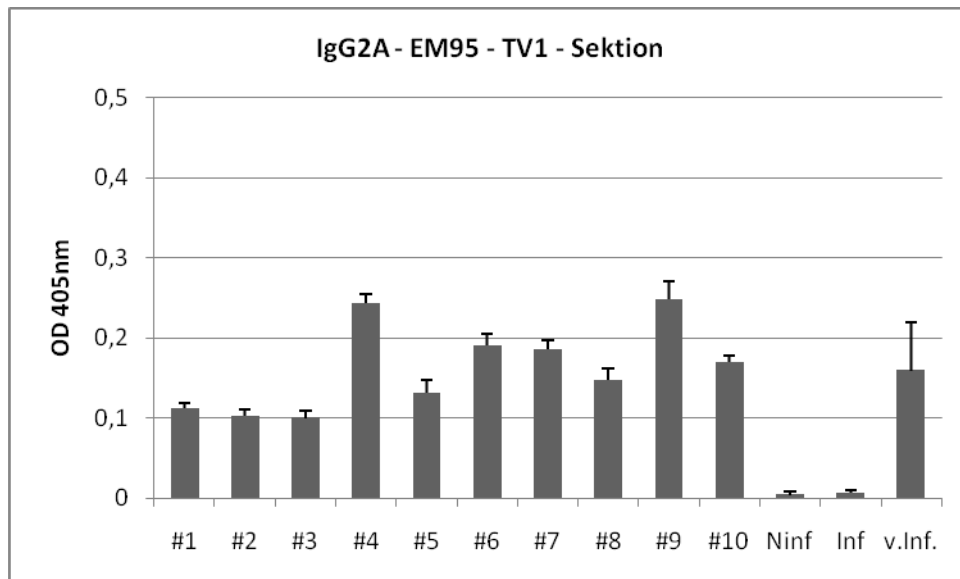


Abb. 4.4.2d EM95 spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren(4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 1 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), ein Pool von 10 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren der Tiere 1-5 vor der Infektion (v.Inf; Abb. 4.4.2c),

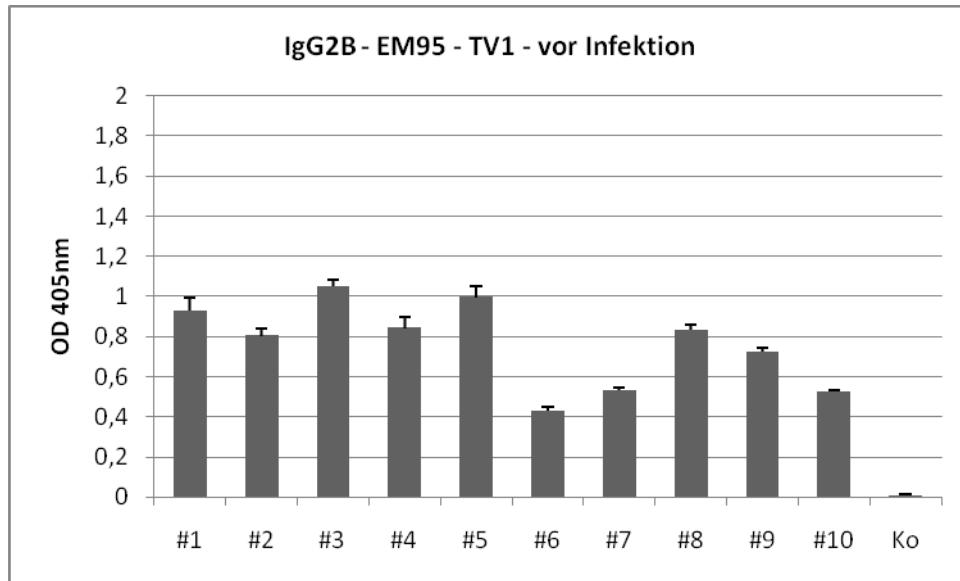


Abb. 4.4.2e EM95 spezifischer IgG2B Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 1 vor der Infektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).

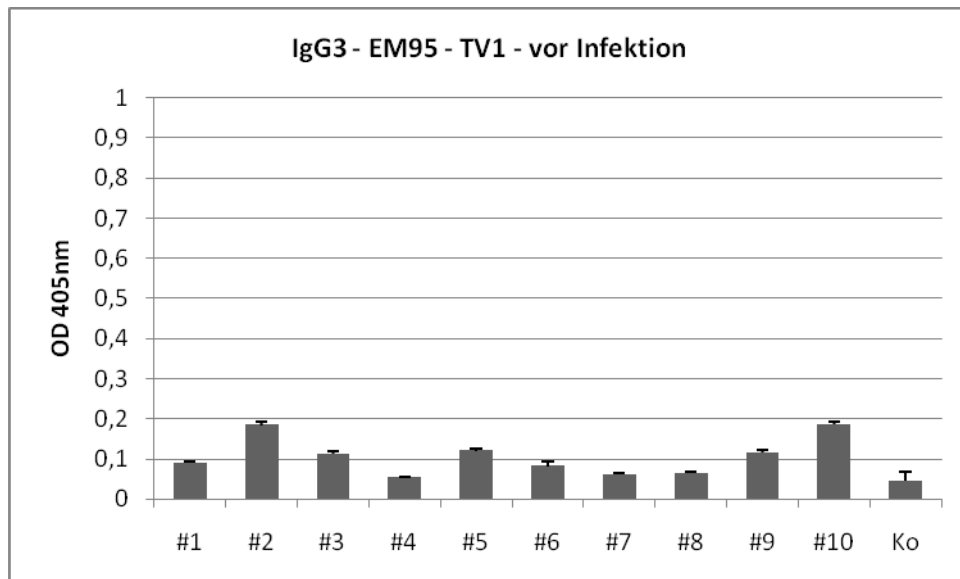


Abb. 4.4.2f EM95 spezifischer IgG3 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 1 vor der Infektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).



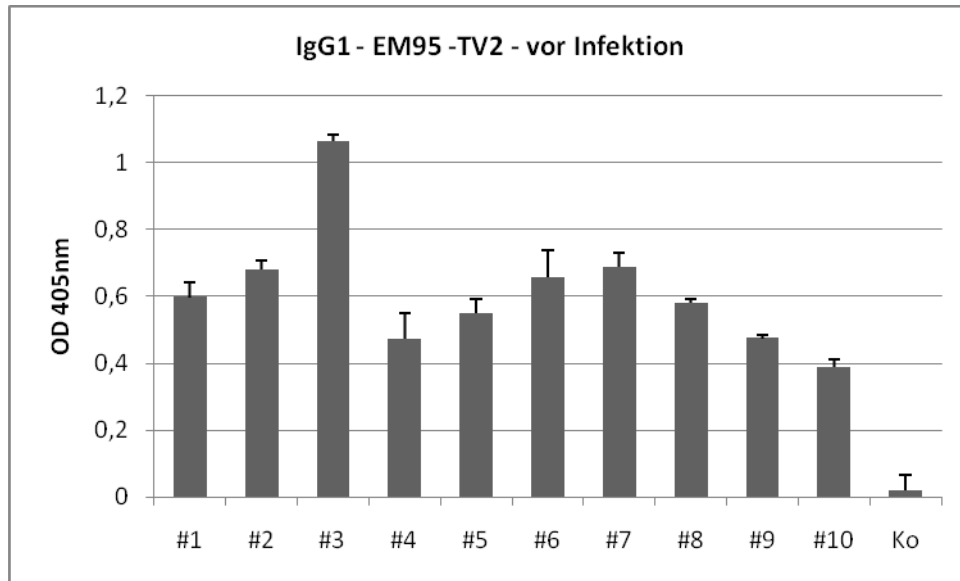


Abb. 4.4.2g EM95 spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 2 vor der Infektion, sowie ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter Kontroll-Tiere (Ko).

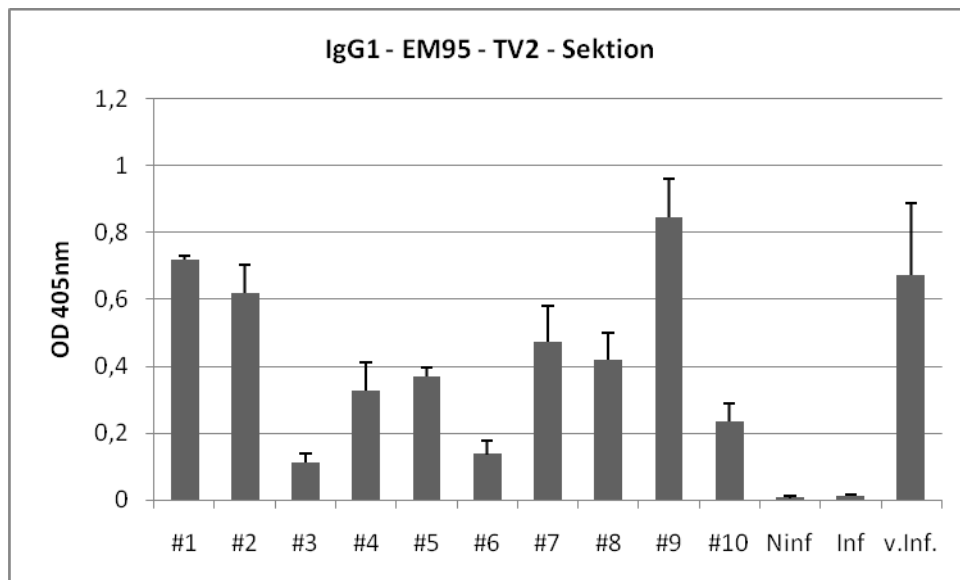


Abb. 4.4.2h EM95 spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren(4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 2 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 4 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), ein Pool von 8 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren von den Tieren 1-5 vor der Infektion (v.Inf; Abb. 4.4.2c).

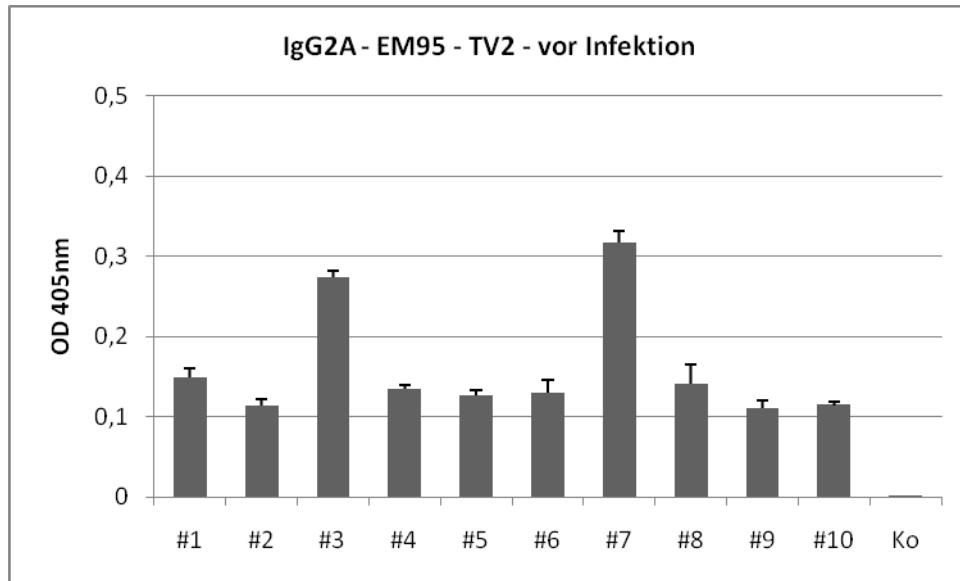


Abb. 4.4.2i EM95 spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren (4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 2 vor der Infektion, sowie ein Pool von 4 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf).

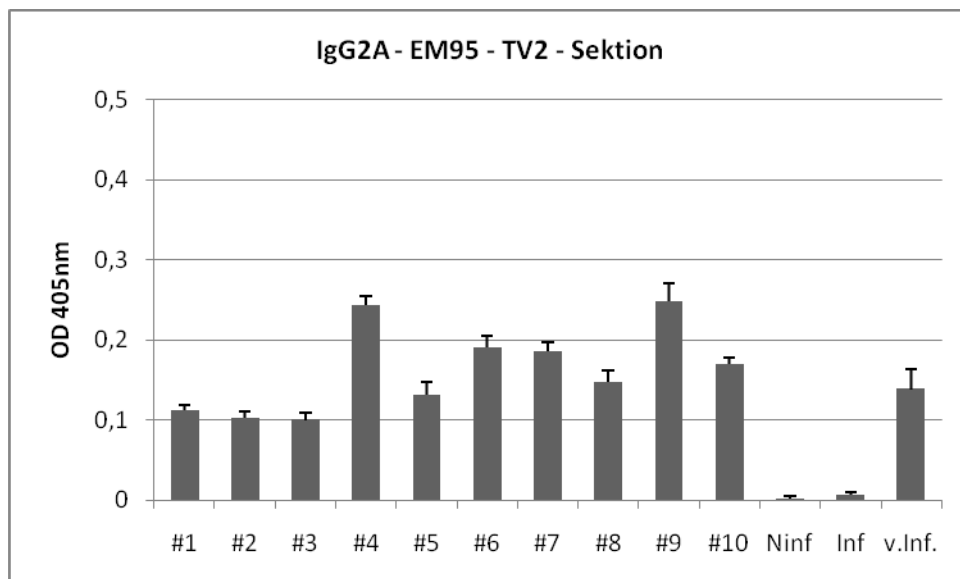


Abb. 4.4.2j EM95 spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren(4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 2 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 4 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren von den Tieren 1-5 vor der Infektion (v.Inf; Abb. 4.4.2e).

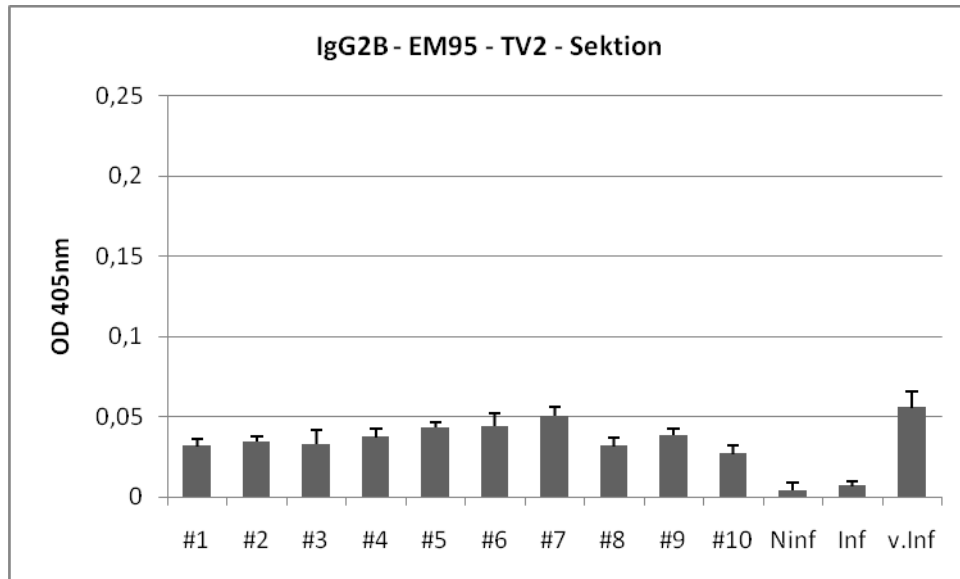


Abb 4.4.2k EM95 spezifischer IgG2B Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte individueller Seren(4 Messungen) der mit EM95 immunisierten Tiere im Versuch 2 zum Zeitpunkt der Sektion, sowie ein Pool von 4 Seren nicht immunisierter Tiere (Ninf), ein Pool von 5 Seren nicht immunisierter, infizierter Tiere mit jeweils über 10 Läsionen (Inf) und ein Pool der Seren von den Tieren 1-4 vor der Infektion (v.Inf; Abb. 4.4.2e).

#### 4.5 Individualisierte Darstellung der Läsionen in den Immunisierungsstudien mit EM95 und EMGAPDH

Tab. 4.5a Läsionen der einzelnen Versuchstiere in der jeweils ersten Immunisierungsstudie

|     | Inf. Ko.  | Saponin  | EM95    | EMGAPDH |
|-----|-----------|----------|---------|---------|
| #1  | 9         | 29       | 0       | 5       |
| #2  | 8         | 11       | 3       | 4       |
| #3  | 29        | 14       | 2       | 2       |
| #4  | 36        | 22       | 0       | 18      |
| #5  | 16        | 8        | 1       | 3       |
| #6  | 51        | 19       | 0       | 7       |
| #7  | 40        | 21       | 0       | 1       |
| #8  | 31        | 9        | 1       | 9       |
| #9  | 7         | 16       | 0       | 1       |
| #10 | 2         | 16       | 0       | 4       |
| MW  | 22,9±16,7 | 16,5±6,5 | 0,7±1,1 | 5,4±5,1 |

Tab. 4.5b Läsionen der einzelnen Versuchstiere in der jeweils zweiten Immunisierungsstudie

|     | Inf. Ko.  | Saponin | EM95    | EMGAPDH |
|-----|-----------|---------|---------|---------|
| #1  | 31        | 8       | 0       | 8       |
| #2  | 12        | 0       | 1       | 2       |
| #3  | 8         | 7       | 1       | 1       |
| #4  | 18        | 0       | 0       | 2       |
| #5  | 12        | 6       | 0       | 3       |
| #6  | 64        | 8       | 0       | 10      |
| #7  | 46        | 3       | 0       | 3       |
| #8  | 19        | 1       | 1       | 0       |
| #9  | 10        | 7       | 0       | 1       |
| #10 | 11        | 3       | 1       | 4       |
| #11 | 14        | -       | -       | -       |
| #12 | 28        | -       | -       | -       |
| #13 | 6         | -       | -       | -       |
| #14 | 64        | -       | -       | -       |
| #15 | 25        | -       | -       | -       |
| MW  | 24,5±19,2 | 4,3±3,3 | 0,4±0,5 | 3,4±3,2 |

#### 4.6 mRNA-Expression der Zytokine TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-10 in den Milzzellen

Die Quantifizierung von Zytokinexpressionen in Milzzellen erfolgte bei den bisherigen Arbeiten zu diesem Thema mittels eines Zytokin-ELISAs, indem Milzzellkulturüberstände nach mehrtägiger Kultivierung der Zellen verwendet wurden (vgl. Milzzellproliferation). Die hierbei gemessenen Zytokinmuster entsprechen jedoch, aufgrund der indirekten Antigenstimulation und dem intensiven Umgang mit den Milzzellen (unkontrollierte Einflüsse wie zentrifugieren, kühlen etc.), nicht den realen Bedingungen *in vivo*. Daher war die Etablierung einer quantitativen real-time PCR zur Messung der Expression der mRNA eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit.

Die Expression von Zytokinen in den Milzzellen zum Sektionszeitpunkt wurde mittels RTq-PCR (Real-time quantitative PCR) ermittelt. Dazu wurde die RNA aus Milzzellen von den Versuchstieren 1 - 5 bzw. 6 pro Versuchsgruppe isoliert und in cDNA umgeschrieben. Von jedem Versuchstier wurde die erhaltene cDNA (jeweils als Duplets) im Lightcycler mit den entsprechenden Zytokin-Primern amplifiziert und die jeweiligen Cp-Werte (beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt) gemessen. Eine anschließende Schmelzkurven-Analyse ermöglichte eine Unterscheidung von gewünschtem Amplifikaten und Primer-Dimeren (4.5.1). Zur Konstruktion der Standards (4.5.2) wurden die zu amplifizierenden Gen-Fragmente in einen p-Drive-Vektor (Quiagen) kloniert und in den Bakterienstamm DH5 $\alpha$  transformiert. Eine Sequenzierung bestätigte die erfolgreiche Insertion. Zur Generierung der Standards wurden die Plasmide extrahiert, die Konzentration nach photometrischer Messung berechnet und eine Verdünnungsreihe von  $10^3$  bis  $10^9$  Kopien/ $\mu$ l hergestellt (vgl. 3.4.3). Alle Standards wurden separat gemessen und als externe Reihe gespeichert. Somit konnte bei jeder Zytokin-Messung auf einen internen Standard verzichtet werden. Die Auswertung erfolgte mittels relativer Quantifizierung, bei der die Verhältnisse von Zielgen (Zytokin) und Referenzgen (Haushaltsgen –  $\beta$ -actin) in Bezug zu der nicht infizierten Kontrollgruppe gestellt werden. Für diese Berechnung und die nötige statistische Analyse wurde die Software REST09 (Relative Expression Software Tool 2008; © Corbett Research an M. Pfaffl; TU München) verwendet.

## 4.6.1 Schmelzkurven-Analyse

 $\beta$ -actin

Das gewählte Fragment hatte eine Länge von 148bp. Die Schmelzkurvenanalyse der Fragmente ergab eine Schmelztemperatur von  $83,9^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,08^{\circ}\text{C}$ ). Primerdimerisation wurde bei  $75,5^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$ ) detektiert (Abb. 4.6.1a).

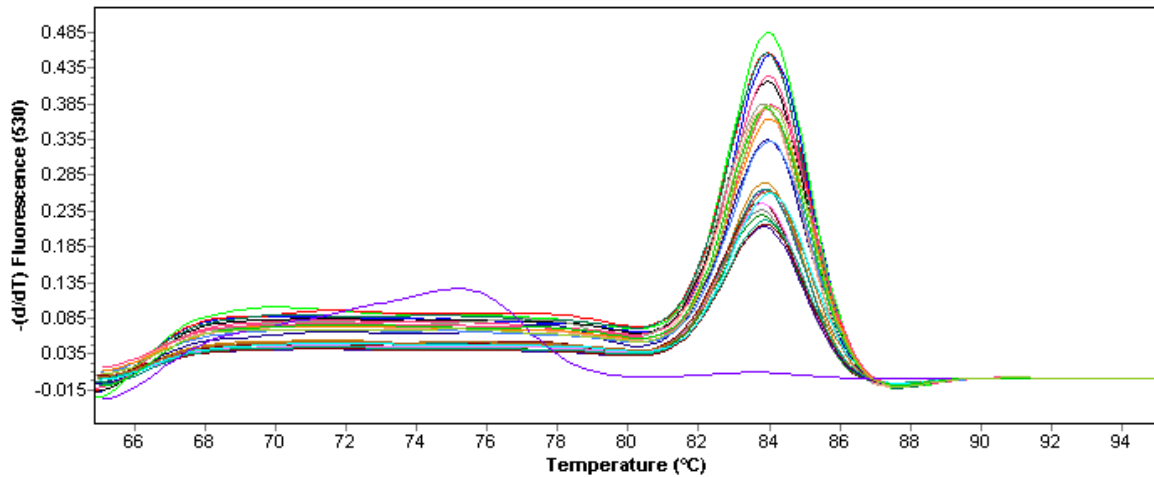


Abb. 4.6.1a Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse von  $\beta$ -actin. Der erste Peak ( $75,5^{\circ}\text{C}$ ) zeigt die Primer-Dimerisation der Negativ-Kontrolle.

IFN- $\gamma$ 

Das Fragment hatte eine Länge von 92bp. Die Schmelzkurvenanalyse der IFN $\gamma$ -Fragmente ergab eine Schmelztemperatur von  $79,8^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$ ). Primerdimerisation wurde bei  $76,9^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$ ) detektiert (Abb. 4.6.1b).

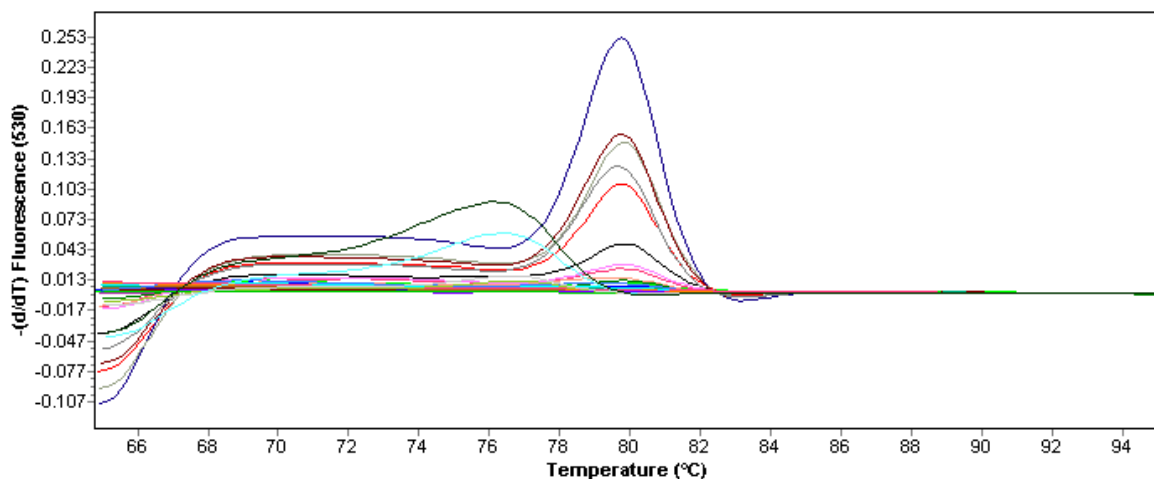


Abb. 4.6.1b Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse von IFN $\gamma$ . Der vordere Peak ( $76,8^{\circ}\text{C}$ ) zeigt die Primer-Dimerisation der Negativ-Kontrolle.

TGF $\beta$ 

Die Länge des gewählten TGF $\beta$ -Fragments betrug 170bp. Die Schmelzkurvenanalyse ergab eine Schmelztemperatur von 84,7°C ( $\pm 0,04^\circ\text{C}$ ). Primerdimerisation wurde bei 75,1°C ( $\pm 0,12^\circ\text{C}$ ) detektiert.

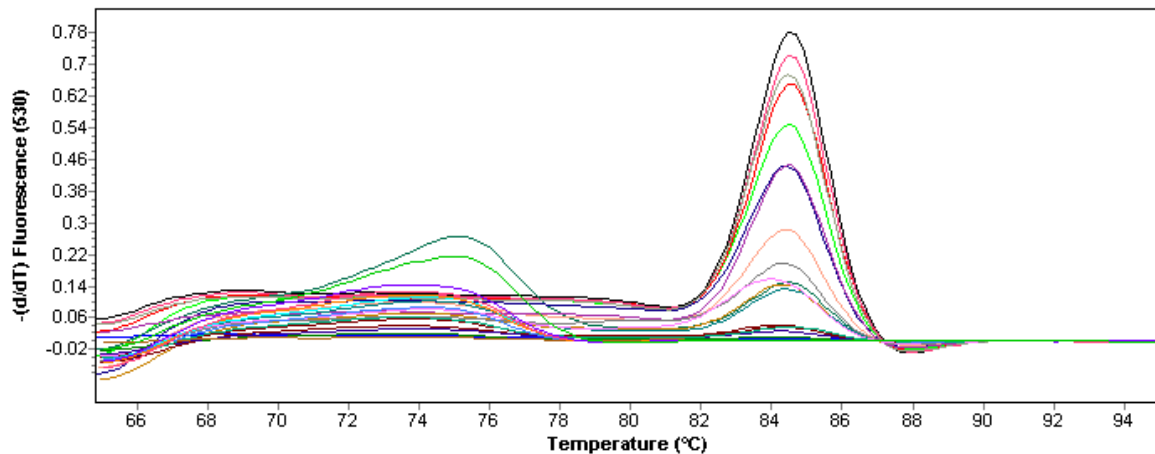


Abb. 4.6.1c Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse von TGF $\beta$ . Die vorderen Peaks (75,1°C) zeigen die Primer-Dimerisation der Negativ-Kontrollen.

IL-10

Die Länge des IL-10-Fragments betrug 191bp. Die Schmelzkurvenanalyse ergab eine Schmelztemperatur von 87,2°C ( $\pm 0,38^\circ\text{C}$ ). Primerdimerisation wurde bei 77,4°C ( $\pm 0,48^\circ\text{C}$ ) detektiert.

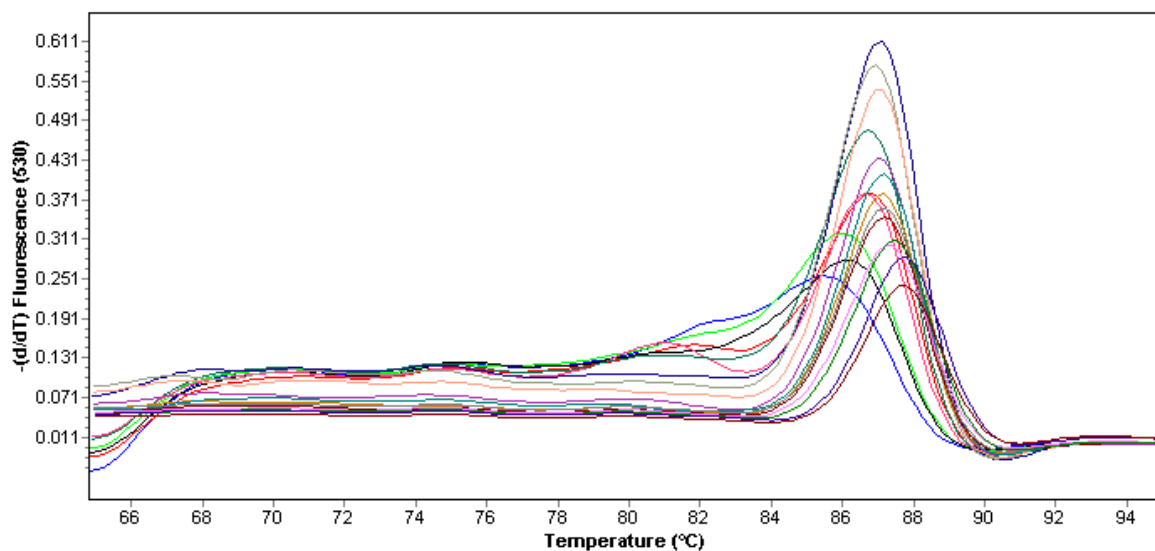


Abb. 4.6.1d Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse von IL-10.

#### 4.6.2 Generierung von externen Standards

Die Standardkurven wurden aus Plasmid-DNA hergestellt, in welche die Sequenz für das entsprechende Zytokin integriert wurde. Dies hatte den Vorteil, dass ein Standard nach Bedarf wiederholt generiert werden konnte und somit der Verbrauch an cDNA gering war. Die erhaltenen Cp-Werte dienen zur Berechnung der Amplifikations-Effizienz, welche die Grundlage der relativen Quantifizierung mittels REST<sup>®</sup> darstellt.

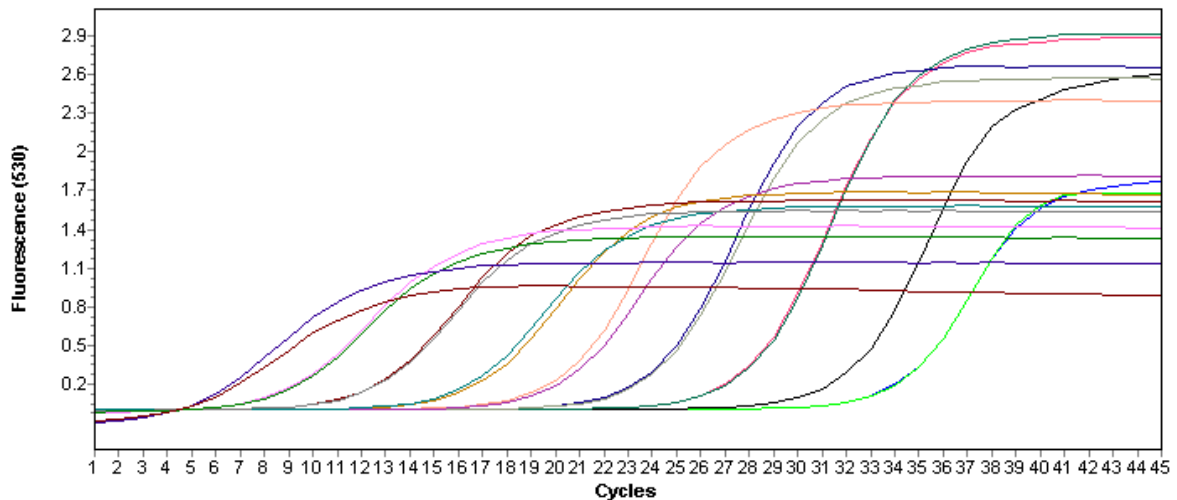


Abb. 4.6.2a Amplifikationskurven von Verdünnungsreihen ( $10^2$ - $10^3$  Kopien, v.l.n.r.) eines externen Standards. Exemplarische Darstellung anhand von  $\beta$ -actin (jeweils 2 Proben).

Tab. 4.6.2a gemessene Cp-Werte der externen Standards (Mittelwerte)

| Kopien | $\beta$ -actin | IFN $\gamma$ | TGF $\beta$ | IL-10 |
|--------|----------------|--------------|-------------|-------|
| $10^8$ | 8,33           | 13,01        | 12,78       | 12,71 |
| $10^7$ | 11,89          | 17,33        | 16,49       | 16,46 |
| $10^6$ | 15,77          | 21,64        | 20,23       | 18,88 |
| $10^5$ | 19,74          | 26,55        | 23,67       | 22,32 |
| $10^4$ | 23,69          | 30,3         | 27,66       | 26,6  |
| $10^3$ | 26,22          | 34,51        | 30,78       | 29,34 |



4.6.3 Expression von IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  und IL-10 nach 4 wpi mit *E. multilocularis*

In den jeweils ersten Immunisierungsstudien mit den rekombinanten Antigenen konnte in der infizierten Kontrollgruppe keine Regulierung der untersuchten Zytokine nach 4wpi gegenüber der nicht infizierten Kontrollgruppe festgestellt werden (Tab. 4.5.3a). Dagegen wurde in der zweiten Studie IFN $\gamma$  in den infizierten Tieren gegenüber den nicht infizierten Kontrolltieren signifikant herunter reguliert (Tab. 4.5.3b). Die Expression von TGF $\beta$  und IL-10 war auch im Versuch 2 nicht signifikant unterschiedlich.

Tab. 4.6.3a Berechnung der relativen Quantifizierung (REST $^{\circ}$ ) zur Unterscheidung der Expression von TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-10 nach 4 wöchiger Infektion im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren im Versuch 1. (REF = Referenz-Gen; TRG = Zielgen (target); P(H1) = Wahrscheinlichkeit das Alternativhypothese zutrifft bzw. Signifikanz; Nullhypothese und Alternativhypothese disjunkt).

| Gen            | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error        | 95% C.I.           | P(H1) | Ergebnis |
|----------------|-----|-----------|------------|-------------------|--------------------|-------|----------|
| $\beta$ -actin | REF | 0,8694    | 1,000      |                   |                    |       |          |
| IFN $\gamma$   | TRG | 0,7033    | 1,627      | 0,466 - 6,108     | 0,135 - 10,254     | 0,429 | -        |
| TGF $\beta$    | TRG | 0,8867    | 31,860     | 0,514 - 9.211,551 | 0,076 - 46.987,558 | 0,240 | -        |
| IL-10          | TRG | 0,9912    | 13,867     | 0,824 - 458,484   | 0,270 - 815,445    | 0,113 | -        |

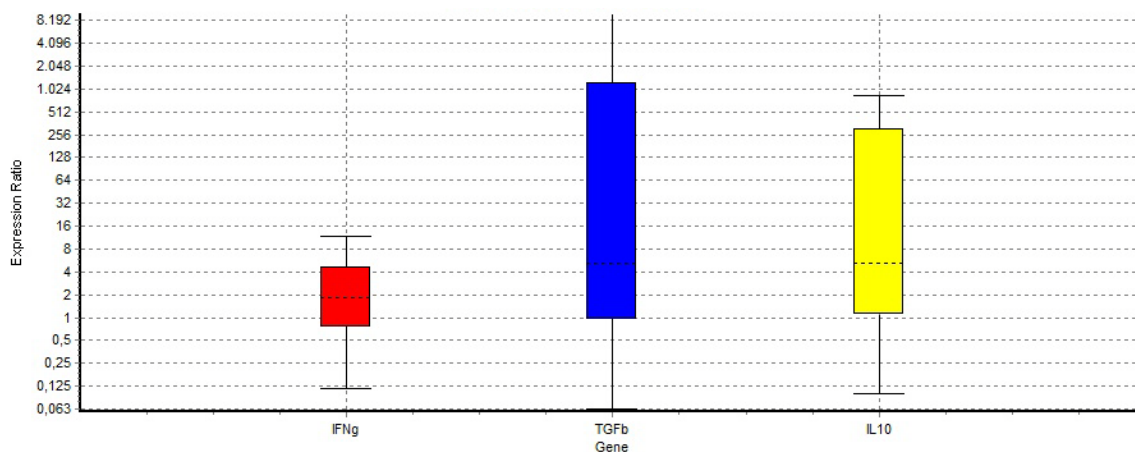


Abb. 4.6.3a Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von infizierten Mäusen (4wpi) und der nicht infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 1. Box entspricht Interquartilsabstand (mittlere 50% der Daten), punktierte Linie entspricht dem Median der Gen-Expression, Whisker repräsentiert Spannweite der Daten.

Tabelle 4.6.3b Berechnung der relativen Quantifizierung (REST<sup>®</sup>) zur Unterscheidung der Expression von TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-10 nach 4 wöchiger Infektion im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren im Versuch 2. (REF = Referenz-Gen; TRG = Zielgen (target); P(H1) = Wahrscheinlichkeit das Alternativhypothese zutrifft bzw. Signifikanz; Nullhypothese und Alternativhypothese disjunkt).

| Gen            | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error     | 95% C.I.        | P(H1) | Ergebnis    |
|----------------|-----|-----------|------------|----------------|-----------------|-------|-------------|
| $\beta$ -actin | REF | 0,8694    | 1,000      |                |                 |       |             |
| IFN $\gamma$   | TRG | 0,7033    | 0,036      | 0,004 - 0,433  | 0,000 - 7,877   | 0,017 | <b>DOWN</b> |
| TGF $\beta$    | TRG | 0,8867    | 0,293      | 0,066 - 1,409  | 0,008 - 6,141   | 0,150 | -           |
| IL-10          | TRG | 0,9912    | 0,202      | 0,007 - 16,859 | 0,000 - 104,751 | 0,386 | -           |

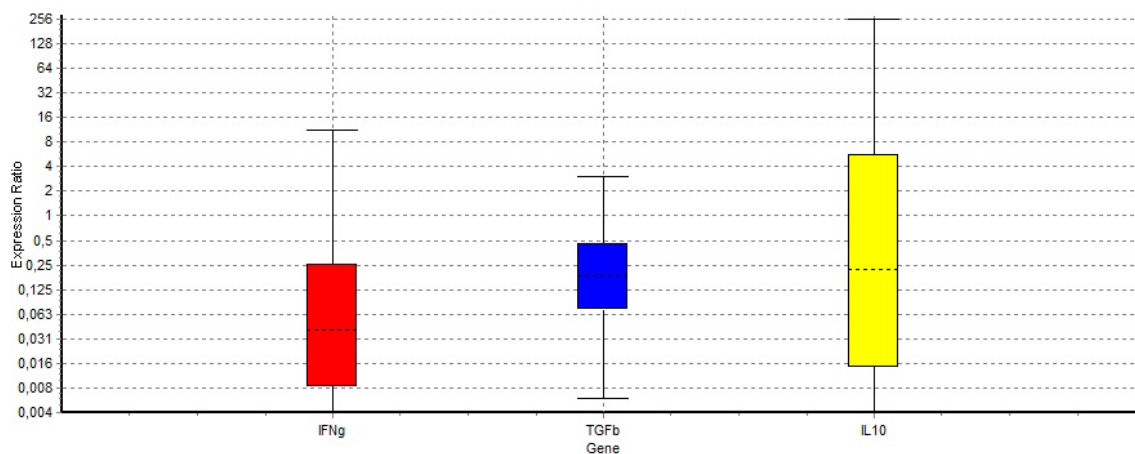


Abb. 4.6.3b Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von infizierten Mäusen (4wpi) und der nicht infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 2. Box entspricht Interquartilsabstand (mittlere 50% der Daten), punktierte Linie entspricht dem Median der Gen-Expression, Whisker repräsentiert Spannweite der Daten.

4.6.4 Expression von IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  und IL-10 nach Immunisierung mit EM95

Die Immunisierung mit EM95 resultierte im ersten sowie im zweiten Immunisierungsversuch mit einer signifikanten Hoch-Regulierung von IFN $\gamma$  sowohl gegenüber den nicht infizierten als auch den infizierten, nicht immunisierten Kontrolltieren (Tab. 4.5.4a – d). Die Expression von TGF $\beta$  lag in beiden Versuchen auf dem Niveau der nicht infizierten bzw. infizierten Mäuse. Eine Regulierung von IL-10 konnte nur in der zweiten Immunisierungsstudie detektiert werden. Gegenüber den nicht infizierten sowie den infizierten Kontrolltieren war IL-10 in diesem Versuch hoch reguliert (Tab.4.5.4a und b).

Tabelle 4.6.4a Berechnung der relativen Quantifizierung (REST<sup>®</sup>) zur Unterscheidung der Expression von TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-10 nach Immunisierung mit EM95 im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren im Versuch 1.

| Gen            | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error      | 95% C.I.        | P(H1) | Ergebnis  |
|----------------|-----|-----------|------------|-----------------|-----------------|-------|-----------|
| $\beta$ -actin | REF | 0,8694    | 1,000      |                 |                 |       |           |
| IFN $\gamma$   | TRG | 0,7033    | 8,959      | 2,252 - 44,451  | 0,548 - 104,612 | 0,038 | <b>UP</b> |
| TGF $\beta$    | TRG | 0,8867    | 0,468      | 0,114 - 1,099   | 0,037 - 8,309   | 0,264 | -         |
| IL-10          | TRG | 0,9912    | 4,237      | 0,209 - 191,016 | 0,044 - 594,890 | 0,378 | -         |

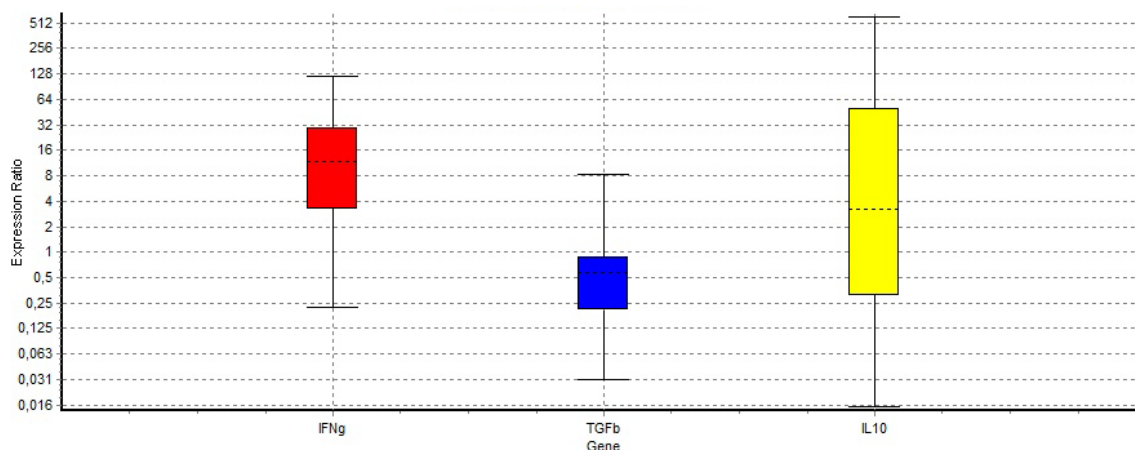


Abb. 4.6.4a Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von infizierten und mit EM95 immunisierten Mäusen und der nicht infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 1.

Tabelle 4.6.4b Berechnung der relativen Quantifizierung (REST®) zur Unterscheidung der Expression von TGFβ, IFNγ und IL-10 nach Immunisierung mit EM95 im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren im Versuch 2.

| Gen              | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error        | 95% C.I.           | P(H1) | Ergebnis  |
|------------------|-----|-----------|------------|-------------------|--------------------|-------|-----------|
| β-actin          | REF | 0,8694    | 1,000      |                   |                    |       |           |
| IFN <sub>γ</sub> | TRG | 0,7033    | 48,296     | 5,312 - 241,848   | 1,069 - 3.198,265  | 0,004 | <b>UP</b> |
| TGFβ             | TRG | 0,8867    | 1,071      | 0,107 - 8,344     | 0,008 - 27,145     | 0,957 | -         |
| IL-10            | TRG | 0,9912    | 57,467     | 3,590 - 1.661,974 | 0,575 - 11.560,266 | 0,011 | <b>UP</b> |

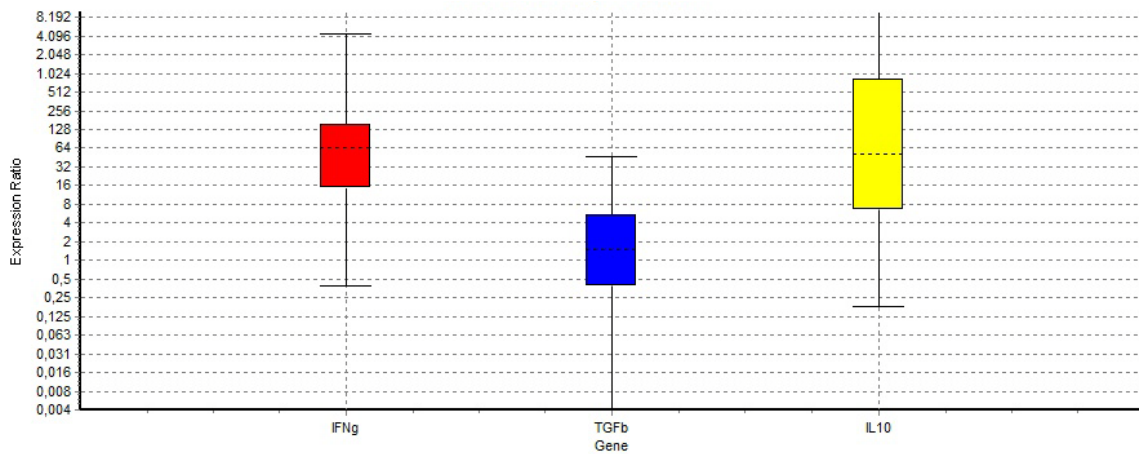
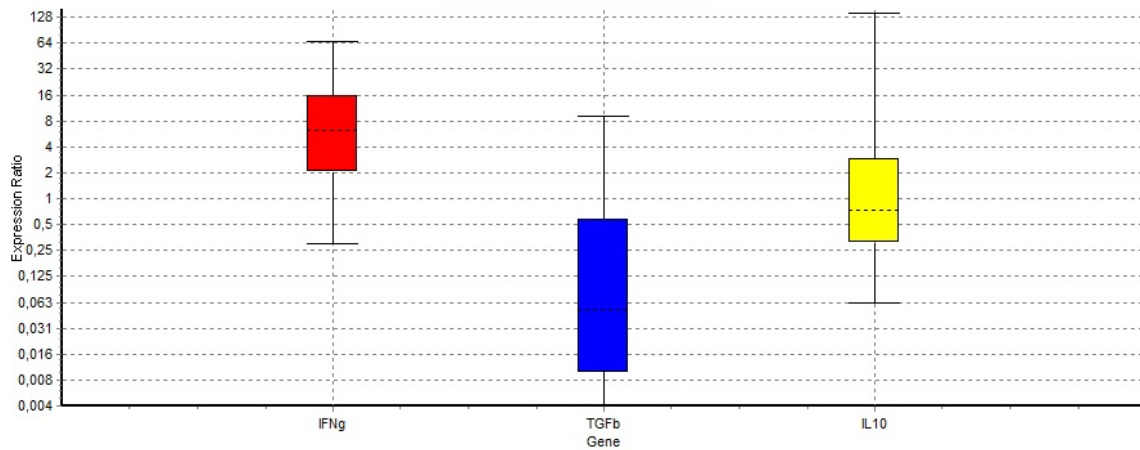


Abb. 4.6.4b Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von mit EM95 immunisierten und infizierten Mäusen und der nicht infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 2.

Tabelle 4.6.4c Berechnung der relativen Quantifizierung (REST®) zur Unterscheidung der Expression von TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-10 nach Immunisierung mit EM95 im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren im Versuch 1.

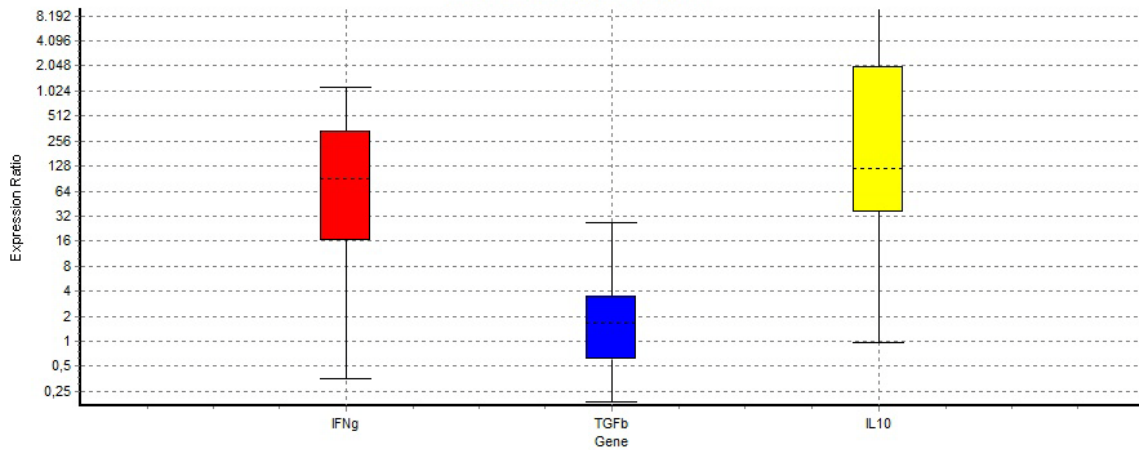
| Gen            | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error     | 95% C.I.       | P(H1) | Ergebnis  |
|----------------|-----|-----------|------------|----------------|----------------|-------|-----------|
| $\beta$ -actin | REF | 0,8694    | 1,000      |                |                |       |           |
| IFN $\gamma$   | TRG | 0,7033    | 5,508      | 1,462 - 21,521 | 0,403 - 57,123 | 0,034 | <b>UP</b> |
| TGF $\beta$    | TRG | 0,8867    | 0,052      | 0,001 - 1,145  | 0,000 - 8,859  | 0,101 | -         |
| IL-10          | TRG | 0,9912    | 1,212      | 0,207 - 14,499 | 0,067 - 80,169 | 0,870 | -         |



4.6.4c Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von mit EM95 immunisierten und infizierten Mäusen und der infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 1.

Tabelle 4.6.4d Berechnung der relativen Quantifizierung (REST®) zur Unterscheidung der Expression von TGFβ, IFNγ und IL-10 nach Immunisierung mit EM95 im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren im Versuch 2.

| Gen              | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error         | 95% C.I.           | P(H1) | Ergebnis  |
|------------------|-----|-----------|------------|--------------------|--------------------|-------|-----------|
| β-actin          | REF | 0,8694    | 1,000      |                    |                    |       |           |
| IFN <sub>γ</sub> | TRG | 0,7033    | 62,868     | 9,690 - 543,967    | 1,564 - 1.097,452  | 0,003 | <b>UP</b> |
| TGFβ             | TRG | 0,8867    | 1,634      | 0,487 - 4,864      | 0,209 - 16,068     | 0,344 | -         |
| IL-10            | TRG | 0,9912    | 249,268    | 12,517 - 9.647,217 | 3,494 - 75.732,056 | 0,005 | <b>UP</b> |



4.6.4d Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von mit EM95 immunisierten und infizierten Mäusen und der infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 2.

4.6.5 Expression von IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  und IL-10 nach Immunisierung mit EMGAPDH

Die Immunisierung mit EMGAPDH ergab hinsichtlich der Expression von IFN $\gamma$  und IL-10 unterschiedliche Ergebnisse in den zwei durchgeführten Versuchen. Während in der ersten Studie die Vakzinierung mit EMGAPDH, sowohl im Vergleich zu den nicht infizierten als auch zu den infizierten Kontrollgruppen, zu einer signifikanten Hochregulierung von IFN $\gamma$  führte, war diese im zweiten Versuch nicht ersichtlich. Dagegen konnte in dem zweiten Versuch eine Hochregulierung von IL-10, ebenfalls sowohl gegenüber der nicht infizierten als auch der infizierten Kontrollgruppe festgestellt werden. In der ersten Studie war IL-10 nicht reguliert. Die Unterschiede in der Expression von TGF $\beta$  waren in allen Immunisierungsstudien mit EMGAPDH nicht signifikant (Tab. 4.5.5a – d).

Tabelle 4.6.5a Berechnung der relativen Quantifizierung (REST $^{\text{®}}$ ) zur Unterscheidung der Expression von TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-10 nach Immunisierung mit EMGAPDH im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren im Versuch 1.

| Gen            | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error        | 95% C.I.           | P(H1) | Ergebnis  |
|----------------|-----|-----------|------------|-------------------|--------------------|-------|-----------|
| $\beta$ -actin | REF | 0,8694    | 1,000      |                   |                    |       |           |
| IFN $\gamma$   | TRG | 0,7033    | 226,154    | 5,743 - 3.945,871 | 0,937 - 18.460,527 | 0,017 | <b>UP</b> |
| TGF $\beta$    | TRG | 0,8867    | 9,127      | 0,496 - 76,711    | 0,227 - 232,893    | 0,089 | -         |
| IL-10          | TRG | 0,9912    | 28,343     | 0,364 - 2.643,108 | 0,059 - 15.577,000 | 0,115 | -         |

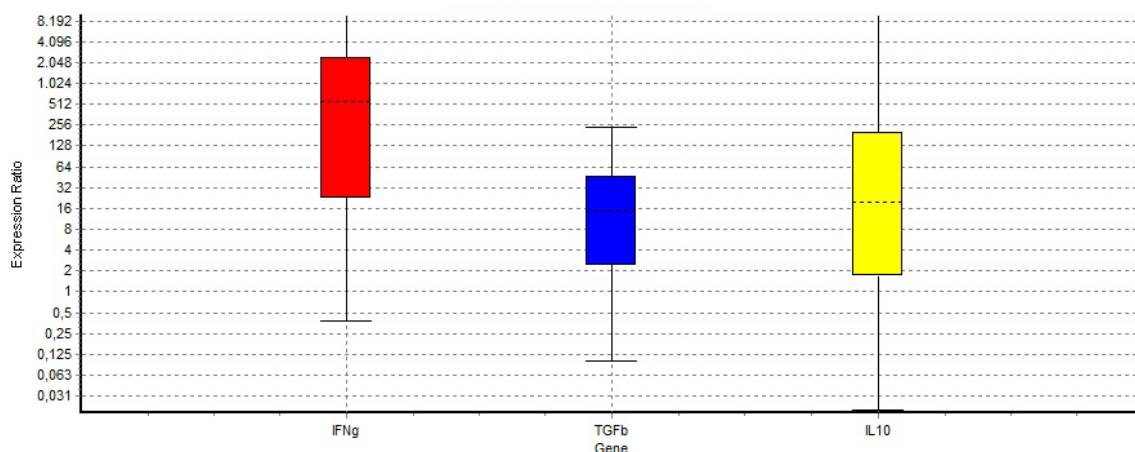


Abb. 4.6.5a Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von mit EMGAPDH immunisierten Mäusen und der nicht infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 1.

Tabelle 4.6.5b Berechnung der relativen Quantifizierung (REST®) zur Unterscheidung der Expression von TGFβ, IFNγ und IL-10 nach Immunisierung mit EMGAPDH im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren im Versuch 2.

| Gen              | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error        | 95% C.I.           | P(H1) | Ergebnis  |
|------------------|-----|-----------|------------|-------------------|--------------------|-------|-----------|
| β-actin          | REF | 0,8694    | 1,000      |                   |                    |       |           |
| IFN <sub>γ</sub> | TRG | 0,7033    | 2,514      | 0,067 - 116,617   | 0,001 - 188,765    | 0,589 | -         |
| TGFβ             | TRG | 0,8867    | 1,762      | 0,194 - 12,108    | 0,021 - 23,981     | 0,636 | -         |
| IL-10            | TRG | 0,9912    | 60,423     | 1,112 - 1.918,314 | 0,306 - 14.451,328 | 0,025 | <b>UP</b> |

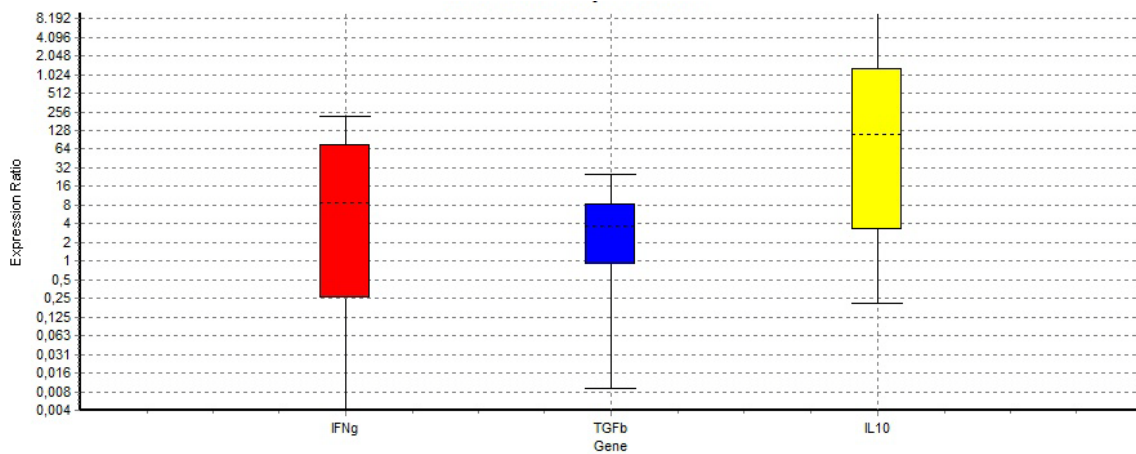


Abb. 4.6.5b Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von mit EMGAPDH immunisierten Mäusen und der nicht infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 2.



Tabelle 4.6.5c Berechnung der relativen Quantifizierung (REST®) zur Unterscheidung der Expression von TGFβ, IFNγ und IL-10 nach Immunisierung mit EMGAPDH im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren im Versuch 1.

| Gen              | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error        | 95% C.I.           | P(H1) | Ergebnis  |
|------------------|-----|-----------|------------|-------------------|--------------------|-------|-----------|
| β-actin          | REF | 0,8694    | 1,000      |                   |                    |       |           |
| IFN <sub>γ</sub> | TRG | 0,7033    | 139,029    | 3,180 - 2.247,281 | 0,689 - 10.080,364 | 0,028 | <b>UP</b> |
| TGFβ             | TRG | 0,8867    | 14,430     | 1,327 - 160,110   | 0,278 - 664,746    | 0,083 | -         |
| IL-10            | TRG | 0,9912    | 2,044      | 0,083 - 30,485    | 0,021 - 142,621    | 0,621 | -         |

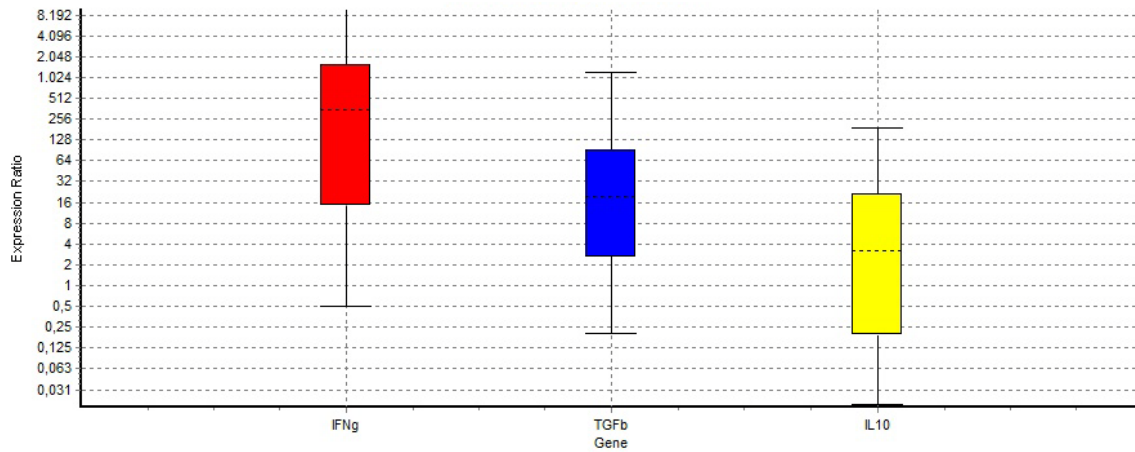


Abb. 4.6.5c Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von mit EMGAPDH immunisierten Mäusen und der infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 1.

Tabelle 4.6.5d Berechnung der relativen Quantifizierung (REST®) zur Unterscheidung der Expression von TGFβ, IFNγ und IL-10 nach Immunisierung mit EMGAPDH im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren im Versuch 2.

| Gen              | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error        | 95% C.I.           | P(H1) | Ergebnis  |
|------------------|-----|-----------|------------|-------------------|--------------------|-------|-----------|
| β-actin          | REF | 0,8694    | 1,000      |                   |                    |       |           |
| IFN <sub>γ</sub> | TRG | 0,7033    | 19,316     | 0,553 - 453,231   | 0,035 - 798,161    | 0,054 | -         |
| TGFβ             | TRG | 0,8867    | 0,933      | 0,247 - 5,495     | 0,003 - 10,675     | 0,975 | -         |
| IL-10            | TRG | 0,9912    | 83,160     | 6,802 - 2.768,333 | 1,598 - 28.396,481 | 0,000 | <b>UP</b> |

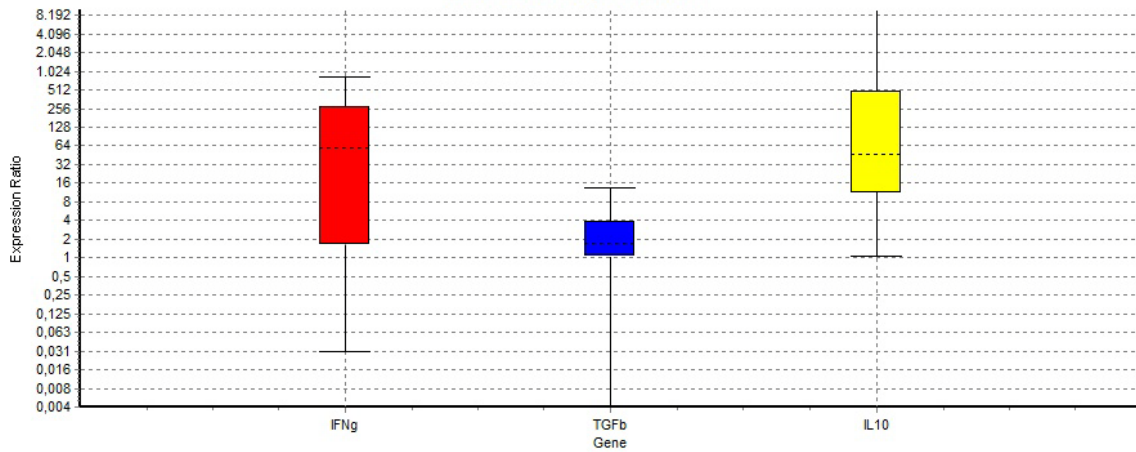


Abb. 4.6.5c Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von mit EMGAPDH immunisierten Mäusen und der infizierten Kontrollgruppe im Immunisierungs-Versuch 2.

#### 4.6.6 Zusammenfassung der Expression von IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ und IL-10 in den Immunisierungsstudien mit den rekombinanten Antigenen EM95 und EMGAPDH

Bis auf die Immunisierung mit EMGAPDH im Versuch 2 ist die Expression von IFN $\gamma$  bei allen immunisierten Versuchsgruppen sowohl gegenüber der infizierten als auch der nicht infizierten Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Expression von TGF $\beta$  war in allen Versuchen nicht signifikant unterschiedlich. Eine signifikant verstärkte Synthese von IL-10 konnte nur in dem jeweils zweiten Versuch detektiert werden. Die infizierten Tiere unterscheiden sich von den nicht infizierten Tieren ebenfalls nur in Versuch 2, indem diese signifikant weniger IFN $\gamma$  exprimieren (Tab. 4.6.6).

Tab. 4.6.6 Zusammenfassende Darstellung der relativen Quantifizierung der Expression von IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  und IL-10 in den Immunisierungsstudien mit den rekombinanten Antigenen EM95 und EMGAPDH und der durchschnittlichen Anzahl der Läsionen als Maß für die Protektion (↓ herunter reguliert, ↑ hoch reguliert, - nicht reguliert).

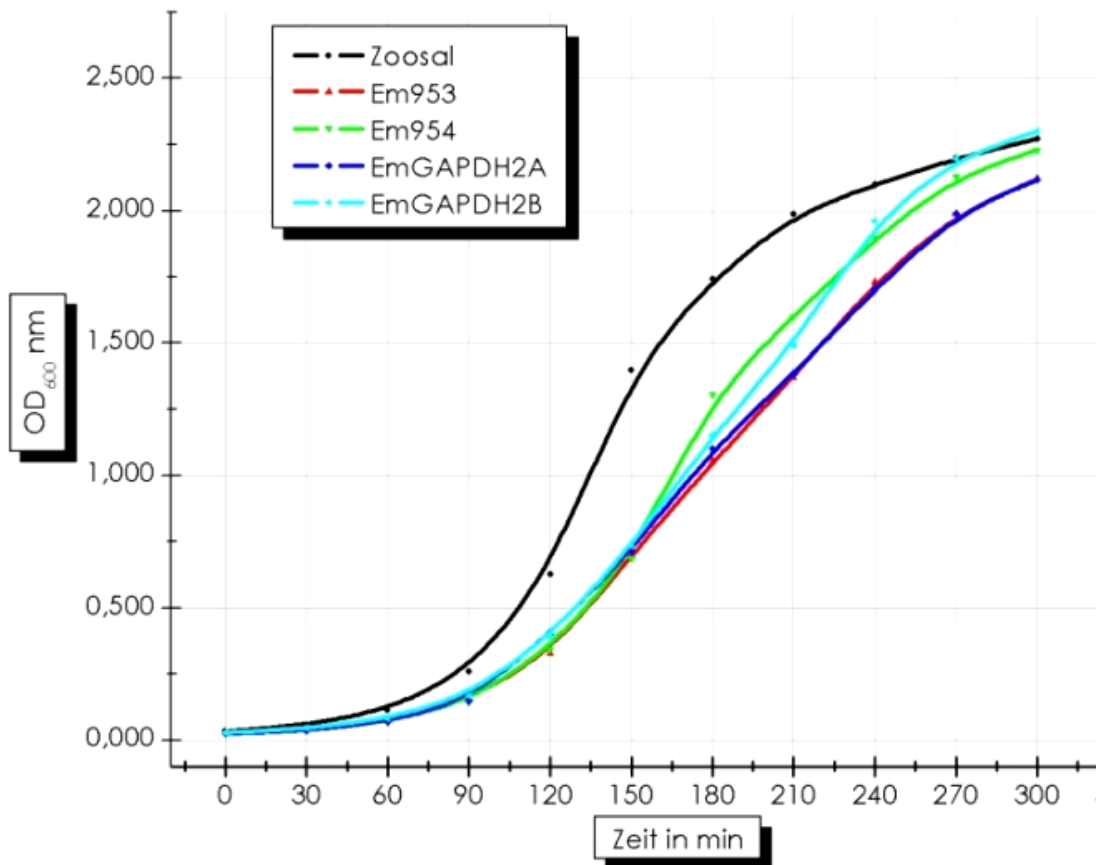
| Infiziert (4wpi) ↔ Nicht infiziert |              |             |       | Läsionen der getesteten Versuchstiere |           |
|------------------------------------|--------------|-------------|-------|---------------------------------------|-----------|
|                                    | IFN $\gamma$ | TGF $\beta$ | IL-10 | Inf                                   | Ninf      |
| Versuch 1                          | -            | -           | -     | 19,6±12,4                             | 0         |
| Versuch 2                          | ↓            | -           | -     | 24,2±21,1                             | 0         |
| EM95 (4wpi) ↔ Nicht infiziert      |              |             |       |                                       |           |
|                                    | IFN $\gamma$ | TGF $\beta$ | IL-10 | EM95                                  | Ninf      |
| Versuch 1                          | ↑            | -           | -     | 1,2±1,2                               | 0         |
| Versuch 2                          | ↑            | -           | ↑     | 0,3±0,5                               | 0         |
| EM95 (4wpi) ↔ Infiziert            |              |             |       |                                       |           |
|                                    | IFN $\gamma$ | TGF $\beta$ | IL-10 | EM95                                  | Inf       |
| Versuch 1                          | ↑            | -           | -     | 1,2±1,2                               | 19,6±12,4 |
| Versuch 2                          | ↑            | -           | ↑     | 0,3±0,5                               | 24,2±21,1 |
| EMGAPDH(4wpi) ↔ Nicht infiziert    |              |             |       |                                       |           |
|                                    | IFN $\gamma$ | TGF $\beta$ | IL-10 | EMGAPDH                               | Ninf      |
| Versuch 1                          | ↑            | -           | -     | 6,4±6,6                               | 0         |
| Versuch 2                          | -            | -           | ↑     | 4,3±3,7                               | 0         |
| EMGAPDH(4wpi) ↔ Infiziert          |              |             |       |                                       |           |
|                                    | IFN $\gamma$ | TGF $\beta$ | IL-10 | EMGAPDH                               | Inf       |
| Versuch 1                          | ↑            | -           | -     | 6,4±6,6                               | 19,6±12,4 |
| Versuch 2                          | -            | -           | ↑     | 4,3±3,7                               | 24,2±21,1 |

#### 4.7 Vorversuche zur Immunisierung mit *Salmonella typhimurium*

Zur Gewährleistung einer hinreichenden Invasivität des zu verwendeten Salmonellen – Impfstammes musste dieser vorher an Mäusen getestet und reisoliert werden. Dazu wurden pro Vakzinierungskandidat, d.h. ZpVDL9.3-Em95G und ZpVDL-EmGAPDH, je 4 Mäuse mit  $3 \times 10^8$  ( $\pm 1 \times 10^8$ ) KbE's Salmonellen gefüttert. Nach 3 Tagen konnten aus allen Mäusen durchschnittlich  $10^3$ , nach 7 Tagen durchschnittlich  $5 \times 10^3$  Salmonellen aus Leber und Milz isoliert werden. Von Klonen der erhaltenen Reisolatate wurden die Plasmide zur Kontrolle extrahiert und mit BglIII geschnitten. Weiterhin wurden die Reisolatate in Hinsicht auf zukünftige Vakzinierungsversuche charakterisiert, d.h. die Stabilität der Plasmide sowie die Generationszeit der Bakterien bestimmt.

##### 4.7.1 Bestimmung der Generationszeit der Reisolatate (RI)

Die Ermittlung der Generationszeit dient zur Vitalitätsbestimmung des durch die Transformation eines Fremdplasmides gentechnisch veränderten Bakteriums. Vergleiche der Verdopplungszeit (log-Phase des Bakterienwachstums, siehe Wachstumskurve Abb. 4.7.1) von den Reisolataten ZpVDL9.3-Em95G und ZpVDL-EmGAPDH mit dem zugehörigen naiven Stamm Zoosaloral H® lassen keine Beeinträchtigungen durch die Transformation erkennen. Die Generationszeiten sind dennoch nicht als absolute Werte zu betrachten, da bei wiederholten, zeitlich unabhängigen Messungen durchaus Unterschiede von mehreren Minuten auftreten können. Diese entstehen durch geringe Abweichungen in den Medienchargen und den Anzuchtbedingungen. Daher interessieren nur die relativen Unterschiede zwischen den Stämmen innerhalb einer Anzucht.



|                     |         |
|---------------------|---------|
| Zoosaloral H®       | ~26min  |
| RI ZpVDL9.3-Em95G 3 | ~ 29min |
| RI ZpVDL9.3-Em95G 4 | ~ 27min |
| RI ZpVDL-EmGAPDH 2A | ~ 26min |
| RI ZpVDL-EmGAPDH 2B | ~27min  |

Abb. 4.7.1 Wachstumskurven zur Bestimmung der Generationsdauer ausgewählter Reisolate und die daraus ermittelte Generationszeit

#### 4.7.2 Bestimmung der Plasmidstabilität

Um eine effiziente Antigenpräsentation durch rekombinante Lebendvakzine zu gewährleisten, ist eine hohe Stabilität des Expressionsplasmids ohne Selektion durch Antibiotika erforderlich. Die Stabilität der Plasmide pVDL9.3Em95G und pVDL9.3EmGAPDH *in vitro* wurde durch mehrmaliges Passagieren der Bakterien ohne Antibiotikaselektion untersucht. Dazu wurden 10 ml LB -Medium mit 100 µl einer stationären ÜN Kultur inokuliert und bei 30°C schüttelnd inkubiert. Nach jeweils 12h wurden Verdünnungsreihen der Kulturen auf selektivem und nichtselektivem Medium ausplattiert sowie wiederum LB-Medium für weitere Passagen von 12 h inokuliert. Die Anzahl an gewachsenen KbE auf dem selektiven Medium jeder Passage wurde als 100 % gewertet und die Anzahl an KbE auf dem nichtselektiven Medium zu diesen in Relation gesetzt. Von beiden Vakzinekandidaten wurden die Plasmide über mehrere Passagen ohne Selektion durch Chloramphenicol dauerhaft propagiert (Tabelle 4.7.2). Beide Vektoren können daher als sehr stabil angesehen werden.

Tabelle 4.7.2 Plasmidstabilität für die Expressionskassetten in Zoosaloral H®. Ermittelt wurde die Stabilität anhand von Passagen in selektivem Medium (100%).

|                   | Passage 1 | Passage 2 | Passage 3 | Passage 4 | Passage 5 |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| pVDL9.3Em95G 3    | 104%      | 109%      | 90%       | 75%       | 67%       |
| pVDL9.3Em95G 4    | 98%       | 101%      | 95%       | 109%      | 104%      |
| pVDL9.3EmGAPDH 2A | 126%      | 112%      | 129%      | 121%      | 115%      |
| pVDL9.3EmGAPDH 2B | 112%      | 96%       | 104%      | 89%       | 107%      |

Werte aufgerundet

#### 4.8 Immunisierungsstudien mit *Salmonella typhimurium* als Carrier für protektive Antigene

In diesen Studien wurde die Immunisierung mit rekombinanten *Salmonella*- Impfstämmen getestet, welche die potenziell protektiven Antigene EM95, sowie EMGAPDH exprimieren und im Fall von ZpVDL9.3EM95 unter Beteiligung des Hämolsin-Transporter-Systems in die Umgebung exportieren (vgl. 4.2.6). Weibliche BalbC Mäuse im Alter von 9 Wochen erhielten 2 Mal im Abstand von 3 Wochen eine vorher determinierte Zahl (Richtwerte waren die Versuche von Müller-Schollenberger, 1995) des entsprechenden Salmonellen-Impfstammes oral appliziert. 4 Wochen nach der letzten Immunisierung erfolgte die Infektion mit *E. multilocularis*-Eiern (Abb. 4.8). Es wurden mit jedem *Salmonella*-Konstrukt (ZpVDL9.3EM95 und ZpVDL9.3EMGAPDH) je zwei Vakzinierungsstudien durchgeführt. Aufgrund des hohen Verlustes an Versuchstieren im ersten Versuch (4.8.1) wurde für den zweiten Immunisierungsversuch die Applikationsform von Schlundsonde zur Fütterung geändert. Im Folgenden werden daher die Versuche mit dem jeweiligen Konstrukt nach Applikationsform zusammengefasst.

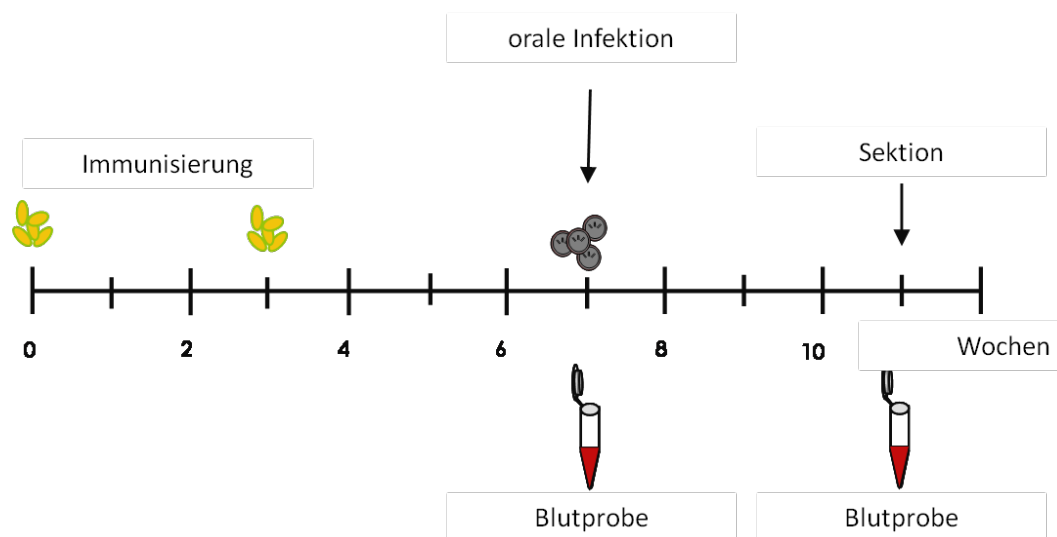


Abb. 4.7 Immunisierungsschema der Vakzinierungsstudien mit rekombinanten *Salmonella*-Impfstämmen.

#### 4.8.1 Immunisierungsstudie 1 mit den *Salmonella*-Impfstämmen ZpVDL9.3EM95 und ZpVDL9.3EMGAPDH

Weibliche BalbC Mäuse im Alter von 9 Wochen (n=10) erhielten im Abstand von 3 Wochen jeweils zwischen  $2 \times 10^8$  –  $3,4 \times 10^{10}$  KbE des entsprechenden *Salmonella*-Impfstammes (ZpVDL9.3EM95, ZpVDL9.3EMGAPDH und Zoosaloral H® als Kontrollgruppe) mittels einer Schlundsonde appliziert. 4 Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse mit *E. multilocularis* - Eiern infiziert. Eine Blutentnahme für serologische Untersuchungen erfolgte kurz vor der Infektion. Nach weiteren vier Wochen erfolgte die Sektion, mit Entnahme von Leber, Milz und Blut. Aufgrund bisher nicht eindeutig geklärter Ereignisse kam es bei der Immunisierung zu hohen Verlusten der Versuchstiere. Innerhalb der ersten Versuchswoche verstarben 7 mit ZpVDL9.3EM95 immunisierte, 4 mit ZpVDL9.3EMGAPDH immunisierte und 3 Tiere der Zoosaloral H®-Kontrollgruppe. Diese Tiere wurden daraufhin in einem zweiten Versuchsansatz mit identischen Bedingungen ersetzt, wobei wiederum ein Teil der Tiere verstarb, so dass zu Versuchsende nur 4 Tiere der ZpVDL9.3EM95-, 6 Tiere der ZpVDL9.3EMGAPDH- und 9 Tiere der *Salmonella*-Kontrollgruppe überlebten (Tab. 4.7.1). Eine denkbare Erklärung dieser Ereignisse ist die Verwendung einer Schlundsonde. Dadurch kam es mit großer Wahrscheinlichkeit zu kleineren Rupturen des Ösophagus bzw. der oralen Mukosa in deren Verlauf es zum Eintritt von Salmonellen in den Blutkreislauf kam. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass in der zweiten Immunisierungsstudie (4.6.2), nach Verzicht einer Schlundsonde, alle Versuchstiere überlebten.

Aufgrund dieser Ereignisse und der dadurch entstandenen Abnahme der Gruppengröße ist eine gesicherte Interpretation der Versuchsergebnisse nicht gegeben. Anzumerken sei jedoch, dass weder die Immunisierung mit ZpVDL9.3EM95 noch die mit ZpVDL9.3EMGAPDH zu einer statistisch abgesicherten Verringerung der gebildeten Läsionen führte (Abb. 4.8.1a).



Tabelle 4.8.1. Übersicht der Versuchsgruppen von Immunisierungsstudie 1 mit den rekombinanten *Salmonella*-Impfstämmen ZpVDL9.3EM95 und ZpVDL9.3EMGAPDH. Mit Stern versehene Daten beziehen sich auf die ersetzten Versuchstiere (siehe Text).

| Versuchsgruppe                  | Z-EM95  | Z-EMGAPDH                                       | Zoosaloral H®                                   | Kontrolle |
|---------------------------------|---|---|---|-----------|
| Applikation (oral)              | ZpVDL9.3-EM95                                   | ZpVDL9.3-EMGAPDH                                | Zoosaloral H®                                   | PBS       |
| 1. Infektion (KbE's)            | 2,4x10 <sup>10</sup> /<br>7,3x10 <sup>09*</sup> | 2,9x10 <sup>10</sup> /<br>7,1x10 <sup>09*</sup> | 3,4x10 <sup>10</sup> /<br>1,1x10 <sup>10*</sup> | -         |
| 2. Infektion (KbE's)            | 2,9x10 <sup>09</sup> /<br>2,0x10 <sup>08*</sup> | 3,2x10 <sup>09</sup> /<br>9,0x10 <sup>07*</sup> | 3,4x10 <sup>09</sup> /<br>3,6x10 <sup>08*</sup> | -         |
| Infektionsdosis ( <i>E.m.</i> ) | 4000 Eier                                       | 4000 Eier                                       | 4000 Eier                                       | 4000 Eier |
| Überlebende Tiere               | <b>4</b><br>2(10)/2(7)*                         | <b>6</b><br>4(10)/2(4)*                         | <b>9</b><br>7(10)/2(3)*                         | 10/10     |
| Metazestoden Ø ± SD             | 10,3±2,2  | 13,9±8,0  | 18,3±16,0                                       | 22,9±16,7 |
| Minimum/Maximum                 | 8/13  | 6/28  | 0/50  | 2/51      |

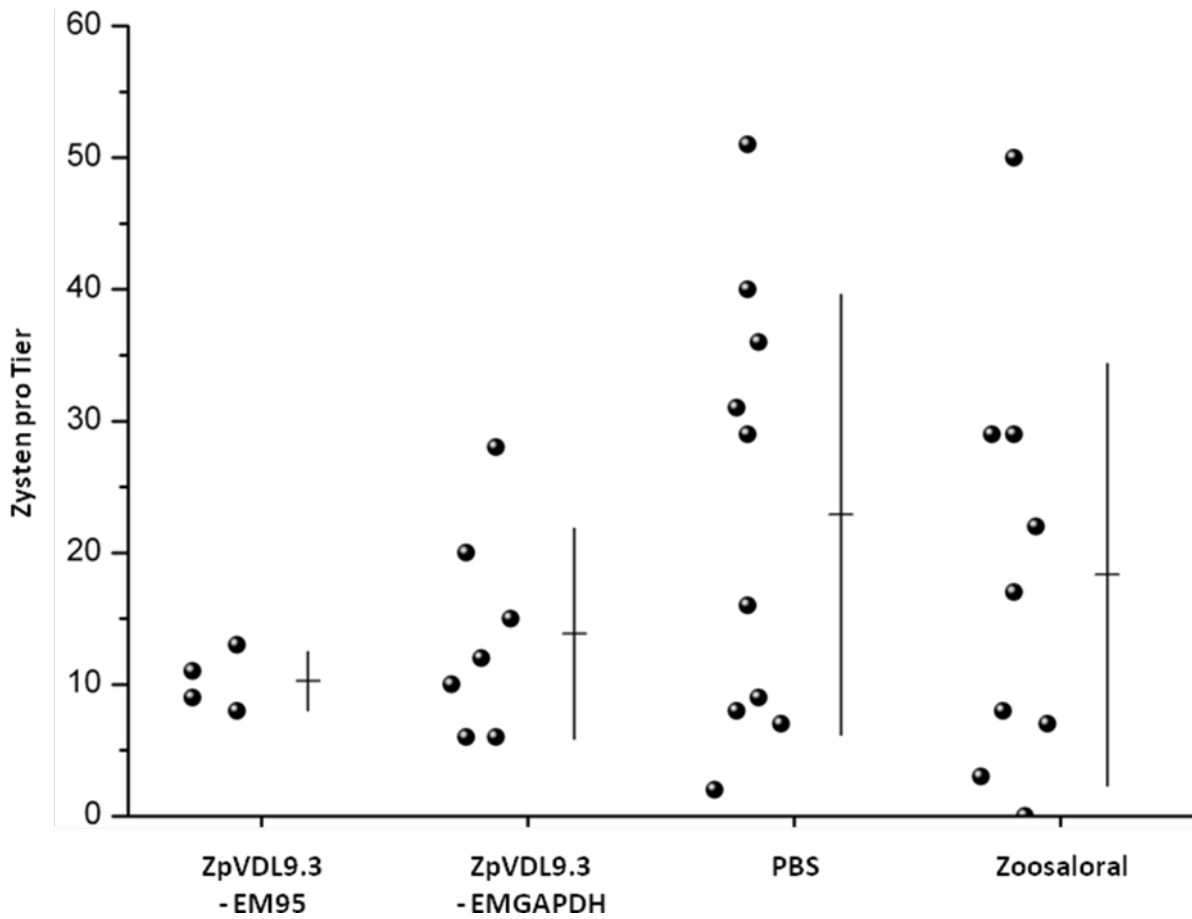


Abb. 4.7.1. Gebildete Läsionen (Zysten pro Tier) in der Immunisierungsstudie 1 mit den rekombinanten *Salmonella*-Stämmen ZpVDL9.3EM95 und ZpVDL9.3EMGAPDH.

#### 4.8.2 Immunisierungsstudie 2 mit den *Salmonella*-Impfstämmen ZpVDL9.3EM95 und ZpVDL9.3EMGAPDH

Die zweite Immunisierungsstudie mit den *Salmonella*-Impfstämmen wurde analog der ersten Immunisierungsstudie durchgeführt, jedoch wurde den Versuchstieren die entsprechenden *Salmonella*-Impfdosen nach fünfstündigen Futter- und Wasserentzug mittels Fütterung appliziert. Ferner wurde die Höhe der jeweilig eingesetzten Dosis vermindert. Zudem wurde eine weitere Versuchsgruppe hinzugefügt, welche zusätzlich zur oralen Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH eine zweimalige subkutane Applikation des Antigens EMGAPDH (7 Tage versetzt) erhielt. Damit sollten die Ergebnisse von Müller-Schollenberger (1995) bestätigt werden, bei denen die kombinierte Applikation von EMGAPDH (Antigen) und Salmonellen welche EMGAPDH exprimierten, zu einem signifikanten Schutz führten.

In dieser Immunisierungsstudie überlebten alle Versuchstiere die Immunisierung, was entweder auf den Verzicht der Schlundsonde oder/und auf die geringere Anzahl der verabreichten Salmonellen zurückzuführen ist.

Alle Immunisierungen führten zu einer signifikanten Verminderung der gebildeten Läsionen (Abb. 4.8.2). Die Immunisierung mit ZpVDL9.3EM95 erzielte eine 77,6%ige Verringerung der Metazestodenlast gegenüber der nicht immunisierten Kontrollgruppe ( $p = 0,0005$ , Mann-Whitney U Test), jedoch konnten keine Unterschiede im Vergleich zu der Kontrollgruppe, welche mit dem nicht exprimierenden *Salmonella typhimurium* Stamm – Zoosaloral H<sup>®</sup> immunisiert wurden festgestellt werden. Die gleichen Ergebnisse wurden durch die Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH und durch die kombinierte Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH (oral) und EMGAPDH (s.c.) erzielt. Die Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH ergab eine 73,1%ige Verringerung ( $p = 0,0019$ ), die kombinierte Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH (oral) und EMGAPDH (s.c.) ergab eine 87,3%ige Verminderung an gebildeten Läsionen im Vergleich zu den nicht immunisierten Kontrolltieren ( $p = 0,0004$ ). Signifikante Differenzen zur der Kontrollimmunisierung mit dem naiven *Salmonella*-Stamm konnten nicht erzielt werden. Diese Kontrollgruppe, welche nur mit dem *Salmonella typhimurium* – Stamm Zoosaloral H<sup>®</sup> immunisiert wurde, zeigte demzufolge ebenfalls eine signifikante Dezimierung (Abb. 4.8.2).

Tab. 4.8.2 Übersicht der Versuchsgruppen der zweiten Immunisierungsstudie mit *Salmonella typhimurium* als Antigencarrier

| Versuchsgruppe         | Z-EM95               | Z-EMGAPDH               | Z-GAP/GAP                                     | Zoosal-oral H®       | Kontrolle |
|------------------------|----------------------|-------------------------|---|----------------------|-----------|
| Applikation            | ZpVDL9.3-EM95 (oral) | ZpVDL9.3-EMGAPDH (oral) | ZpVDL9.3-EMGAPDH (oral) + 6HIS-EMGAPDH (i.p.) | Zoosal-oralH (oral)  | PBS       |
| 1. Infektion (KbE's)   | 4,4x10 <sup>08</sup> | 5,5x10 <sup>08</sup>    | 5,5x10 <sup>08</sup><br>plus 20µg             | 5,4x10 <sup>08</sup> | -         |
| 2. Infektion (KbE's)   | 6,7x10 <sup>08</sup> | 9,1x10 <sup>08</sup>    | 9,1x10 <sup>08</sup><br>plus 20µg             | 1,0x10 <sup>09</sup> | -         |
| Infektionsdosis (E.m.) | 4500 Eier            | 4500 Eier               | 4500 Eier                                     | 4500 Eier            | 4500 Eier |
| Überlebende Tiere      | 10/10                | 10/10                   | 10/10   | 10/10                | 15/15     |
| Metazestoden Ø ± SD    | 5,5±4,3              | 6,6±6,4                 | 3,1±2,1                                       | 7,9±5,8              | 24,5±19,2 |
| Minimum/Maximum        | 1/13                 | 0/19                    | 0/7   | 0/16                 | 6/64      |

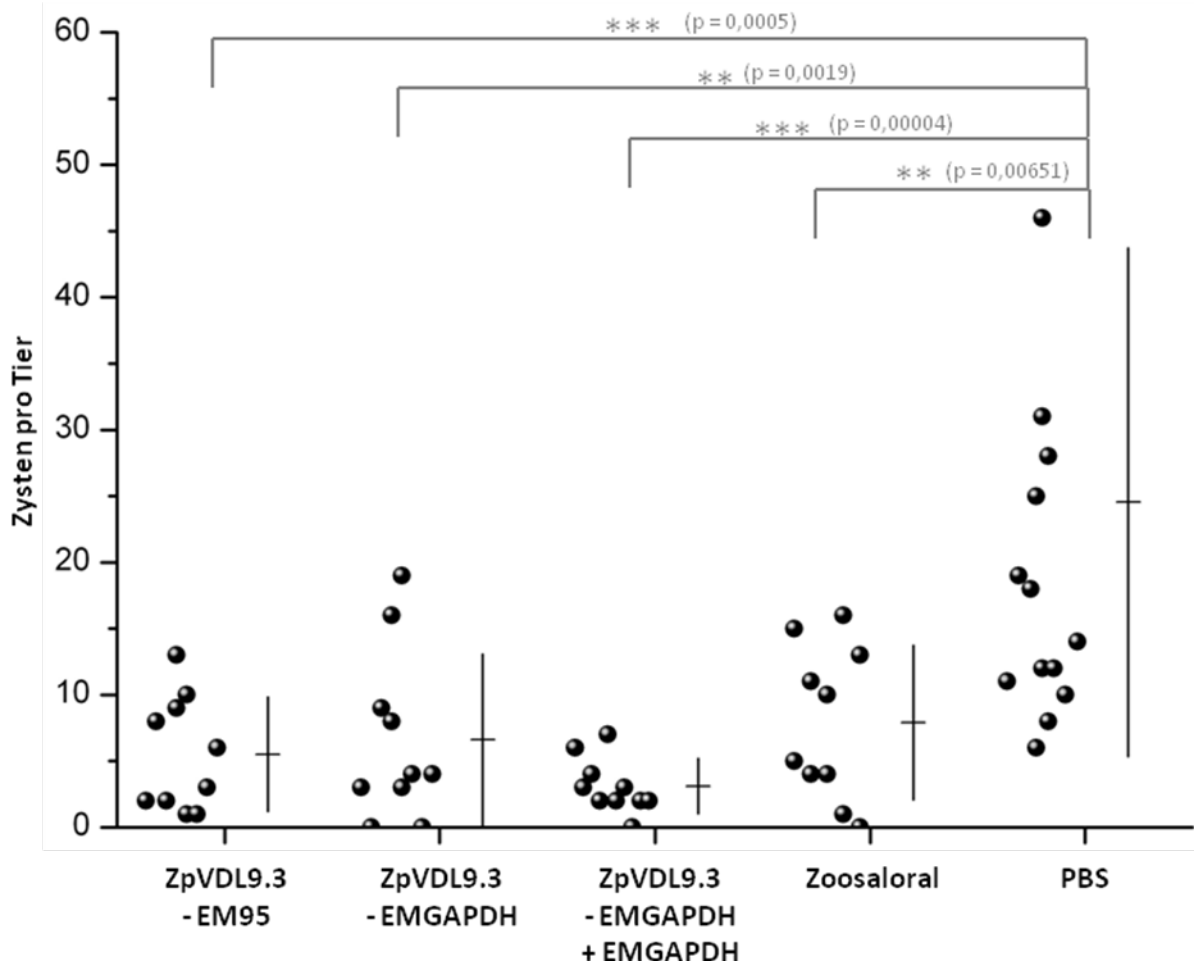


Abb. 4.8.2 Gebildete Läsionen (Zysten pro Tier) in der zweiten Immunisierungstudie mit *Salmonella typhimurium* als Antigencarrier. Alle immunisierten Gruppen zeigten eine signifikante Reduktion der Metazestodenlast gegenüber der nicht immunisierten Kontrollgruppe (PBS).

#### 4.8.3 Milzellproliferation der Immunisierungsstudien mit *Salmonella typhimurium* als Carrier für die Antigene EM95 und EMGAPDH

##### Proliferation nach Immunisierung mit ZpVDL9.3EM95

Nach ConA-Stimulation weisen die mit ZpVDL9.3EM95 immunisierten Tiere sowohl im Vergleich zu den nicht immunisierten, nicht infizierten Kontrolltieren, als auch zu den nur mit den naiven *Salmonella*-Kontrollen in beiden Versuchen keine signifikanten Unterschiede auf. Das Phänomen, dass sowohl nach Stimulation mit Gesamt-*E.m.*-Antigen die nicht infizierten, nicht immunisierten Tieren eine erhöhte Proliferationsrate aufwiesen (siehe Milzellproliferation nach Antigen-Immunisierung, Abb. 4.4.1, 4.4.2) wiederholte sich bei diesen Immunisierungsversuchen. Die Proliferation der Zoosaloral H<sup>®</sup> - Versuchsgruppe ist nach EM95-Stimulation stark erhöht. Nach Stimulation der Milzzellen mit *Salmonella*-Gesamt-Antigen zeigten die Milzzellen der Zoosaloral H<sup>®</sup> - Gruppe im ersten Versuch (Verwendung der Schlundsonde) eine erhöhte Proliferationsrate, im zweiten (Fütterung der Salmonellen) konnte dagegen keine verstärkte Proliferation gegenüber den nicht stimulierten Milzzellen gemessen werden. Bemerkenswert erscheint die proliferationsstimulierende Wirkung des Salmonellen-Gesamt-Antigens auf die naiven Mäuse im Versuch 1, insbesondere nach Normalisierung mit den ConA-Werten (Abb. 4.8.3a, b, c). Aufgrund von technischen Problemen konnte die Proliferation der nicht infizierten, nicht immunisierten Kontrolltiere nach Stimulation mit Salmonellen-Antigen im zweiten Versuch nicht ausgewertet werden.

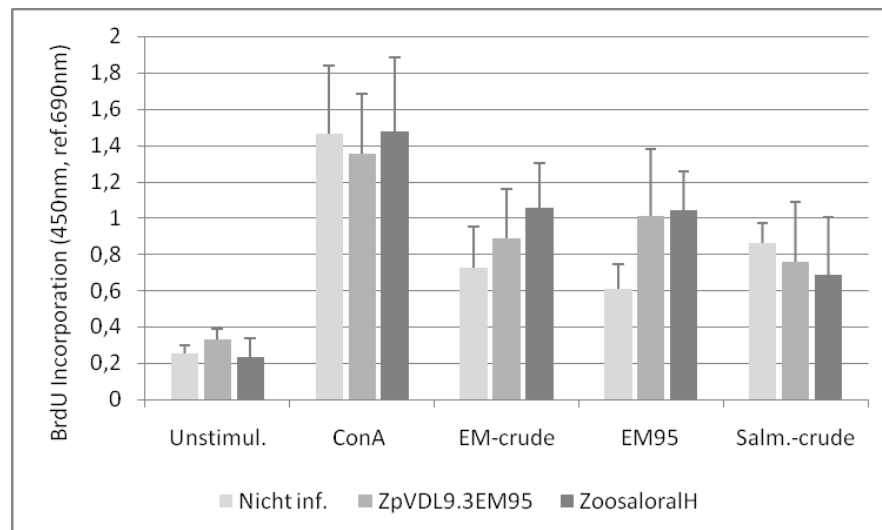


Abb. 4.8.3a Proliferation von Milzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Versuch 1 der Immunisierung mit ZpVDL9.3EM95 zum Sektionszeitpunkt. Dargestellt sind der Mittelwert aus dem Pool der Milzzellen aller Tiere einer Versuchsgruppe sowie die Standardabweichung.

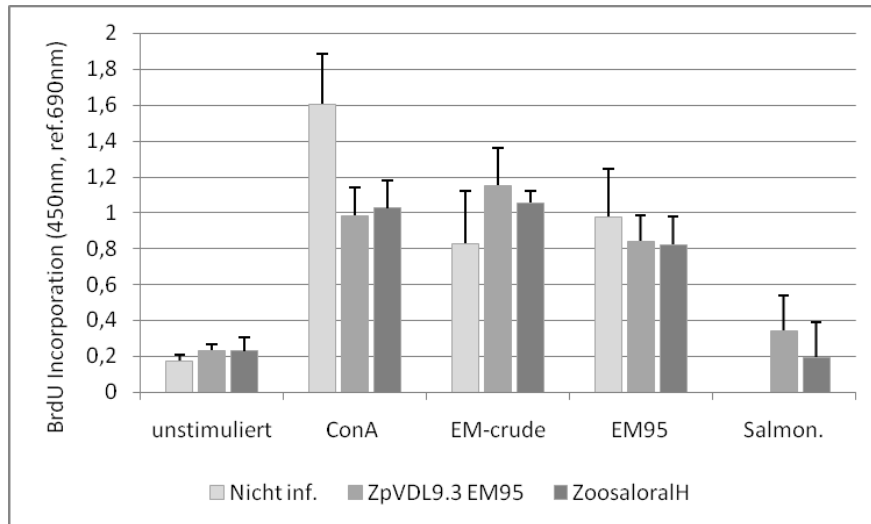


Abb. 4.8.3b Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Versuch 2 der Immunisierung mit ZpVDL9.3EM95 zum Sektionszeitpunkt. Dargestellt sind der Mittelwert aus dem Pool der Milzzellen aller Tiere einer Versuchsgruppe sowie die Standard-Abweichung.

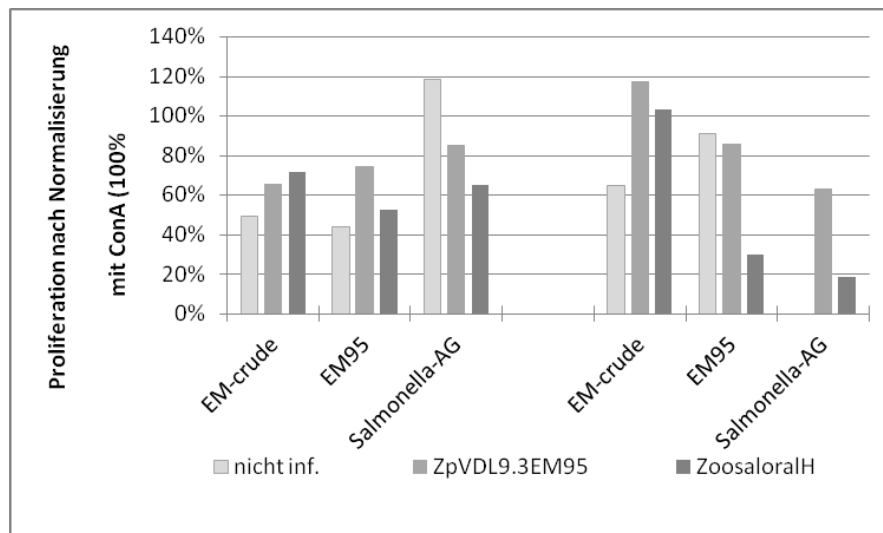


Abb. 4.8.3c Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Immunisierungsexperiment mit ZpVDL9.3EM95 (rechts 1.Studie, links 2.Studie) nach Normalisierung mit den Werten der ConA-Stimulierung. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulierung mit Gesamt-EM-Antigen (EM-crude) und EM95 sowie *Salmonella*-AG der nicht infizierten, der mit ZpVDL9.3EM95-immunisierten und den mit Zoosaloral H<sup>®</sup> immunisierten Tieren in Prozent zu den ConA-stimulierten Milzzellen (100%) der einzelnen Gruppen.

### Proliferation nach Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH

Wie auch in den Vakzinierungsversuchen mit ZpVDL9.3EM95 weisen die mit ZpVDL9.3EMGAPDH immunisierten Tiere nach ConA-Stimulation sowohl im Vergleich zu den nicht immunisierten, nicht infizierten Kontrolltieren, als auch zu den nur mit den naiven *Salmonella*-Kontrollen in beiden Versuchen keine signifikanten Unterschiede auf. Ebenso lassen sich bei allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede nach Stimulierung mit Gesamt-*E. multilocularis*-Antigen und EMGAPDH feststellen. Leichte Differenzen zwischen den beiden Versuchen finden sich wiederum in der Proliferation nach Stimulation mit Gesamt *Salmonella*-Antigen, was insbesondere nach Normalisierung mit ConA deutlich wird (Abb. 4.8.3f). Während im ersten Versuch (Applikation mittels Schlundsonde) die Milzzellen der Zoosaloral H® - Gruppe die Stimulation mit *Salmonella*-Antigen mit einer erhöhten Proliferationsrate beantworten, bleibt diese Reaktion im zweiten Versuch (Applikation durch Fütterung) aus. Die Milzzellen der Versuchsgruppe, welche zu der oralen Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH zusätzliche mit dem Antigen EMGAPDH subkutan immunisiert wurde, zeigen keine Unterschiede in ihrem Proliferationsverhalten zu der ausschließlich oral immunisierten Gruppe (Abb. 4.8.3d, e, f).

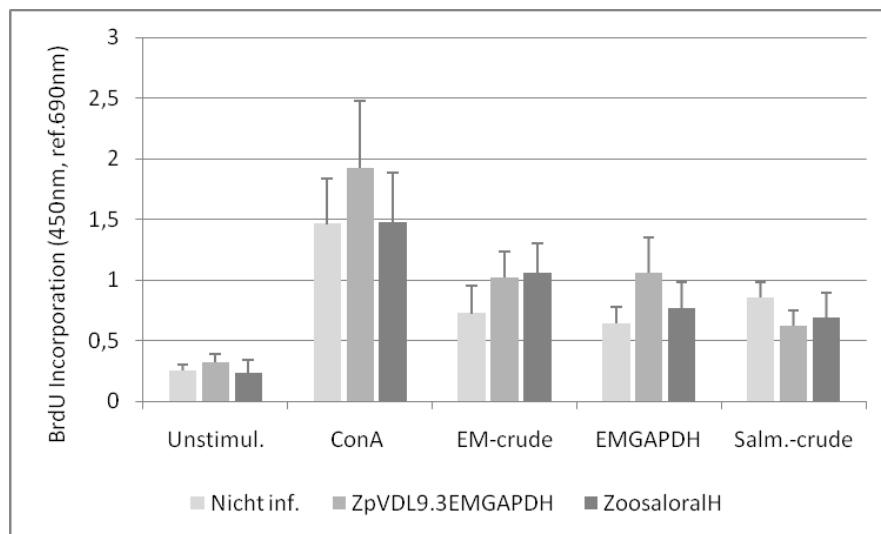


Abb. 4.8.3d Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Versuch 1 der Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH zum Sektionszeitpunkt. Dargestellt sind der Mittelwert aus dem Pool der Milzzellen aller Tiere einer Versuchsgruppe sowie die Standardabweichung.



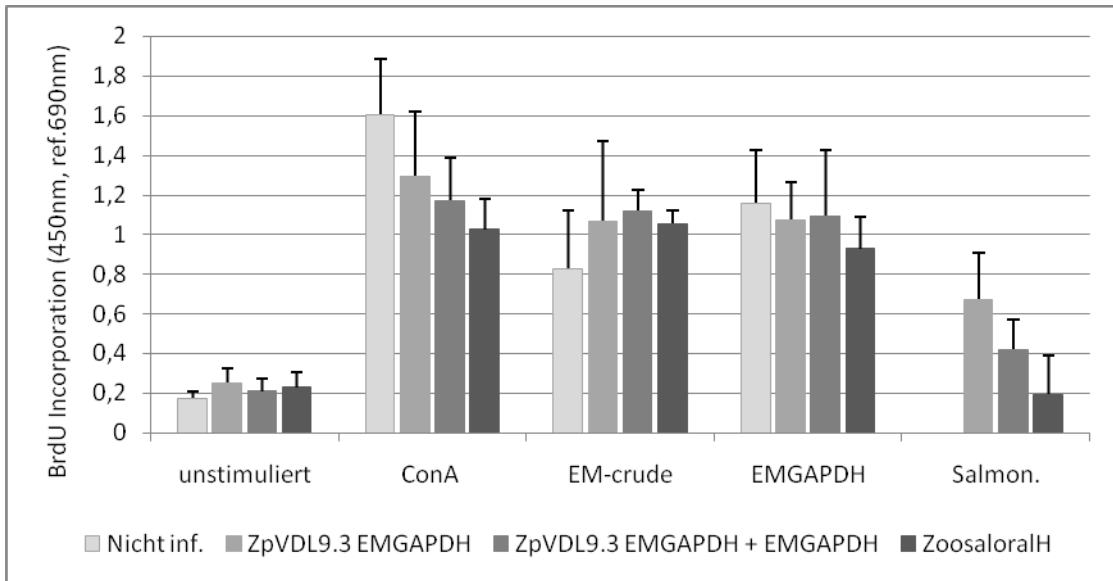


Abb. 4.8.3e Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Versuch 2 der Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH zum Sektionszeitpunkt. Dargestellt sind der Mittelwert aus dem Pool der Milzzellen aller Tiere einer Versuchsgruppe sowie die Standardabweichung.

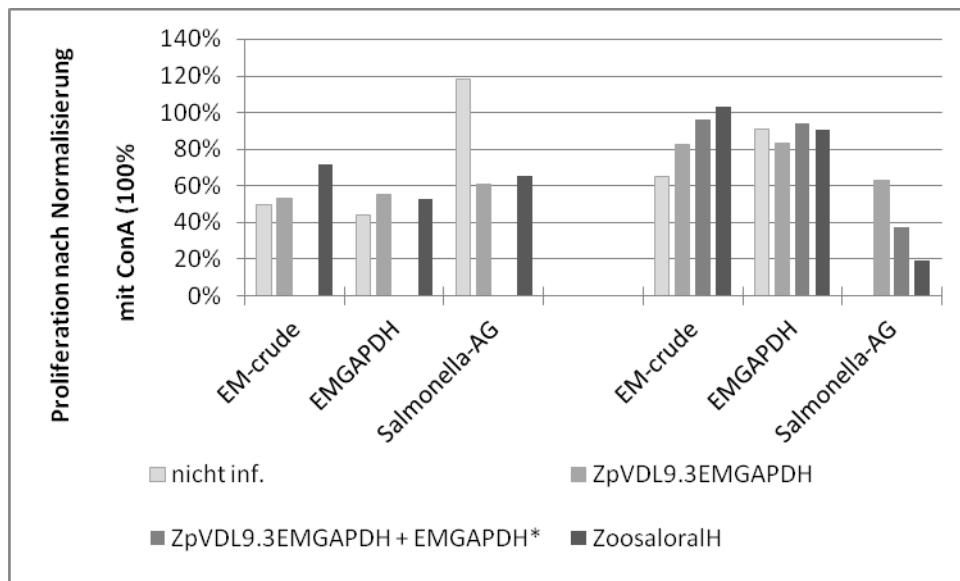


Abb. 4.8.3f Proliferation von Milzzellkulturen der Tierversuchsgruppen aus dem Immunisierungsexperiment mit ZpVDL9.3EMGAPDH (rechts 1. Studie, links 2. Studie) nach Normalisierung mit den Werten der ConA-Stimulierung. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulierung mit Gesamt-EM-Antigen (EM-crude) und EMGAPDH sowie *Salmonella*-AG der nicht infizierten, der mit ZpVDL9.3EMGAPDH-immunisierten und den mit Zoosalaral H® immunisierten Tieren in Prozent zu den ConA-stimulierten Milzzellen (100%) der einzelnen Gruppen. (\*die Versuchsgruppe ZpVDL9.3EMGAPDH mit zusätzlicher Immunisierung mit EMGAPDH wurde nur im zweiten Versuch geführt).

#### 4.8.4 Bildung von Antikörpern gegen *Salmonella* und von *Salmonella* produzierte Antigene

Bei allen mit *Salmonella typhimurium* immunisierten Mäusen konnten spezifische IgG-Gesamt-Antikörper gegen Salmonellen-Gesamt-Antigen nachgewiesen werden. Gegen die von den Salmonellen produzierten Antigene EM95 und EMGAPDH konnten weder im ersten noch im zweiten Immunisierungsversuch spezifischen Antikörper detektiert werden. Bei den durchgeführten IgG1 und IgG2A ELISA lagen die ermittelten Fluoreszenzmessungen auf dem Niveau der nicht immunisierten, nicht infizierten Kontrolltiere (Abb. 4.8.4a, b, d, e). Ein weiterhin durchgeführter Westernblot (IgG-Gesamt) bestätigte auch die Abwesenheit der Subklassen IgG2B und IgG3 (Abb. 4.8.4c und f).

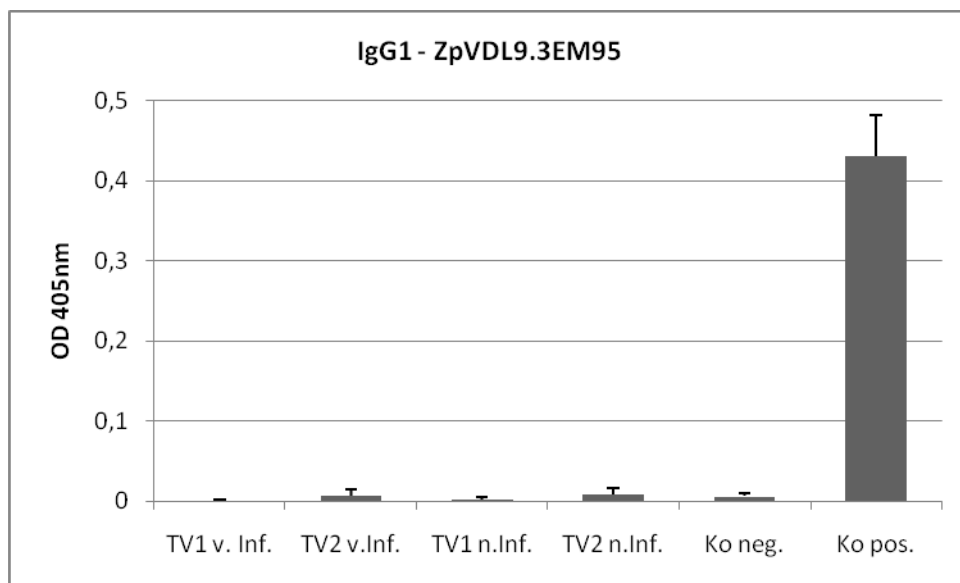


Abb. 4.8.4a EM95 spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte gepoolter Seren (4 Messungen von jeweils 4 – 6 Tieren) der mit ZpVDL9.3EM95 immunisierten Tiere vor der Infektion mit *E. multilocularis* (v.Inf.) und zum Zeitpunkt der Sektion (n.Inf.). Als Kontrollen wurde ein Pool von Seren nicht immunisierter Tiere (Ko neg.), sowie ein Pool von Seren einiger Tiere, welche s.c. mit EM95 immunisiert wurden (Ko pos.). TV = Tierversuch .

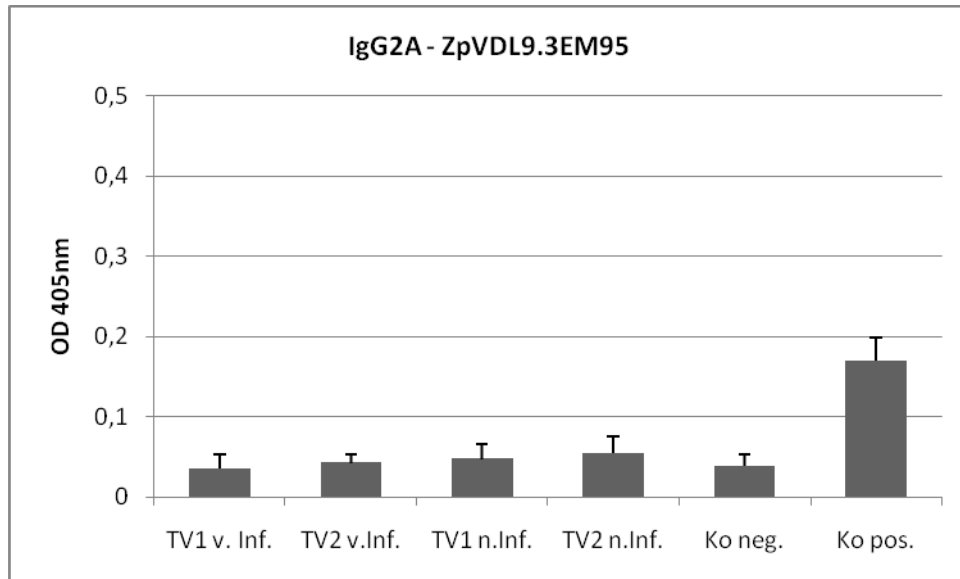


Abb. 4.8.4b EM95 spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte gepoolter Seren (4 Messungen von jeweils 4 – 6 Tieren) der mit ZpVDL9.3EM95 immunisierten Tiere vor der Infektion mit *E. multilocularis* (v.Inf.) und zum Zeitpunkt der Sektion (n.Inf.). Als Kontrollen wurde ein Pool von Seren nicht immunisierter Tiere (Ko neg.), sowie ein Pool von Seren einiger Tiere, welche s.c. mit EM95 immunisiert wurden (Ko pos.). TV = Tierversuch .

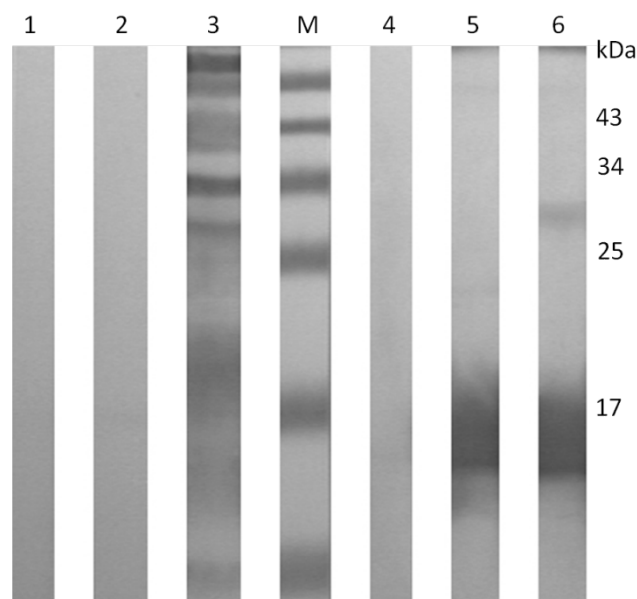


Abb. 4.8.4c Western-Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen EM95 und *Salmonella* in Sera von mit ZpVDL9.3EMGAPDH immunisierten Mäusen. 1, 2 Pool von Sera gegen EM95. 3 Pool von Sera gegen Gesamt-*Salmonella*-Antigen. 5, 6 Pool von Sera gegen EM95 Kontrolle (subkutan immunisierte Mäuse).

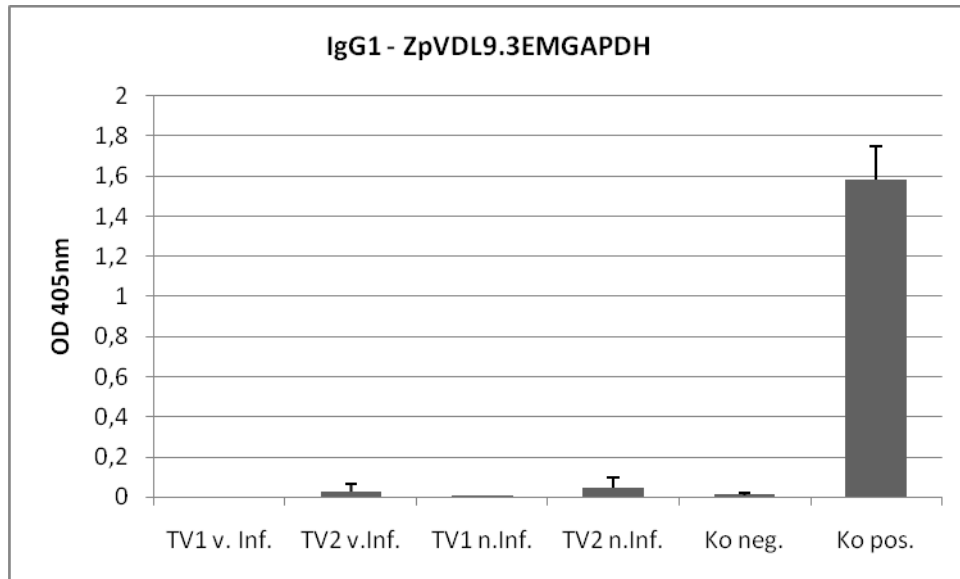


Abb. 4.8.4d EMGAPDH spezifischer IgG1 Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte gepoolter Seren (4 Messungen von jeweils 4 – 6 Tieren) der mit ZpVDL9.3EMGAPDH immunisierten Tiere vor der Infektion mit *E. multilocularis* (v.Inf.) und zum Zeitpunkt der Sektion (n.Inf.). Als Kontrollen wurde ein Pool von Seren nicht immunisierter Tiere (Ko neg.), sowie ein Pool von Seren einiger Tiere, welche s.c. mit EMGAPDH immunisiert wurden (Ko pos.). TV = Tierversuch

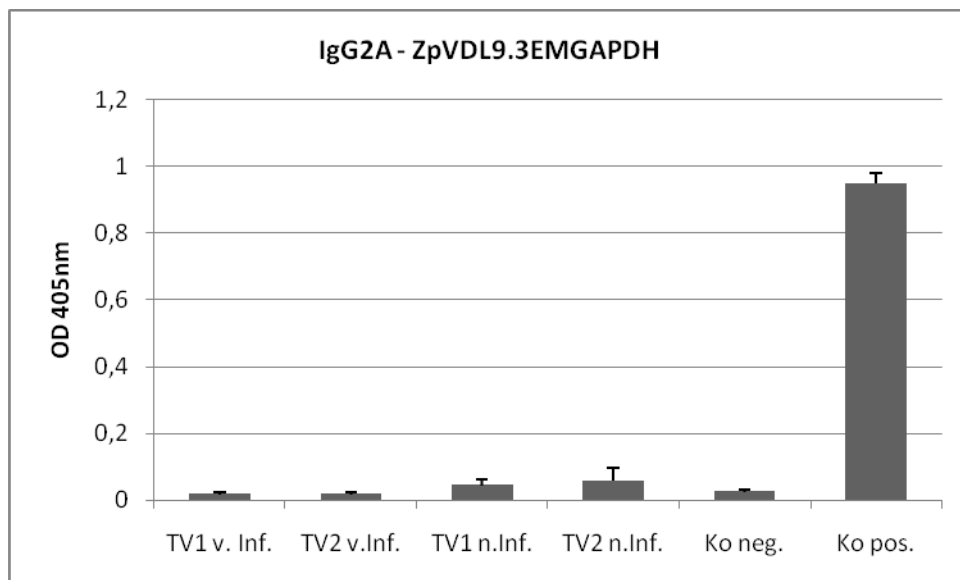


Abb. 4.8.4e EMGAPDH spezifischer IgG2A Subklassen-ELISA. Gezeigt sind die Extinktionswerte gepoolter Seren (4 Messungen von jeweils 4 – 6 Tieren) der mit ZpVDL9.3EMGAPDH immunisierten Tiere vor der Infektion mit *E. multilocularis* (v.Inf.) und zum Zeitpunkt der Sektion (n.Inf.). Als Kontrollen wurde ein Pool von Seren nicht immunisierter Tiere (Ko neg.), sowie ein Pool von Seren einiger Tiere, welche s.c. mit EMGAPDH immunisiert wurden (Ko pos.). TV = Tierversuch

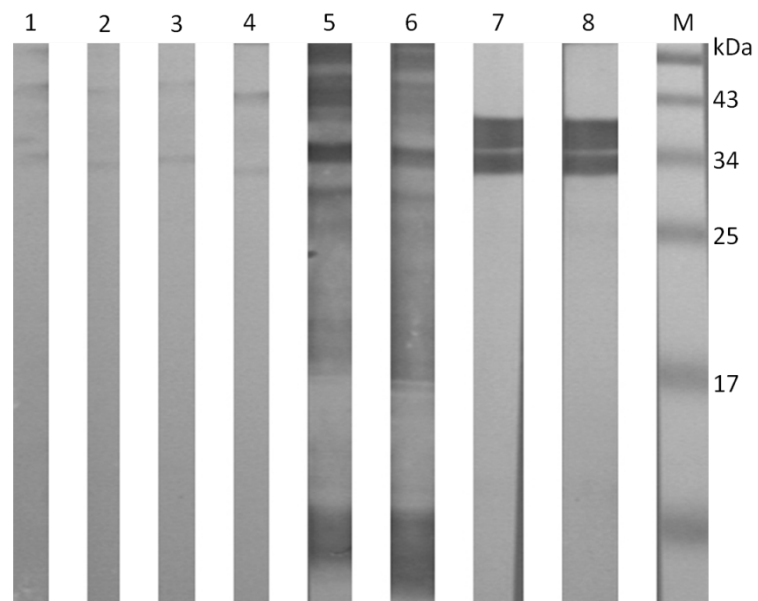


Abb. 4.7.4f Western-Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen EMGAPDH und *Salmonella* in Sera von mit ZpVDL9.3EMGAPDH immunisierten Mäusen. 1-4 Pool von Sera gegen EMGAPDH. 5, 6 Pool von Sera gegen Gesamt-*Salmonella*-Antigen. 7, 8 Pool von Sera gegen EMGAPDH Kontrolle (subkutan immunisierte Mäuse).

#### 4.9 post infectionem Immunisierung mit EM95

Zur Überprüfung des Einflusses der Immunisierung mit EM95 auf eine bereits bestehende Infektion wurden 10 neun Wochen alte BalbC-Mäuse zu den Zeitpunkten 4dpi, 7dpi, 24dpi und 60dpi mit 20µg EM95 plus 50µg Saponin subkutan immunisiert (analog den Immunisierungsstudien mit rekombinanten Antigenen, eine Grundimmunisierung und ein Boost nach 14 Tagen). Die Infektionsdosis betrug 4000 *E. multilocularis* – Eier. Als Kontrolle wurden 5 infizierte, nicht immunisierte Tiere mitgeführt. Vier Wochen nach der letzten Immunisierung erfolgte die Sektion.

In keinem dieser vier Versuchsgruppen konnte eine signifikante Verringerung der Läsionen festgestellt werden. Die gebildeten Metazestoden unterschieden sich bei allen immunisierten Gruppen weder in Form noch Größe von den nicht immunisierten Kontrolltieren. Die *post-infectionem* Immunisierung mit dem rekombinanten Antigen EM95 hatte somit unabhängig von dem Immunisierungszeitpunkt keine Auswirkung auf die sich bildenden Läsionen (Abb. 4.9, Tabelle 4.9).

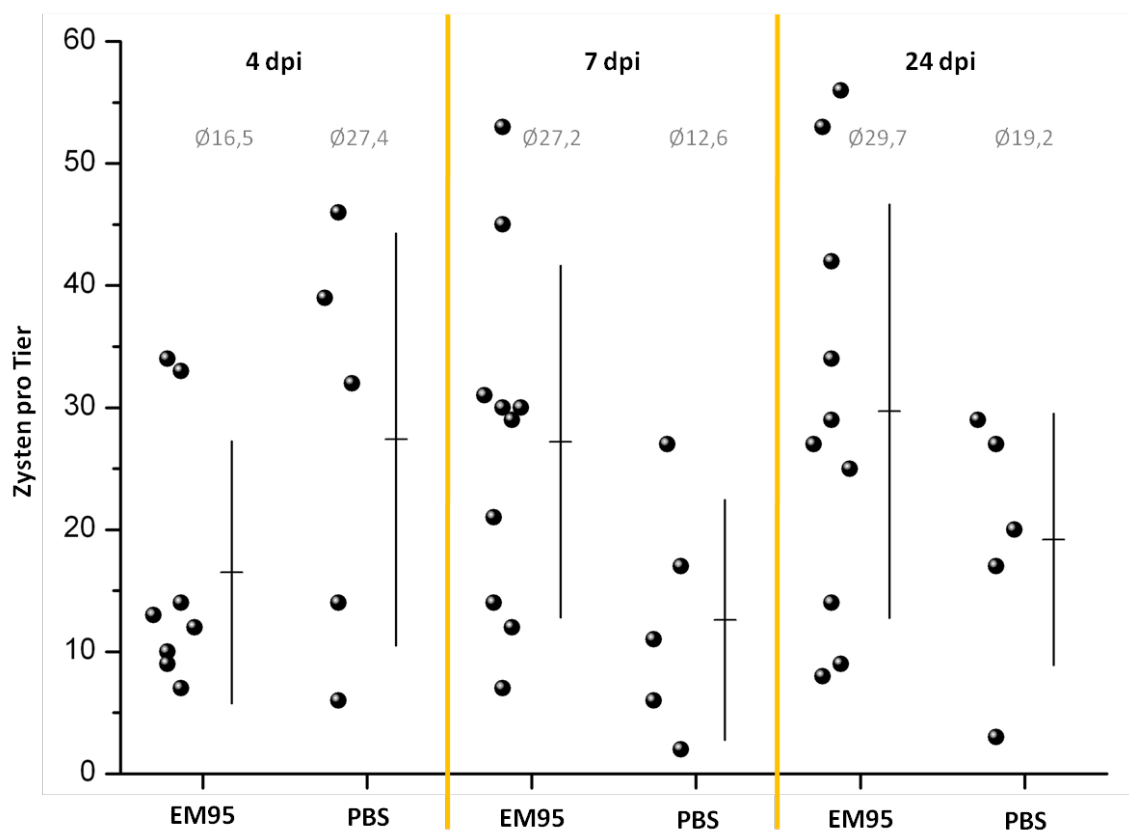


Abb. 4.9 Läsionen nach *post-infectionem* Immunisierung mit EM95. Dargestellt sind die Gruppen der Immunisierungszeitpunkte 4dpi, 7dpi und 21dpi. Nach 60dpi konnten durch die Größe der Metazestoden keine Einzelzysten gezählt werden. Abgebildet sind die Leber-Läsionen (Zysten pro Tier), sowie die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Tab.4.9 Durchschnittliche Anzahl und Größe der Metazestoden (in Gruppen) nach *post-infectionem* Immunisierung mit EM95.

|       |      | Läsionen (Ø)  | < 2mm | 2 – 5mm | >5mm |
|-------|------|---|-------|---------|------|
| 4dpi  | EM95 | 16,5  | 100%  | -       | -    |
|       | Ko   | 27,5  | 100%  | -       | -    |
| 7dpi  | EM95 | 27,2  | 100%  | -       | -    |
|       | Ko   | 12,6  | 100%  | -       | -    |
| 24dpi | EM95 | 29,7  | 92%   | 7%      | 1%   |
|       | Ko   | 19,2  | 81%   | 13%     | 6%   |
| 60dpi | EM95 | Aufgrund miteinander verwachsener Zysten<br>keine Zählung/Messung möglich |       |         |      |
|       | Ko   |   |       |         |      |

#### 4.10 Bildung von IgG-Antikörpern gegen *Echinococcus multilocularis* – Gesamtantigene

In den durchgeführten Immunisierungsstudien (*prae-infectionem*) konnte aufgrund der kurzen Infektionsdauer (4 Wochen, Frühphase der Infektion) in keiner der hier untersuchten, mit *E. multilocularis* infizierten Versuchsgruppen eine IgG-Antikörperbildung gegen *E. multilocularis* – Gesamtantigenen (EM-crude) belegt werden. Zum Zeitpunkt der Sektion blieben die IgG-Titer sowohl der nicht immunisierten, infizierten Tiere, als auch der IgG-Titer der immunisierten Tiere (nach Belastungsinfektion) auf dem Niveau der nicht infizierten Kontrolltiere. Eine Bildung von IgG-Antikörper gegen Gesamtantigene von *E. multilocularis* erfolgte, wie die Auswertung infizierten Kontrolltiere der *post infectionem* Immunisierung zeigte, erst nach 6 Wochen Infektionsdauer (Abb. 4.10a).

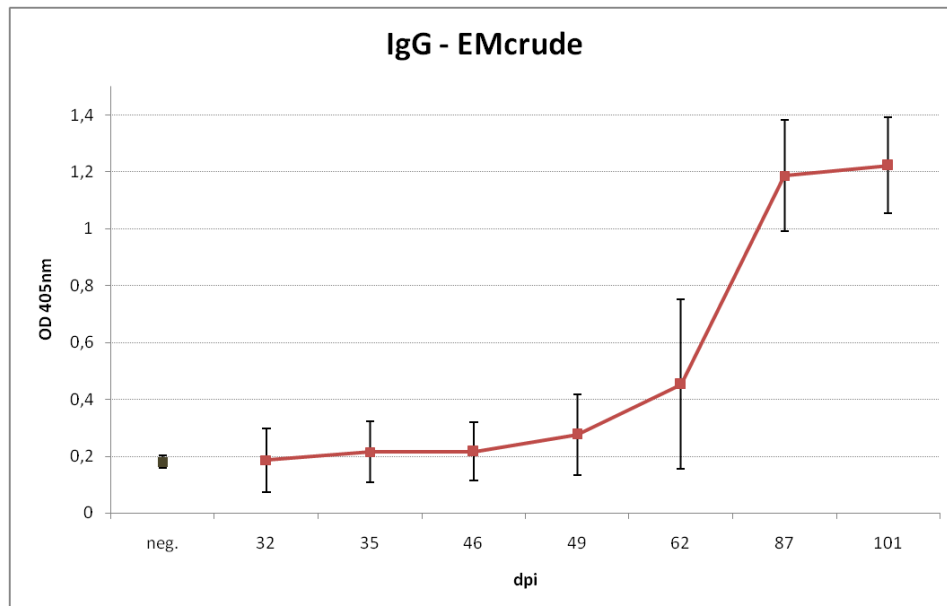


Abb. 4.10.a IgG-ELISA mit *E. multilocularis* – Gesamtantigenen. Dargestellt ist der Mittelwert von dem Antikörpertiter in den Sera der infizierten Kontrolltiere (Blutentnahme bzw. Sektionszeitpunkt) des *post infectionem* Versuchs (4.9). Als negativ-Kontrolle (neg.) diente das Serum der Mäuse vor der Infektion.



#### 4.11 Expression von IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ und IL-10 nach 46, 49, 62 und 101 Tagen Infektionsdauer mit *E. multilocularis*

Im Rahmen des *post infectionem* Versuches wurden die infizierten Kontrolltiere (n = 5) hinsichtlich der Expressionsunterschiede der Zytokine IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  und IL-10 im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren untersucht. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der Software REST09© (siehe 3.4).

##### IFN $\gamma$

Eine Regulierung von IFN $\gamma$  konnte im Gegensatz zu dem zweiten Immunisierungsversuch (4.6.3) bei dem die BALB/c-Mäuse 30 Tage mit *E. multilocularis* infiziert waren, nach längerer Infektionsdauer nicht mehr detektiert werden. Trotz eines stetigen Anstiegs in der Expression dieses Zytokins (vgl. Tab.4.11.a–d – Expression IFN $\gamma$ ) sind die erhaltenen Daten nicht signifikant gegenüber den nicht infizierten Kontrolltieren.

##### TGF $\beta$

Die Expression von TGF $\beta$  wird nach einer längeren Infektionsdauer deutlich herunter reguliert. Nach 46, 62 und 101 Tagen ist diese Regulation signifikant gegenüber der nicht infizierten Kontrollgruppe (Tab.4.11.a–d).

##### IL-10

Signifikante Expressionsunterschiede von IL-10 konnten in den hier untersuchten Versuchsgruppen nur nach 49 dpi gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Expression von IL-10 in der untersuchten Versuchsgruppe hoch reguliert.

Tab. 4.11a Berechnung der relativen Quantifizierung (REST09©) zur Unterscheidung der Expression von TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-10 nach 42 dpi im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren. (REF = Referenz-Gen; TRG = Zielgen (target); P(H1) = Wahrscheinlichkeit das Alternativhypothese zutrifft bzw. Signifikanz; Nullhypothese und Alternativhypothese disjunkt).

| Gen            | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error     | 95% C.I.        | P(H1) | Ergebnis |
|----------------|-----|-----------|------------|----------------|-----------------|-------|----------|
| $\beta$ -actin | REF | 0,8158    | 1,000      |                |                 |       |          |
| IFN $\gamma$   | TRG | 0,8077    | 0,003      | 0,000 - 0,050  | 0,000 - 0,129   | 0,000 | DOWN     |
| TGF $\beta$    | TRG | 0,6939    | 0,296      | 0,004 - 14,331 | 0,000 - 103,010 | 0,599 | -        |
| IL-10          | TRG | 0,95      | 0,648      | 0,086 - 3,307  | 0,055 - 20,178  | 0,666 | -        |

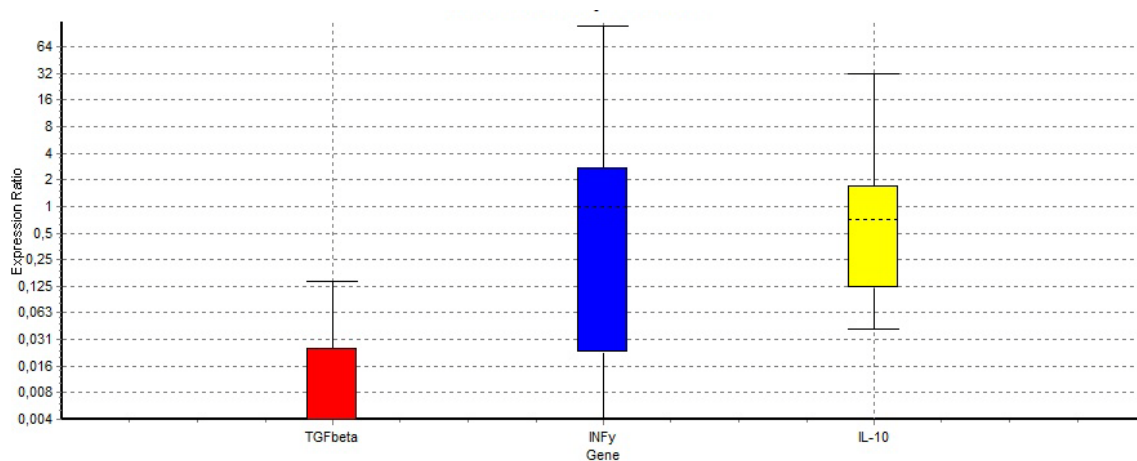


Abb. 4.11a Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von infizierten Mäusen mit einer Infektionsdauer von 42dpi und einer nicht infizierten Kontrollgruppe. Box entspricht Interquartilsabstand (mittlere 50% der Daten), punktierte Linie entspricht dem Median der Gen-Expression, Whisker repräsentiert Spannweite der Daten.

Tab. 4.11b Berechnung der relativen Quantifizierung (REST09©) zur Unterscheidung der Expression von TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-10 nach 49 dpi im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren. (REF = Referenz-Gen; TRG = Zielgen (target); P(H1) = Wahrscheinlichkeit das Alternativhypothese zutrifft bzw. Signifikanz; Nullhypothese und Alternativhypothese disjunkt).

| Gen            | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error     | 95% C.I.        | P(H1) | Ergebnis |
|----------------|-----|-----------|------------|----------------|-----------------|-------|----------|
| $\beta$ -actin | REF | 0,8158    | 1,000      |                |                 |       |          |
| IFN $\gamma$   | TRG | 0,8077    | 0,008      | 0,001 - 0,167  | 0,000 - 0,339   | 0,006 | DOWN     |
| TGF $\beta$    | TRG | 0,6939    | 2,012      | 0,015 - 68,893 | 0,002 - 256,307 | 0,699 |          |
| IL-10          | TRG | 0,95      | 6,347      | 1,512 - 24,841 | 0,832 - 69,301  | 0,019 | UP       |

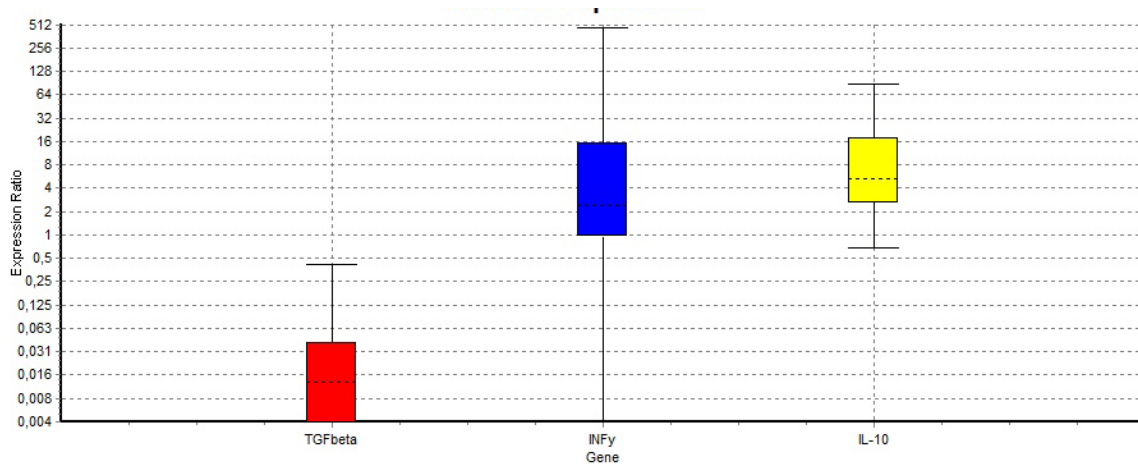


Abb. 4.11b Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von infizierten Mäusen mit einer Infektionsdauer von 49dpi und einer nicht infizierten Kontrollgruppe. Box entspricht Interquartilsabstand (mittlere 50% der Daten), punktierte Linie entspricht dem Median der Gen-Expression, Whisker repräsentiert Spannweite der Daten.

Tab. 4.11c Berechnung der relativen Quantifizierung (REST09©) zur Unterscheidung der Expression von TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-10 nach 62 dpi im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren. (REF = Referenz-Gen; TRG = Zielgen (target); P(H1) = Wahrscheinlichkeit das Alternativhypothese zutrifft bzw. Signifikanz; Nullhypothese und Alternativhypothese disjunkt).

| Gen            | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error      | 95% C.I.          | P(H1) | Ergebnis |
|----------------|-----|-----------|------------|-----------------|-------------------|-------|----------|
| $\beta$ -actin | REF | 0,8158    | 1,000      |                 |                   |       |          |
| IFN $\gamma$   | TRG | 0,8077    | 0,218      | 0,008 - 5,444   | 0,001 - 255,787   | 0,404 | -        |
| TGF $\beta$    | TRG | 0,6939    | 29,612     | 0,362 - 927,483 | 0,027 - 5.768,915 | 0,126 | -        |
| IL-10          | TRG | 0,95      | 1,896      | 0,307 - 15,458  | 0,078 - 40,265    | 0,480 | -        |

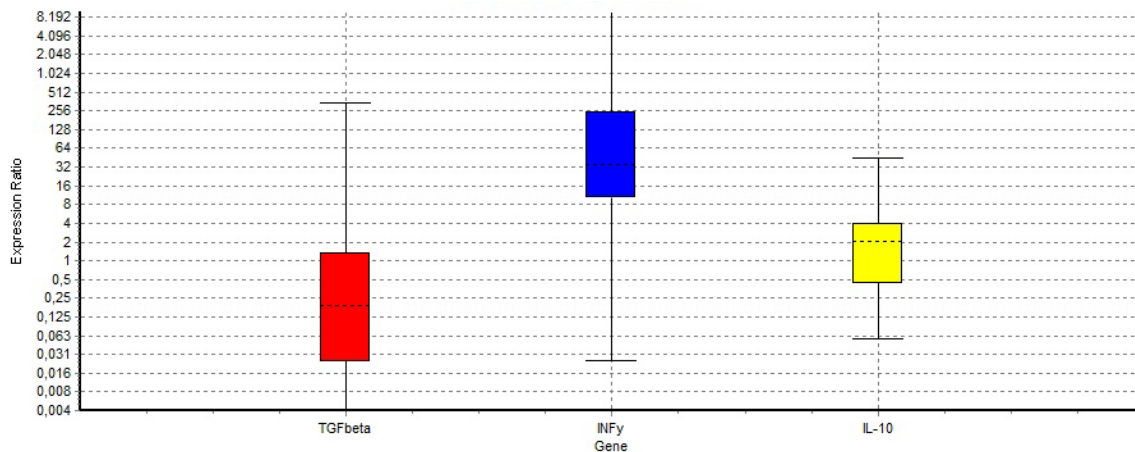


Abb. 4.11c Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von infizierten Mäusen mit einer Infektionsdauer von 62 dpi und einer nicht infizierten Kontrollgruppe. Box entspricht Interquartilsabstand (mittlere 50% der Daten), punktierte Linie entspricht dem Median der Gen-Expression, Whisker repräsentiert Spannweite der Daten.

Tab. 4.11d Berechnung der relativen Quantifizierung (REST09©) zur Unterscheidung der Expression von TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  und IL-10 nach 101 dpi im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren. (REF = Referenz-Gen; TRG = Zielgen (target); P(H1) = Wahrscheinlichkeit das Alternativhypothese zutrifft bzw. Signifikanz; Nullhypothese und Alternativhypothese disjunkt).

| Gen            | Typ | Effizienz | Expression | Std. Error      | 95% C.I.          | P(H1) | Ergebnis |
|----------------|-----|-----------|------------|-----------------|-------------------|-------|----------|
| $\beta$ -actin | REF | 0,8158    | 1,000      |                 |                   |       |          |
| IFN $\gamma$   | TRG | 0,8077    | 0,009      | 0,000 - 0,101   | 0,000 - 0,179     | 0,003 | DOWN     |
| TGF $\beta$    | TRG | 0,6939    | 7,509      | 0,060 - 224,795 | 0,006 - 1.597,063 | 0,276 |          |
| IL-10          | TRG | 0,95      | 3,895      | 0,311 - 42,722  | 0,166 - 119,821   | 0,210 |          |

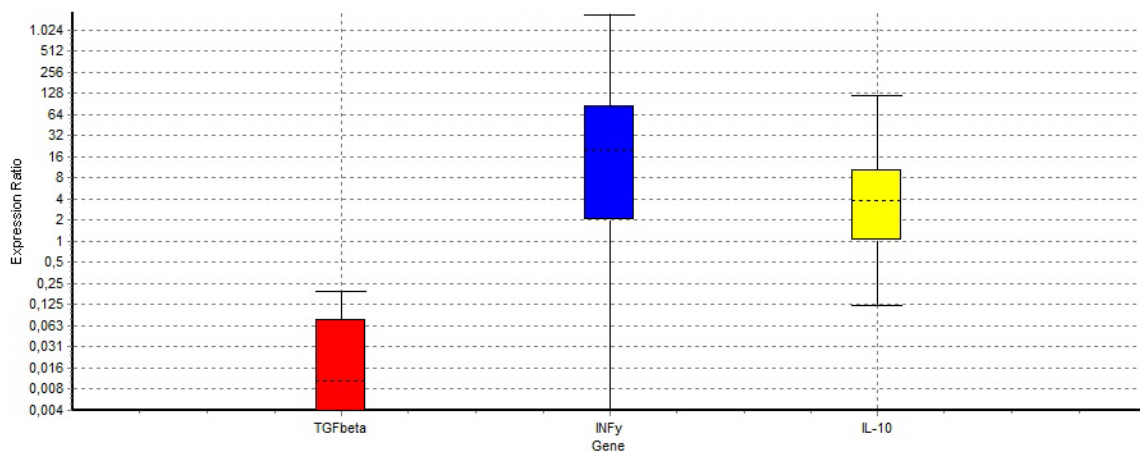


Abb. 4.11c Expressionsverhältnisse der untersuchten Zytokine von infizierten Mäusen mit einer Infektionsdauer von 101 dpi und einer nicht infizierten Kontrollgruppe. Box entspricht Interquartilsabstand (mittlere 50% der Daten), punktierte Linie entspricht dem Median der Gen-Expression, Whisker repräsentiert Spannweite der Daten.

## 5 Diskussion

*Echinococcus multilocularis* ist ein nahezu über die gesamte nördliche Hemisphäre verbreiteter Parasit. Die Larvalstadien dieses Zestoden verursachen beim Menschen das Krankheitsbild der alveolären Echinokokkose (AE), welches laut WHO die gefährlichste parasiten-induzierte Zoonose in Mitteleuropa darstellt. Trotz der hohen Prävalenz der Endwirte (v.a. *Vulpes vulpes*) und des damit verbundenen hohen Expositionsrisikos erkranken nur sehr selten Personen in Endemiegebieten tatsächlich an einer alveolären Echinokokkose (Eckert & Deplazes, 2004). Die ansteigende Prävalenz im Endwirt Fuchs in Verbindung mit der Existenz stabiler urbaner Fuchspopulationen erhöht jedoch den Infektionsdruck für den Menschen (Romig, 2009).

### 5.1 Primäre und sekundäre Alveoläre Echinokokkose

Für die Durchführung von Studien zur Biologie von *E. multilocularis* kommen verschiedene Systeme der Infektion zur Anwendung, was eine einheitliche Darstellung der bisherigen Erkenntnisse erschwert. Die am häufigsten durchgeführte Infektionsmethode ist das Modell der sogenannten sekundären Echinokokkose, bei welcher Metazestodengewebe (bzw. -homogenat) oder Zysten intraperitoneal (Ohnishi & Kutsumi, 1995; Romig & Bilger, 1999), intrahepatisch (Guerret *et al.*, 1998; Liance *et al.*, 1984), intracranial (Sato *et al.*, 1998), subkutan (Alkarmi *et al.*, 1994) oder transportal (Nakaya *et al.*, 1997) appliziert wird. Der Vorteil dieses experimentellen Systems liegt in der leichten Durchführbarkeit und dem Fehlen des Infektionsrisikos für den Menschen. Der wesentliche Nachteil dieser sekundären alveolären Echinokokkose liegt in der völligen Ausklammerung der frühen Infektionsstadien und der damit verbundenen Vernachlässigung von möglichen Auswirkungen der Infektionsroute auf die Immunreaktionen. Zudem sind aufgrund der unnatürlichen Lokalisation der Metazestoden (ausgenommen die transportale Injektion) eine Interpretation und der Vergleich mit einer natürlichen Infektion nur begrenzt möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der primären AE, d.h. die orale Infektion von Zwischenwirten mit *E. multilocularis* – Eiern eingesetzt, welches dem natürlichen Infektionsweg entspricht. Dieses Modell erfordert jedoch aufgrund der Humanpathogenität der infektiösen Eier strenge Sicherheitsvorkehrungen und wird daher in Deutschland nur unter L3-Bedingungen genehmigt. Daher basiert nur ein sehr geringer Teil der bisher durchgeführten Studien zur *Echinococcus multilocularis* – Biologie auf dem Modell der primären alveolären Echinokokkose in Mäusen (Bauder *et al.*, 1999; Gauci *et al.*, 2002; Pater *et al.*, 1998). Die Isolierung der benötigten infektiösen Eier des Parasiten setzt einen enormen arbeitstechnischen Aufwand voraus. Die Möglichkeit, infektiöse Fuchsbandwurm-Eier durch die Infektion von Laborhunden bzw. Füchsen zu gewinnen, ist aufgrund gesetzlicher Vorgaben und der damit verbundenen Auflagen nicht realisierbar. Ein weiterer Weg, *E. multilocularis*-Eier zu erhalten, besteht in der oralen Infektion von mit Corticosteroiden behandelten Hamstern oder

Meriones. Diese sind nach einer Behandlung mit dem Immunsuppressivum Prednisolon in der Lage, strobilierte und zur sexuellen Reife entwickelte Echinokokken zu beherbergen (Kamiya & Sato, 1990). Die Anzahl der Würmer und der gebildeten Eier ist jedoch sehr gering und für umfangreiche Infektionsversuche, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, nicht ausreichend. Daher wurden die benötigten infektiösen Echinokokken-Eier aus den Därmen erlegter Füchsen (*Vulpes vulpes*) isoliert, welche in einem L3-Sicherheitslabor mit thermischer Dekontaminationseinrichtung seziert wurden. Somit kamen in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Eier aus wildlebenden, natürlich infizierten Füchsen zum Einsatz. Die Beschaffung der Füchse bzw. der Fuchsdärme war nur durch die Kooperation mit einheimischen Jägern und/oder mit veterinärmedizinischen Instituten möglich. Trotz der hohen Prävalenz von *E. multilocularis* in Füchsen aus Süddeutschland konnte nur ein Bruchteil der bei Sektionen isolierten Eier zu Tierversuchen verwendet werden. Die Voraussetzungen waren Massenbefall und eine hinlängliche Infektiosität der erhaltenen Eicharge, welche in einem Vorversuch ermittelt werden musste. Von über 1600 untersuchten Füchsen bzw. Fuchsdärmen konnten in einem Zeitraum von 4 Jahren nur 7 Eichargen mit ausreichender Infektiosität erhalten werden. Dieser Aufwand ist jedoch gerechtfertigt, da nur die primäre AE dem natürlichen Infektionsverlauf entspricht und nur mit dieser Methode verschiedene Aspekte hinsichtlich der Immunantwort während des gesamten Verlaufes einer Infektion untersucht und erklärt werden können.

Zwischen den Infektionsmodellen der sekundären und primären AE bestehen beachtliche Unterschiede hinsichtlich der Immunantwort, wobei zudem die Verwendung von verschiedenen Mausstämmen eine Interpretation von den bisher durchgeführten Studien zusätzlich erschwert. So konnten beispielsweise bei dem als *Echinococcus*-unempfindlich eingestuftem Mausstamm C57BL/10J nach intraperitonealer Infektion hohe IgG1 und IgG3 – Titer nachgewiesen werden, während bei dem als empfänglich charakterisierten Mausstamm C57BL/6J keine spezifischen Antikörper detektiert werden konnten (Gottstein *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse wurden nach oraler Infektion nicht bestätigt, beide Mausstämme zeigten einen ähnlichen Titerverlauf (Bauder *et al.*, 1999). Eine Korrelation zwischen Parasitenlast und Antikörpertiter, welche nach intraperitonealer Infektion von BALB/c – Mäusen abgeleitet wurde (Kroeze & Tanner, 1987), konnte ebenfalls nach oraler Infektion weder in früheren noch in der vorliegenden Arbeit gefunden werden (Merli, 2001; Pater *et al.*, 1998). Desweiteren scheint eine generalisierte Immunsuppression, im Speziellen die Suppression der zellvermittelten Immunität durch *E. multilocularis* bei dem Modell der sekundären AE eine besondere Bedeutung zuzukommen (Emery *et al.*, 1997; Kizaki *et al.*, 1991). Die Ergebnisse variieren jedoch entsprechend dem angewendeten Infektionsmodell der sekundären AE. Während nach intraperitonealer Infektion eine NO-abhängige, also von Makrophagen vermittelte, unabhängig vom IL-10-Titer zelluläre Suppression erfolgt (Dai & Gottstein, 1999), ist nach intrahepatischer Infektion das Bild genau umgekehrt. Hier korreliert die zelluläre Suppression mit einem erhöhten IL-10 Titer ohne Anstieg der NO-Produktion (Emery *et al.*, 1996). Mit der Anwendung der primären AE in dieser Arbeit waren

eine Suppression der Proliferation der Milzzellen 4 Wochen nach Infektion (wpi) nicht zu erkennen. Ähnliche Resultate wurden auch in der Arbeit von Merli (2001) erzielt. Die zelluläre Suppression scheint daher ein Phänomen der sekundären AE zu sein oder setzt bei der primären AE erst zu einem späteren Zeitpunkt ein. Auch bestehen bezüglich des Zytokinmusters und der Zytokinexpression Unterschiede zwischen dem sekundären und primären Infektionsmodells (Bauder, 1998). Allein durch die Anwendung unterschiedlicher Applikationsformen von Metazestodengewebe im Modell der sekundären AE können verschiedene Zytokinexpressionen festgestellt werden. So wurde z.B. nach intrahepatischer Inokulation von Metazestodengewebe generell ein Absinken des Zytokinspiegels beobachtet (Emery *et al.*, 1996), wohingegen nach intraperitonealer Inokulation ein stetiger Anstieg mit Fortdauer der Infektion zu verzeichnen war (Haralabidis *et al.*, 1995). Analogien in den Infektionsmodellen bestehen jedoch hinsichtlich des Wachstums des Metazestoden. Sowohl bei der primären, als auch bei der sekundären AE ist ein biphasisches Wachstumsmuster zu erkennen. Dabei wird eine restriktive Phase (relativ langsames Wachstum in den ersten 4 Wochen) von einer progressive Phase getrennt (Vuitton, 2003).

## 5.2 Geeignete Mausstämme

Für die Durchführung und Auswertung dieser Arbeit war es wichtig, einen geeigneten Mausstamm zu verwenden. In verschiedenen Studien wird zwischen empfänglicheren und resistenteren Mausstämmen unterschieden, wobei die Erkenntnisse dieser Arbeiten weitestgehend auf dem Modell der experimentellen (= sekundären) AE basieren (Alkarmi & Ali-Khan, 1984; Bauder, 1998; Bresson-Hadni *et al.*, 1990; Gottstein *et al.*, 1994; Liance *et al.*, 1990). Sogenannte „empfängliche“ Mausstämme (C57BL/6J, AKR) zeigen ein verstärktes Wachstum von Metazestodengewebe mit vielen Protoskolizes, einhergehend mit einem niedrigen bzw. nicht messbaren Antikörpertiter. In den als „resistent“ bezeichneten Mausstämmen (C57 BL/10, A/J) wird hingegen wenig Parasitengewebe mit kaum Protoskolizes gebildet. Zudem zeigen diese eine ausgeprägte Antikörper-Produktion, bilden im Gegensatz zu den „empfänglichen“ Mausstämmen eine frühe, gut organisierte Fibrose aus und scheinen dadurch die Entwicklung des Zestoden besser kontrollieren zu können (Gottstein & Felleisen, 1995; Vuitton, 2003). Kamiya *et al.* (1980) konnten durch die Transplantation von *E. multilocularis* – Zysten in kongenitale Nacktmäuse (BALB/cA-nu/nu: JCL) sowie in heterozygote Kontrollmäuse (BALB/cA+/nu: JCL) zeigen, dass eine Resistenz gegen *E. multilocularis*-Infektionen auch thymusabhängig ist. Zudem spielen auch funktionale Lymphozyten hinsichtlich der Resistenz eine entscheidende Rolle, wie Playford *et al.* (1992) durch vergleichende Sekundärinfektionen mit SCID-Mäusen (C.B17) zeigen konnte.

Die in dieser Arbeit verwendeten BALB/c-Mäuse zeigen zum einen eine sichere Empfänglichkeit, dennoch ist 4 Wochen *post infectionem* eine quantitative Auswertung der gebildeten Zysten möglich. Der Prozentsatz der sich entwickelnden Zysten von den oral verabreichten



*E. multilocularis* – Eiern variiert in BALB/c-Mäusen zwischen 0,5% (vorliegende Arbeit) und 1,5% (Bilger, 1999). Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt der für die Verwendung dieses Mausstammes sprach, ist die Vergleichbarkeit mit ähnlichen Arbeiten (primäre AE, Immunantworten), welche zur Interpretation der Ergebnisse herangezogen wurden (Bilger, 1999; Merli, 2001; Müller-Schollenberger, 1995).

### 5.3 Immunantworten nach *E. multilocularis* – Infektion

Eine generelle Immunantwort auf eine *E. multilocularis* Infektion lässt sich aufgrund der oft widersprüchlichen Resultate verschiedener Arbeitsgruppen, selbst bei Einsatz gleicher Mausstämme nur schwer beschreiben. Die Gründe sind vor allem in der Anwendung ungleicher Inokulationswege zu erklären. Auch die Menge des eingesetzten Parasitenmaterials und die verwendete Charge (Infektiosität) können einen erheblichen Einfluss auf die Immunreaktionen des untersuchten Organismus haben (Bilger, 1999; Dematteis *et al.*, 2003; Veit *et al.*, 1995).

Eine Antikörper-Bildung (IgG) gegen *Echinococcus multilocularis* Gesamt-Antigene konnte in der hier durchgeführten Arbeit nur im Rahmen der *post infectionem* Versuche, nach einer Infektionsdauer von 6 bis 7 Wochen detektiert werden. Bei der Durchführung der Immunisierungsstudien betrug die Infektionsdauer aufgrund der Auswertbarkeit des protektiven Potentials (Zählbarkeit der gebildeten Läsionen) 4 Wochen. In diesem Zeitraum (frühe Phase der Infektion) konnte in keinem der infizierten Tiere IgG-Antikörper gegen *E. multilocularis* detektiert werden. Spezifische IgM-Antikörper-Antworten auf eine orale Infektion mit *E. multilocularis* wurden in allen vorangegangenen Arbeiten erst nach frühestens 4-6 Wochen *post infectionem* (wpi) detektiert (Merli, 2001). Pater *et al.* (1998) konnten zwar 2 Wochen nach oraler Infektion von BALB/c-Mäusen spezifische IgA und IgG Antikörper nachweisen, jedoch nur in Intestinalauswaschungen und nicht im Serum. Auch sehr empfängliche Mausstämme, wie AKR-Mäuse zeigen diese späte Antikörper-Antworten (Matsumoto *et al.*, 1998). Es scheint wahrscheinlich, dass nach oraler Infektion die Onkosphäre auf ihrer Wanderung zur Leber keine B-Zellen aktiviert oder die maßgeblichen Immunkomponenten (MHC2-Komponenten, Th-Zellen) von dem Parasiten manipuliert werden. Nach Ausbildung der Laminarschicht ist der etablierte Metazestode vorläufig geschützt, bis verschiedene entzündliche Prozesse zu einem Absterben einiger Metazestoden führen oder diese aufgrund nicht näher bekannter Entwicklungsgänge selbständig degenerieren. Erst nach dieser Zeit ist der Kontakt zu B-Zellen vorhanden und eine Produktion von Immunoglobinen durch Plasmazellen ist gegeben (Gottstein & Hemphill, 2008). Humane AE-Patienten weisen jedoch ausgeprägte Antikörper gegen *E. multilocularis* auf, jedoch scheinen diese die Laminarschicht nicht zu durchdringen, da der Antikörpertiter nicht mit einem Infektionsschutz korreliert (Ali-Khan & Siboo, 1981; Gottstein & Hemphill, 1997). Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass humorale Immunantworten nach Etablierung des Metazestoden und die damit verbundene Ausbildung der Laminarschicht einen geringen Einfluss auf das Wachstum

des Parasiten haben (Rogan & Craig, 1997). Diese Aussage bleibt jedoch auf die frühe Phase der Infektion beschränkt, da in dem hier angewendeten Modell nach 6 – 7 wöchiger Infektionsdauer eine ausgeprägte Antikörper-Produktion einsetzt. Die in dieser Arbeit festgestellte verminderte Expression von TGF $\beta$  zu den gleichen Zeitpunkten der Infektion lässt auf eine starke, wenn auch späte humorale Immunantwort schließen. TGF $\beta$  hat einen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation und Maturation von B-Lymphozyten.

Einige Studien gehen von einer stärkeren Bedeutung der zellulären Immunität aus (Bresson-Hadni *et al.*, 1990; Playford & Kamiya, 1992). Eine generalisierte Immunsuppression, im speziellen jedoch die Suppression der zellvermittelten Immunität durch den Parasiten scheint zumindest bei dem Modell der sekundären AE eine besondere Bedeutung zuzukommen (Dai & Gottstein, 1999; Emery *et al.*, 1997; Kizaki *et al.*, 1991). In dieser Arbeit war eine Suppression der Proliferation der Milzzellen nach Stimulation mit dem Mitogen ConcanvalinA (ConA) 4 wpi nicht zu erkennen. Im Gegensatz dazu war bei allen Versuchen die Proliferationsrate der Milzzellen von den infizierten Tieren sehr hoch. Das gleiche Ergebnis wurde nach Stimulation mit dem Gesamt – *E. multilocularis* – Antigen erzielt. Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch die Arbeiten von Merli (2001), Walker *et al.* (2004) und Traub (2004). Die zelluläre Suppression scheint daher ein Phänomen der sekundären AE zu sein oder setzt bei der primären AE erst zu einem späteren Zeitpunkt ein. Diese Annahme konnte in einer vergleichbaren Studie anhand von CD8<sup>+</sup>-Zellen bestätigt werden (Traub, 2004). Während bei oral infizierten BALB/c-Mäusen die CD8<sup>+</sup>-Zellanteile im Verlauf einer Infektion abnahmen, wurde bei ip infizierten Mäusen desselben Stammes eine signifikante Zunahme dieser zytotoxischen T-Zellen gemessen.

#### 5.4 Zytokinexpression nach *E. multilocularis* - Infektion

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der T-Helfer-Subklassen 1 und 2 (Th1, Th2) regulieren über die Ausschüttung von Zytokinen die Immunantwort. Th1-Zellen (Typ1-T-Helferzellen) sind beteiligt an der zellulären Immunantwort und produzieren v.a. inflammatorisch wirkende Zytokine wie IL2, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Th2-Zellen (Typ2-T-Helferzellen) spielen eine wichtige Rolle in der humoralen Immunantwort und sezernieren hauptsächlich die Zytokine IL4, IL5 und IL-10, welche u.a. die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen anregen (Abbas *et al.*, 1996; Mosmann & Coffman, 1989). Die Präferenzierung eines Arms der Immunantwort, also Th1 oder Th2, beeinflusst somit den Verlauf pathologischer Prozesse sowie die Protektion gegenüber parasitären Infektionen (Cox, 1997; Guler *et al.*, 1996). Die zellulär vermittelte Immunität, gekennzeichnet durch vermehrte Ausschüttung von Th1-typischen Zytokinen, scheint eine besondere Bedeutung bezüglich der protektiven Mechanismen gegen eine AE sowohl im Tiermodell (zumindest in der sekundären AE) als auch bei humaner AE zu haben (Emery *et al.*, 1998; Godot *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu werden Th2 – Zytokine mit der Persistenz und dem Wachstum des Parasiten assoziiert (Vuitton,

2003). Dennoch bestehen hinsichtlich des Zytokinmusters bei mit *E. multilocularis* infizierten Zwischenwirten (sekundäre AE) je nach verwendetem Mausstamm beachtliche Unterschiede.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Zytokine IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  und IL-10 mittels quantitativer PCR (Expression der mRNA) gemessen. Die quantitative Analyse der Expression von Zytokinen wird derzeit mittels Protein- und mRNA-basierter Nachweisverfahren durchgeführt. Als Protein-basierte Bioassays kommen sogenannte sandwich oder capture ELISAs am häufigsten zur Anwendung. In dieser Arbeit wurde der quantitative Nachweis auf mRNA-Ebene gewählt. Der Vorteil liegt v.a. in der direkten Nachweisbarkeit der Expression, da die meisten Zytokine nur in geringen Mengen produziert werden und eine kurze Halbwertszeit besitzen. Nach ihrer Freisetzung erfolgt meist eine schnelle Utilisation nach autokriner oder parakriner Übertragung, was die Quantifizierung mittels Protein-basierter Methoden erschwert. Durch verschiedene post-transkriptionelle und post-translationale Faktoren kann es jedoch zu einer Diskrepanz zwischen der gemessenen Zytokin-mRNA-Expression und sezernierten Protein kommen (Overbergh *et al.*, 2003). Als mRNA basierte Nachweisverfahren stellen RNase Protection Assays (RPA), In-situ-Hybridisierungsmethoden (ISH) und Northern Blot zwar spezifische Methoden zur Quantifizierung von Zytokinen dar, sind aber nur schwer standardisierbar, was eine effiziente Analyse von mehreren Zytokinen in einer großen Probenzahl ausschließt (Whiteside, 2002). Die Real-time PCR wird derzeit als sensitivste Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression von Zytokinen betrachtet (Giulietti *et al.*, 2001) und kam daher in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung. Mit der real-time PCR wird in einem geschlossenen System Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung kombiniert und simultan durchgeführt, so dass weitere Arbeitsschritte nicht notwendig sind. Die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation erfolgt während der log-linearen Phase der Reaktion über Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzmarkierte Sonden. Diese binden während des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA, wobei deren Signal (durch eine Lichtquelle angeregter Farbstoff) quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt korreliert und somit über eine Software in Echtzeit dargestellt werden kann.

Das inflammatorische Zytokin IFN $\gamma$  wird (wie auch TNF $\alpha$ ) als ein Kennzeichen der Th1 Antwort des Immunsystems betrachtet, indem es hauptsächlich Makrophagen (Antigenpräsentation, Aktivität von Lysosomen) aktiviert und eine Th2 – Immunantwort unterdrückt. Durch die relative Quantifizierung konnte im Rahmen der Immunisierungsstudien nach 4 wöchiger Infektionsdauer eine Herab-Regulierung von IFN $\gamma$  gegenüber nicht infizierten Kontrolltieren in einem von zwei Versuchen errechnet werden. Die Untersuchung der Expression von IFN $\gamma$  zu späteren Zeitpunkten ergab keine Regulierung dieses Zytokins. In vorausgegangenen Arbeiten mit primärer AE erfolgte die Messung der Zytokinexpression jeweils mittels ELISA. Merli (2001) detektierte die gebildeten Zytokine 6 wpi anhand von Zellüberständen in stimulierten Milzzellkulturen. IFN $\gamma$  war in dieser Arbeit nach Stimulation mit Gesamt *E. multilocularis*-Antigen in dem angewendeten System nicht nachweisbar. Nach Stimulation mit ConA blieb die IFN $\gamma$ -Produktion im Bereich der Kontrolltiere.

Bauder (1998) detektierte die Zytokinexpression ebenfalls mittels ELISA, jedoch mit Seren von infizierten und nicht infizierten C57BL/6J bzw. C57BL/10J Mäusen. Nach 4 Wochen Infektionsdauer waren in den von Bauder (1998) durchgeführten Studien keine Unterschiede in der IFN $\gamma$  – Menge im Serum zu den Kontrolltieren feststellbar, jedoch stieg der IFN $\gamma$  – Titer im Verlauf der Infektion sowohl bei den infizierten als auch den nicht infizierten Kontrolltieren.

Das regulative Th2-Zytokin IL-10 gehört zusammen mit TGF $\beta$  zu den wichtigsten entzündungshemmenden Faktoren und gilt als indirekter Antagonist von IFN $\gamma$ , da es dessen Ausschüttung unterdrückt. Zudem ist IL-10 ein wichtiger Immunmodulator im Intestinaltrakt (Naundorf *et al.*, 2009). Nach einer Infektion mit *E. multilocularis* konnte in dieser Arbeit eine leichte Expressionszunahme nach 49dpi gemessen werden. Zu anderen Zeitpunkten war die Expression auf dem Niveau der nicht infizierten Kontrollgruppe bzw. nicht nachweisbar. Bei den Arbeiten von Merli (2001) und Bauder (1998) war IL-10 nach einer Infektionsdauer von 4 Wochen ebenfalls nicht nachweisbar. Ein Anstieg der IL-10 Expression erfolgte erst nach 4 Monaten Infektionsdauer. Dieser Zeitrahmen konnte in dieser Arbeit nicht abgedeckt werden. Die bisher veröffentlichten Daten bezüglich der IL-10 Expression als Marker für eine Th2-Immunantwort nach Infektion mit Taeniiden sind widersprüchlich. Während bei mit *E. granulosus* und *T. crassiceps* infizierten Mäuse ein moderater, aber sehr späten Anstieg von IL-10 zu beobachten war (Rogan, 1998; Terrazas *et al.*, 1998) stellte Emery *et al.* (1996) bei *E. multilocularis* eine stetige Abnahme von IL-10 in der Expression, jedoch nach intrahepatischer Infektion, fest. Die späte Expression von IL-10, als ein Marker von Typ2-CD4-positiven-T-Zellen, kann zudem ein Hinweis auf das Fehlen von *E. multilocularis* – Antikörpern in der Frühphase der Infektion sein, da IL-10 die Proliferation von B-Lymphozyten erheblich beeinflusst.

TGF $\beta$ 1 wird von den meisten Leukozyten produziert und dessen Expression spielt daher eine bedeutende Rolle in der Regulierung des Immunsystems. Regulatorische T-Zellen exprimieren TGF $\beta$ 1, das die Aktivität von T-Helfer-Zellen und Zytotoxischen T-Zellen herab reguliert (Wahl *et al.*, 2006). Zudem inhibiert TGF $\beta$ 1 die Sekretion und Expressionslevel verschiedener anderer Zytokine, v.a. IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  (Letterio & Roberts, 1998). Jüngste Untersuchungen zur intrahepatischen Expression von TGF $\beta$  in Leber-Biopsien von AE-Patienten zeigten ein deutliches Vorkommen dieses Zytokins in Lymphozyten des periparasitären Infiltrats (Zhang *et al.*, 2008). Eine Regulierung von TGF $\beta$  erfolgte in den hier durchgeführten Versuchen nach einer Infektionsdauer von 7 Wochen, wobei die Expression gegenüber der nicht infizierten Kontrollgruppe abnahm. Die Unterschiede waren in 3 von 4 Versuchsgruppen signifikant. Diese Ergebnisse lassen auf Differenzen zwischen humaner und muriner AE schließen.

Trotz der geringen Anzahl der hier untersuchten Zytokine kann anhand der Ergebnisse eine Präferenzierung der Th2 bzw. humoralen Immunantwort mit zunehmender Infektionsdauer erkannt werden. Die hieraus gedeutete Interpretation des erhaltenen Zytokinmusters entspricht denen anderer Arbeitsgruppen, welche die chronische Phase der Infektion mit einer Th2-Immunantwort

korrelieren (Gottstein & Hemphill, 2008; Jenne *et al.*, 1997; Sturm *et al.*, 1995; Wellinghausen *et al.*, 1999). Die späte, jedoch stark einsetzende Antikörper-Produktion im Laufe der *E. multilocularis* – Infektion unterstreicht diese These. Die Darstellung zugunsten einer Th1 bzw. Th2 – Immunantwort beruht jedoch in allen Arbeiten stets auf die Messungen einer begrenzten Anzahl von Zytokinen und variiert zudem auch mit dem eingesetzten Mausstamm und der angewendeten Methode. So steht die Deutung der Ergebnisse dieser Arbeit im Widerspruch mit der von Brutschin (2003, Diplomarbeit) in welcher eine intrazelluläre Zytokinmessung mit dem Durchflusszytometer durchgeführt wurde. Aufgrund einer hohen IFN $\gamma$  und IL2 –Expression nach 6wpi und 4mpi konnte dort auf eine verstärkte zelluläre Immunantwort geschlossen werden.

### 5.5 Vakzinierungsstudien

Erste Immunisierungsstrategien gegen *Echinococcus spec.* in Zwischenwirten waren durch die Applikation von Onkosphären bzw. Onkosphärenantigenen erfolgreich (Heath *et al.*, 1981; Osborn & Heath, 1982). Zusätzlich verhalfen Immunisierungsversuche gegen *Taenia*-Arten zu weiteren Erfolgen auf dem Gebiet der *Echinococcus*-Forschung. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *Tania spec.* führten Immunisierungsstrategien gegen *Taenia*-Arten auch zu Erfolgen bei *Echinococcus granulosus* (Lightowers, 2006). Die intramuskuläre Injektion von *E. granulosus*-Onkosphären erzielte bei Schafen signifikante Schutzraten gegen eine orale Infektion mit diesem Zestoden. Neben den Vakzinierungsversuchen mit Onkosphärenderivaten gelang es ebenfalls mit Metazestoden-Antigenen (Dempster *et al.*, 1992) sowie mit den Überständen kultivierter Onkosphären (Osborn & Heath, 1982), einen Schutz gegen eine nachfolgende Infektion mit *E. granulosus* zu induzieren. Diese Versuche ließen erkennen, dass durch die Applikation von Antigenen eine gewisse Immunität erzeugt werden kann, was bedeutet, dass ein bereits infizierter Wirt nicht erneut mit Zestoden der gleichen oder einer systematisch nahe stehenden Art befallen wird. Auch eine Kreuzimmunität von mit *Taenia spec.* infizierten Tieren gegenüber *E. granulosus* wurde dokumentiert (Gemmell, 1966; Heath *et al.*, 1979). Diese Form der Populationsregulierung wird in der Helminthologie mit „*concomitant immunity*“ bezeichnet, eine von Bashford (1908) eingeführte Beschreibung des Phänomens, dass Versuchstiere mit progressiv wachsenden Tumoren zusätzlich injizierte Zellen desselben Tumors abstoßen. Heath (1995) sieht in der „*concomitant immunity*“ die Fähigkeit des Metazestoden, das Immunsystem des Wirtes derart zu modulieren, dass zum einen das Überleben des Parasiten gesichert ist und zum anderen eine Superinfektion verhindert wird. Studien, in denen auch Seren von Schafen, welche aus *E. granulosus* – Endemie-Gebieten stammten, in der Lage waren, Onkosphären *in vitro* abzutöten unterstützen diese Definition jedoch nicht, da dadurch gezeigt werden konnte, dass es unerheblich ist, ob diese Schafe mit *E. granulosus* infiziert waren oder nicht (Gemmell *et al.*, 1987). In den wenigen Studien zur Immunisierung gegen *E. multilocularis* im Zwischenwirt konnte eine *concomitant immunity* nicht belegt werden. Vakzinierungsversuche mit Metazestodenantigenen

(Veit, 1995) und attenuierten Onkosphären (Bilger, 1999) erzielten gegen eine nachfolgende Belastungsinfektion keine Protektion. Ein weiterer Hinweis auf eine fehlende *concomitant immunity* bei *E. multilocularis* ist das Auftreten dieses Parasiten als Co-Infektion mit dessen nahen Verwandten *Taenia taeniaeformis* in deren natürlichen Zwischenwirten *Arvicola terrestris* (Petavy *et al.*, 2003).

Müller (1995) gelang es erstmals, mit einem rekombinanten Antigen protektive Immunreaktionen gegen *E. multilocularis* im Zwischenwirt hervorzurufen. Nach Immunscreenings mit einem gegen Metazestoden gerichteten Kaninchenserum konnte die kodierende cDNA des *E. multilocularis* Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EMGAPDH) isoliert werden. Dieses Protein wurde anschließend in Expressionsplasmide als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein und „fusionsfrei“ (6-HIS-Tag) kloniert, in *E. coli* transformiert und durch diese exprimiert. Eine subkutane Immunisierung mit diesen beiden Antigenversionen konnte jedoch keinen Schutz gegen eine orale Infektion mit *E. multilocularis* Eiern induzieren. Erst nachdem EMGAPDH (als HIS-Tag) in einen attenuierten *Salmonella typhimurium* Impfstamm kloniert und in Vakzinierungsstudien eingesetzt wurde, konnte eine signifikante Reduktion der Metazestodenlast erzielt werden. Überraschenderweise konnten jedoch bei den immunisierten Tieren keine spezifischen Antikörper gegen EMGAPDH nachgewiesen werden.

Ein weiteres protektives Antigen gegen *E. multilocularis* konnte aufgrund seiner Homologie mit dem *E. granulosus*-Antigen EG95 entdeckt werden. EG95 konnte in mehreren Studien erfolgreich Schutz gegen eine nachfolgende *E. granulosus* Infektion induzieren (Lightowlers, 2003; Lightowlers *et al.*, 1996a). Somit lag es nahe, das entsprechende homologe Gen von *E. multilocularis* zu isolieren und in Vakzinierungsstudien zu testen. Aus der Metazestoden cDNA-Bank von Müller (1995) konnte ein DNA-Segment mit der Länge von 592 Basen aufgefunden werden, welches für ein Protein mit 79,5% Identität zu EG95 kodiert. Dieses Antigen wurde als EM6 (heute EM95) bezeichnet und besteht aus 149 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 16,4kDa. Neben der Homologie zu dem *E. granulosus*-Antigen EG95 besitzt EM95 einige weitere Eigenschaften, die auch andere protektive Antigene verschiedener Taenien innehaben (Lightowlers *et al.*, 2003). Die Struktur von EM95, abgeleitet von der Aminosäure-Sequenz, lässt auf ein sekretorisches Signal, eine FibronectinIII-Domäne, sowie eine Transmembran-Domäne schließen, welche vermuten lassen, dass dieses Protein extrazelluläre Eigenschaften aufweist und somit sekretiert werden müsste. Versuche, in denen mit Fragmenten von EG95 kein Schutz erzielt werden konnte, ließen darauf schließen, dass die induzierte Immunantwort von der Konformation des EG95-Proteins abhängig ist (Woollard *et al.*, 1998). Merli (2001) konnte in drei voneinander unabhängigen Immunisierungsversuchen mit EM95 signifikante Schutzraten erzielen. In diesen Experimenten wurde EM95 als GST-Fusionsprotein von *Schistosoma japonicum* (SjGST) – exprimiert und subkutan mit dem Adjuvans Saponin appliziert. Mäuse, welche diese Vakzinierung erhielten, entwickelten bis 97,6% weniger *E. multilocularis* – Zysten als die entsprechende Kontrollgruppe.

Ähnlich hohe Schutzraten (97%) konnte nach parenteraler Immunisierung mit dem rekombinanten Antigen EM14-3-3 erzielt werden (Siles-Lucas *et al.*, 2003). Die Familie der intrazellulären 14-3-3 Proteine ist bei allen bisher untersuchten eukaryotischen Organismen zu finden und hoch konserviert. Sie spielen in einer Vielzahl von elementaren zellulären Mechanismen eine entscheidende Rolle, darunter Zellproliferation, Signaltransduktion und Enzymaktivierung (Hermeking & Benzinger, 2006). Die vermehrte Expression des 14-3-3 Proteins von *E. multilocularis*-Metazestoden gegenüber adulten *E. multilocularis*-Würmern und auch im Vergleich zu *E. granulosus*-Metazestoden wird in einen engen Zusammenhang mit dem typischen proliferativen Wachstum von *E. multilocularis*-Metazestoden gebracht (Matsumoto *et al.*, 2006; Siles-Lucas *et al.*, 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass EM14-3-3 ebenso von Onkosphären exprimiert wird (Siles-Lucas & Gottstein, 2003).

Mit einem weiteren *Echinococcus*-Antigen, EMY162, konnte in jüngster Zeit ebenfalls hohe Schutzraten (74,3%) gegen eine Infektion bei Zwischenwirten erzielt werden (Kouguchi *et al.*, 2007). Die Aminosäure-Sequenz von EMY162 lässt auf einen hydrophobischen N-Terminus (sekretorische Einheit) und einen hydrophobischen C-Terminus (Transmembrandomain) schließen und zeigt zudem eine Fibronektin III – Domäne, was auf funktionelle Gemeinsamkeiten mit EM95 hinweist (Kato *et al.*, 2008).

In allen aufgeführten Studien zur Vakzinierung gegen *Echinococcus multilocularis* wurde Schutz als eine Dezimierung der sich entwickelnden Metazestodenzahl definiert (Gauci *et al.*, 2002; Müller-Schollenberger *et al.*, 2001). Diese Definition soll hier beibehalten werden, jedoch ist darauf zu verweisen, dass aufgrund der ungeschlechtlichen Vermehrung im Larvenstadium von *Echinococcus multilocularis* nur eine Läsion genügt, um eine progressive AE zu entwickeln.

#### 5.6 Immunisierungsstudien von BALB/c-Mäusen mit rekombinanten EMGAPDH

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Enzym, das primär als „housekeeping-enzyme“ der Glykolyse beschrieben wurde (Hanauer & Mandel, 1984) und daher als konstitutiv exprimiert angesehen wird. Weitere physiologische Funktionen wie die Beteiligung an der Bündelung von Mikrotubuli (Huitorel & Pantaloni, 1985), Transport von tRNAs (Singh & Green, 1993) und DNA Reparatur-Mechanismen (Meyer-Siegler *et al.*, 1991) wurden beschrieben. Als aktives Enzym findet sich GAPDH im Zytosol der Zelle, wogegen die inaktive Form mit Membranen assoziiert wird (Nakagawa *et al.*, 2003). Als Oberflächenprotein der infektiösen Larve von *Schistosoma mansoni* wird es mit protektiven Immunmechanismen gegen diesen Trematoden in Verbindung gebracht (Argiro *et al.*, 2000). Vakzinierungsstudien von Müller *et al.* (2001) in denen *Echinococcus multilocularis* – GAPDH als Fusionsprotein mit GST sowie als „fusionsfreies“ Protein (6HIS-Tag) in Verbindung mit dem Adjuvans STP (Squalen, Tween, Pleuronic) appliziert wurde, führten trotz spezifischer Antikörperbildung zu keinem Schutz gegen eine Folgeinfektion mit *E. multilocularis*. Ein weiteres Experiment, in welchem EMGAPDH von dem

attenuierten *Salmonella typhimurium* Impfstamm Zoosaloral H® exprimiert wurde und dieser als orale Vakzine eingesetzt wurde, führte zur signifikanten Reduktion der Metazestodenlast (Müller-Schollenberger *et al.*, 2001). Inwieweit eine Immunisierung mit EMGAPDH eine schützende Wirkung auf eine nachfolgende Belastungsinfektion hat und welche Rolle das verwendete Adjuvans übernimmt, sollte in dieser Arbeit geklärt werden. Dazu wurde EMGAPDH in einen neuen Vektor kloniert und als fusionsfreies Protein (HIS-Tag) in Immunisierungsstudien eingesetzt. Zwei unabhängige Immunisierungen mit EMGAPDH in Verbindung mit dem Adjuvans Saponin konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der Zystenbildung erzielt werden. Die Parasitenbürde verringerte sich gegenüber den infizierten Kontrolltieren um 76,4% im ersten und 86,1% im zweiten Versuch. Diese Ergebnisse stehen im klaren Kontext mit den Versuchen von Merli (2001) in denen bei Vakzinierungsversuchen mit EM95 gezeigt werden konnte, dass die Schutzraten in Kombination mit dem Adjuvans Saponin deutlich höher sind als mit STP. Während Müller *et al.* (2001) durch die Vakzinierung mit EMGAPDH in Kombination mit dem Adjuvans STP keinen Schutz erzielen konnte, war die Reduktion der Metazestoden bei diesen Versuchen mit dem Adjuvans Saponin signifikant. Saponin ist damit, im Rahmen der hier verwendeten Immunisierungsstrategie und des Infektionsmodells, das geeignetere Agens. Saponin hat gegenüber STP stärkere immunmodulatorische Eigenschaften. Es ist ein potenter T-Zellstimulator, ist aber auch in der Lage, humorale Immunantworten zu unterstützen (Morein *et al.*, 1996) und hat zudem das Potential, zytotoxische CD8+ Lymphozyten zu aktivieren und potenziert somit die Antwort auf mukosale Antigene (Kensil, 1996). Auch die Stimulation nicht-spezifischer Immunantworten, wie Entzündungsreaktionen und Monozyten-Proliferation (Rajput *et al.*, 2007), unterstützen die Induktion schutzgebender Mechanismen mit großer Wahrscheinlichkeit. Bemerkenswert ist hierbei, dass in einem von zwei Versuchen eine vergleichbar signifikante Verringerung der Metazestodenlast allein durch die Applikation von Saponin erzielt wurde. In Verbindung mit dem Adjuvans Saponin ist eine subkutane Vakzinierung mit EMGAPDH somit protektiv gegen eine nachfolgende Belastungsinfektion. Die dennoch gebildeten Läsionen unterschieden sich nach mikroskopischer Beurteilung nicht von denen der Kontrollgruppe. In wie weit die Immunisierung mit EMGAPDH einen Einfluss auf das Wachstum der trotz Immunisierung gebildeten Metazestoden hat oder diese eventuell in ihrer Fertilität beeinflusst sind, bleibt unklar. Um diese Frage zu beantworten, bedarf es eines länger andauernden Versuches, sowie einer histologischen Untersuchung der Läsionen.

### 5.7 Immunisierungsstudien von BALB/c-Mäusen mit rekombinanten EM95

Das Protein EM95 wird als sekretiertes Oberflächenprotein von *E. multilocularis*-Onkosphären exprimiert und ihm wird daher eine Schlüsselrolle in Invasion und Etablierung des Zestoden im Zwischenwirt zugeschrieben. Bei der humanen AE konnten Antikörper gegen EM95 in Sera von Patienten nachgewiesen werden (Kouguchi *et al.*, 2007). Die Entdeckung von EM95 basierte v.a.



auf der Homologie zu EG95, ein Antigen, welches als rekombinante Vakzine in Argentinien, Australien und Neu-Seeland Schafe effektiv gegen eine Infektion mit *E. granulosus* zu schützen vermochte (Lightowers *et al.*, 1999). EM95 hat weiterhin hohe strukturelle Gemeinsamkeiten (jedoch keine signifikanten Homologien) mit dem vergleichbar protektivem Protein EMY162, welches jedoch von allen Stadien des Parasiten exprimiert wird (Kato *et al.*, 2008).

Das protektive Potenzial des rekombinanten EM95 konnte bereits in Vakzinierungsstudien belegt werden (Gauci *et al.*, 2002; Merli, 2001). Dabei wurde EM95 als GST-Fusionsprotein (Glutathion-S-Transferase von *Schistosoma mansoni*) in Kombination mit Saponin subkutan appliziert. Kontrollimmunisierungen, die nur mit SjGST durchgeführt wurden, führten jedoch ebenfalls zu einer Reduktion der Metazestodenlast (21% bzw. 56%) (Merli, 2001). Diese schwach protektive Wirkung von SjGST gegen *E. multilocularis* kann mit einer unspezifischen Immunreaktion gegen dieses Protein erklärt werden, zumal an anderer Stelle gezeigt werden konnte, dass eine Vakzinierung mit rekombinantem GST von Schistosomen (Sm28GST, Sh28GST) zu schützenden Immunreaktionen gegen diese Trematoden führte (Capron *et al.*, 2001; Capron *et al.*, 1992).

Die Struktur der Aminosäure-Sequenz von EM95 lässt auf ein sekretorisches Signal, eine FibronectinIII-Domäne (FnIII), sowie eine Transmembran-Domäne schließen (Gauci *et al.*, 2002). Die FnIII-Domäne ist eine ubiquitäre Komponente vieler eukaryotischer Proteine, u.a. bei Immunglobulinen, in Zelladhäsionsmolekülen und Rezeptoren der Zelloberfläche (Campbell & Spitzfaden, 1994). In Immunisierungsversuchen mit EG95 konnte gezeigt werden, dass eine unvollständige EG95-FnIII-Domäne keine protektiven Immunantworten mehr induzieren konnte (Lightowers *et al.*, 1996a). Dies führte zu der Annahme, dass die FnIII-Domäne an den Anlagerungsmechanismen der Onkosphäre an der Darmmukosa des Zwischenwirts beteiligt ist und somit als Ziel für protektive Immunmechanismen dienen könnte (Lightowers *et al.*, 2000).

Mit den hier durchgeführten Versuchen sollte einerseits das protektive Potential von EM95 ohne den immunogenen GST-Tag getestet werden und andererseits sollte durch die Verkürzung von EM95 um die sekretorische Einheit sowie der Transmembrandomain, die Rolle der FnIII-Domäne bei der Induktion schützender Immunreaktionen hervorgehoben werden.

Die subkutane Immunisierung mit EM95 in Kombination mit Saponin ergab in den zwei unabhängigen Versuchsreihen eine hochsignifikante Herabsetzung der Parasitenlast. Die Metazestodenzahl verringerte sich gegenüber der jeweils infizierten Kontrollgruppe um 96,9% bzw. 98,4%. In beiden Versuchen wiesen 60% der Tiere keine Läsionen auf und zeigten somit einen vollständigen (tatsächlichen) Infektionsschutz gegen *E. multilocularis*. Obwohl damit das protektive Potential von EM95 deutlich aufgezeigt wird, scheint der Einfluß vom Adjuvans Saponin doch erheblich. Eine Vakzinierung ohne Adjuvans könnte darüber Aufschluß geben, konnte jedoch im Rahmen dieser Studien wegen Mangel an infektiösen *E. multilocularis* – Eiern nicht durchgeführt werden. Weiterhin bleibt der Einfluß der Vakzinierung auf die Entwicklung der sich dennoch bildenden Metazestoden unklar. Unterschiede in Form und Größe der Läsionen waren

bei diesen Versuchen nicht ersichtlich. Der in früheren Studien eingesetzte GST-Tag hat somit keinen Einfluss auf die schutzgebende Immunreaktion, welche durch EM95 ausgelöst wird. Weiterhin sind weder die sekretorische Einheit noch die Transmembran-Domäne von EM95 am Schutz beteiligt.

### 5.8 Vergleich der Immunantworten nach Immunisierung mit EM95 und EMGAPDH

Die Ausbildung einer Immunität gegen Infektionsstadien von *Echinococcus spec.* wird gegenwärtig auf die Antikörper-vermittelte Komplement-Lyse von Onkosphären zurückgeführt (Heath *et al.*, 1994). Der etablierte Metazestode ist dagegen nach Ausbildung der Laminarschicht gegen die humoralen Immunantworten des Wirtes geschützt (Gottstein & Hemphill, 2008). Der zellulären Immunität wird bei der Regulation des proliferativen Wachstums des etablierten Metazestoden ein besondere Bedeutung zugemessen (Veit, 1995). Dabei scheint der Metazestode selbst durch Immunmodulation und Immunsuppression das Wirtsimmunsystem zu beeinflussen (Kizaki *et al.*, 1991).

Durch die Immunisierungen mit den rekombinanten Antigenen EM95 und EMGAPDH wurde gezeigt, dass diese in der Lage sind, protektive Immunantworten zu induzieren. Die gebildeten Antikörper gegen diese Antigene beruhten vorwiegend auf den IgG-Subklassen IgG1 und IgG2a. Eine geringe Produktion von IgG2b-Antikörpern gegen diese Antigene war zumindest im Serum vor der Infektion nachweisbar. Spezifische IgG3-Antikörper gegen die eingesetzten Antigene EM95 und EMGAPDH wurde nach keiner Immunisierung festgestellt. Eine Synthese von Antikörpern gegen *E. multilocularis*-Gesamtantigene konnten weder bei geschützten Tieren noch bei den Kontrollgruppen nach 4wöchiger Infektionsdauer festgestellt werden. Diese scheinen somit bei den Schutz-induzierenden Mechanismen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die Ausbildung der Laminarschicht dem Parasiten ein geeigneter Evasionsmechanismus zur Verfügung steht und eine detektierbare Antikörperbildung nicht statt findet. Eine Reihe von Studien unterstützen diese These (Irigoin *et al.*, 2008; Rogan & Craig, 1997).

Die starke Antikörpersynthese in den erfolgreichen Vakzinierungsversuche mit EM95 lassen den Schluss zu, dass das Immunsystem der Mäuse dazu angeregt wird, mittels spezifischer Antikörper geeignete Zielepitope auf der Onkosphärenoberfläche zu erkennen und über den Mechanismus der klassischen Komplementaktivierung die Onkosphären abzutöten. Inwieweit diese Einschätzung auf die schützenden Eigenschaften von EMGAPDH zutrifft, bleibt zu klären, da dieses Enzym nur in inaktiver Form mit Membranen assoziiert wird (Nakagawa *et al.*, 2003).

Zur Beurteilung des Einflusses der Immunisierung auf die Proliferation von Immunzellen wurde die Proliferationsfähigkeit der Milzzellen von den Versuchstieren *in vitro* untersucht. Die Milz dient als sekundäres lymphatisches Organ der Speicherung und Differenzierung von Lymphozyten und

spielt daher eine besondere Rolle in schützenden Immunreaktionen gegen körperfremde Stoffe. Weiterhin ist sie ein wichtiger Speicher für Monozyten, die Vorläuferzellen von Makrophagen, welche durch Phagozytose und entsprechende Antigenpräsentation einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung der adaptiven Immunantworten haben (Swirski *et al.*, 2009). Die Stimulation der Milzzellen der mit EMGAPDH immunisierten Tiere lieferte in den zwei Tierversuchen unterschiedliche Ergebnisse. Nach Stimulation mit Gesamt - *E. multilocularis* - Antigen konnte im ersten Versuch keine Suppression erkannt werden, im zweiten dagegen war die Proliferation der Milzzellen deutlich unterdrückt. Das gleiche Bild bot sich nach Stimulation der Zellkultur mit dem Antigen EMGAPDH. Diese verminderte Proliferation war allerdings in dieser Studie bei allen Versuchsgruppen (infizierte Kontrolltiere und nur mit Saponin behandelte Kontrolltiere) festzustellen. Eine klare Aussage ist über eventuell vorhandene immunsuppressive Eigenschaften von EMGAPDH somit nicht möglich. Im Gegensatz zu den Immunisierungen mit EMGAPDH kann eine Suppression der Proliferation der Milzzellen nach Immunisierung mit EM95 gedeutet werden. Die Immunisierung mit EM95 führte bei beiden durchgeführten Versuchen zu einer verringerten Proliferationsrate der kultivierten Milzzellen, sowohl gegenüber den Milzzellen der infizierten als auch der nur mit dem Adjuvans Saponin behandelten Kontrollgruppe nach Stimulation mit Gesamt - *E. multilocularis* - Antigen. Durch die Stimulierung der Milzzellen mit dem Protein EM95 konnte eine verminderte Proliferationsrate nicht detektiert werden. Merli (2001) führte im Rahmen seiner Dissertation vergleichbare Versuche durch, in welchen nach Vakzinierung mit EM95 eine verminderte Proliferation der Milzzellen gegenüber der infizierten Kontrollgruppe 6 Wochen *post infectionem* ebenfalls nur nach Stimulation mit Gesamt - *E. multilocularis* - Antigen festgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse lassen eine Suppression der zellulären Immunantwort nach Vakzinierung mit EM95 vermuten.

Um weitere Information bezüglich der Immunantwort zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die Expression von den Zytokinen IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  und IL10 der immunisierten Tiere mit den der infizierten und naiven Tieren verglichen. Die Messung erfolgte auf mRNA-Basis mittels quantitativer PCR und somit zum Momentanzustand während der Sektion.

Sowohl die Immunisierung mit EMGAPDH als auch mit EM95 führte zu einer vermehrten Expression von IFN $\gamma$ . Die Unterschiede in der Regulierung dieses Zytokins waren jedoch nur in den mit EM95 immunisierten Mäusen signifikant höher, sowohl gegenüber der nicht infizierten, als auch der infizierten Kontrollgruppe. In den mit EMGAPDH immunisierten Mäusen war eine signifikante Verstärkung der IFN $\gamma$ -Expression nur im ersten der durchgeführten Versuche ersichtlich. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der oben getätigten Vermutung, dass eine zelluläre Suppression zumindest nach Immunisierung mit EM95 wahrscheinlich erscheint. Eine verstärkte Produktion von IFN $\gamma$  ist ein Kennzeichen der Th1 dominierten Immunantwort. Da dieses Zytokin hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sezerniert wird, ist eine Beteiligung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen an den protektiven

Immunmechanismen gegen eine Infektion mit *E. multilocularis* daher höchst wahrscheinlich. Dafür spricht auch, dass die verstärkte Bildung von IFN $\gamma$  einen bedeutenden Einfluss auf das Wachstum von *E. multilocularis*-Metazestoden hat, wie verschiedene Therapiestudien mit Albendazol aufzeigen (Dvoroznakova *et al.*, 2009). Vergleichbare Ergebnisse finden sich erneut in der Arbeit von Merli (2001). In dieser wurden die Zytokine als Proteine in Milzzellüberständen mittels ELISA (siehe oben) gemessen. Mit EM95 immunisierte Tiere zeigten auch dort eine verstärkte Expression von IFN $\gamma$ .

Die Quantifizierung von IL-10 lieferte in den hier durchgeführten Immunisierungsstudien widersprüchliche Ergebnisse. Während in den jeweils ersten Versuchen mit EM95 und EMGAPDH eine Regulierung dieses regulativen Th2 Zytokins nicht nachgewiesen werden konnte, war dieses in dem jeweils zweiten Versuch signifikant erhöht. Aufgrund der Tatsache, dass in keinem der vakzinierten Tiere eine Regulierung von TGF $\beta$  erfolgte, kann von einer auffälligen Verschiebung der protektiven Immunantwort in Richtung Th2 nicht geschlossen werden.

Zusammenfassend kann von den Ergebnissen der hier untersuchten immunologischen Parameter der vakzinierten Tiere auf eine Th1-geprägte Immunantwort geschlossen werden. Die oft zitierte These von Emery *et al.* (1998), dass protektive Immunantworten allein mit einer Th1-Immunantwort assoziiert sind, konnte durch diese Arbeit zwar weitestgehend bestätigt werden, jedoch bleiben einige Fragen ungeklärt. Gegen eine ausgeprägte Th1-Immunantwort spricht das Fehlen von IgG3 – Antikörpern, welche für eine ausgeprägte inflammatorische Komponente stehen würden. Eine Beteiligung von Th2 typischen Mechanismen ist zudem durch die Detektion von IL-10, zumindest in einem Teil der durchgeführten Studien und aufgrund der ausgeprägten IgG1 Antikörper-Bildung nicht ausgeschlossen.

Die Wirt-Parasit-Interaktion bei einer alveolären Echinokokkose lässt sich aufgrund der Komplexität der zwei unterschiedlichen Phasen der Infektion nicht ausschließlich einem Schema zuordnen. Die schützende Immunabwehr kann grundsätzlich nur gegen die jeweilige Phase der Infektion gerichtet sein. In der ersten Phase, welche die Wanderung der Onkosphäre bis zur Etablierung des Metazestoden an dessen Ansiedlungsort umfasst, ist von der zweiten, stationären Wachstumsphase des Metazestoden zu trennen. Die ausgeprägte Expression von spezifischen Antikörpern (v.a. IgG1) gegen die applizierten Antigene EM95 und EMGAPDH lässt eine Komplement-vermittelte Onkosphärenlyse in der ersten Phase der Infektion als Abwehrmechanismus erkennen. Eine weitere Beurteilung der hier beteiligten, schützenden Immunreaktionen ist anhand von IFN $\gamma$  möglich. Denkbar ist die Aktivierung von Makrophagen durch IFN $\gamma$  und der damit verbundenen Ausschüttung von Stickstoffmonoxid und Sauerstoffmetaboliten, welche zur Schädigung des Metazestoden führen. Zudem ist die Aktivierung von NK-Zellen (Antikörper vermittelte Zytotoxizität), welche IFN $\gamma$  vermehrt sezernieren ein wahrscheinlicher Effektor -Mechanismus. Eine Abtötung der bereits etablierten Metazestoden in der zweiten Phase der Infektion ist durch eine vorhergehende Immunisierung sehr

unwahrscheinlich, zumal die entstandenen Zysten der immunisierten Tiere sich nicht von denen der nicht immunisierten Kontrolltiere unterschieden.

Zukünftige Studien, in denen v.a. die zellulären Immunantworten nach der Immunisierung (jedoch vor der Infektion) analysiert werden, könnten weitere Hinweise zu den schützenden Parametern der einsetzenden Immunantwort geben.

### 5.9 Expression von EM95 und EMGAPDH durch *Salmonella typhimurium*

Die Verwendung von attenuierten *Salmonella* – Stämmen als orale Vakzine zur Applikation von heterologen Antigenen erfuhr in den letzten Jahren vermehrtes Interesse. Der Einsatz dieser Konstrukte führte zu protektiven Immunmechanismen gegen eine Reihe von parasitären Infektionen, u.a. *Schistosoma mansoni* (Pacheco et al., 2005), *Plasmodium berghei* (Tartz et al., 2008), *Toxoplasma gondii* (Cong et al., 2005; Qu et al., 2009) und *Eimeria tenella* (Hotz et al., 2009). Rekombinante *Echinococcus granulosus* – Antigene erzielten durch die Applikation via *Salmonella typhimurium* ebenfalls signifikante Schutzraten beim Endwirt Hund (Petavy et al., 2008).

Salmonellen sind aufgrund der nachfolgend beschriebenen Pathogenese-Mechanismen und des dadurch entstehenden Kontakt zu immunkompetenten Zellen als Vektor für Fremdanigene außerordentlich geeignet. Durch die Vakzinierung mit Bakterienextrakten bzw. lebenden Bakterien können Immunantworten in Richtung Th1 polarisiert werden, da Th2-abhängige Immunantworten bei der Abwehr intrazellulärer Bakterien nur eine geringe Rolle spielen (Kaufmann, 1993).

Der Wildtyp *S. typhimurium* ist für den Menschen und verschiedene Tiere obligat pathogen (Finlay & Falkow, 1989). Nach oraler Aufnahme und unbeschadeter Magenpassage adhären diese am Darmepithel des unteren Dünndarms, wo sie bevorzugt von M-Zellen (microfold-cells) resorbiert werden (Lee & Schneewind, 1999). M-Zellen sind vermutlich für den Transport von antigenen und immunogenen Substanzen spezialisiert. Die mittels Endozytose resorbierten Stoffe werden über ein tubovesikuläres System zur basolateralen Membran (Lamina propria) befördert, wo sie von lymphoidalen Zellen übernommen werden. Nach der Invasion der M-Zellen gelangen Salmonellen ins lymphoretikuläre Gewebe der Peyer'schen Plaques, wo sie von Makrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert werden und sich in diesen auch zum Teil vermehren (Jones et al., 1994; Sirard et al., 1999). Diese Antigen präsentierenden Zellen wandern zu den mesenteralen Lymphknoten, wo sie T-Zellen stimulieren. Darüber hinaus gelangen Salmonellen in innere Organe wie Milz und Leber. Die Invasionsroute und Zielorte von Salmonellen stimmen insofern mit denen von *E. multilocularis* weitgehend überein und lassen Salmonellen als geeigneten Carrier für *E. multilocularis*-Antigene erscheinen. Zudem kann die lokale, von Salmonellen ausgelöste Immunreaktion zur Abwehr des Parasiten beitragen.

Von *S. typhimurium* wurden in den 80er Jahren eine Reihe stabiler Mutanten erzeugt, um avirulente Lebendimpfstämme zu entwickeln (Cardenas & Clements, 1992). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Zoosaloral H<sup>®</sup> - Impfstamm handelt es sich um eine Doppelmutante (his-155/ade-4), die auxotroph für Histidin und Adenin ist. Durch diese Attenuierung im bakteriellen Stoffwechsel gilt Zoosaloral H<sup>®</sup> als schwach virulent (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 1996).

Die Möglichkeit der effektiven Präsentation von heterologen Antigenen mittels Einsatz lebender, attenuierter Salmonellen als Carrier wurde mehrfach beschrieben (Cardenas & Clements, 1992; Curtiss *et al.*, 1989a; Curtiss *et al.*, 1993; Curtiss *et al.*, 1989b; Curtiss *et al.*, 2009). Während einer natürlichen Infektion mit Salmonellen, wie auch bei der Expression von Fremdartigenen in Salmonellen, werden vorwiegend Th1-Immunantworten gegen den Vektor sowie gegen das rekombinante Fremdartigen induziert (Chong *et al.*, 1996; Klimpel *et al.*, 1995; Mastroeni *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2009). Salmonellen scheinen für Vakzinierungsstudien bei *E. multilocularis* außerordentlich geeignet, da Parasiten-Antigene sowohl an den lokalen Eintrittspforten des Parasiten (Darm-Mukosa, Leber), als auch dem allgemeinen systemischen Immunsystem präsentiert werden (Sirard *et al.*, 1999). Die von den Salmonellen exprimierten Antigene werden dabei sowohl im MHC I- als auch im MHC II-Kontext präsentiert (Aggarwal *et al.*, 1990; Yrlid *et al.*, 2000). Versuche mit Salmonellen, welche das Antigen EMGAPDH exprimierten, führten zu schützenden Immunreaktionen gegen eine Belastungsinfektion mit *Echinococcus multilocularis* (Müller-Schollenberger *et al.*, 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, die *Echinococcus multilocularis* – Antigene EM95 und EMGAPDH von dem Salmonellen Stamm Zoosaloral H<sup>®</sup> zu exprimieren und erstmalig als eukaryotische Proteine mittels des  $\alpha$ -Hämolyisin Sekretionssystems zu exportieren. Diese Konstrukte sollten in Immunisierungsstudien eingesetzt werden und hinsichtlich ihrer Protektivität gegen eine orale Belastungsinfektion getestet werden.

#### 5.9.1 Export von Antigenen mittels des $\alpha$ -Hämolyisin Sekretionssystems

Der Aufbau der Zellwand Gram-negativer Bakterien verlangt besondere Mechanismen für den Export von Proteinen. Das Zytoplasma wird bei Gram-negativen Bakterien durch eine konventionelle innere Membran begrenzt, an der sich der periplasmatische Raum anschließt, in welchem der Mureinsacculus lokalisiert ist. Die asymmetrisch gestaltete äußere Membran setzt sich einerseits aus einer inneren Doppelmembran aus Membranlipiden, welche dem Periplasma zugewandt ist, und einer äußeren Schicht aus Lipopolysacchariden zusammen. Die, in die äußere Membran eingelagerten, integralen Membranproteine dienen als Strukturproteine v.a. dem Austausch von niedermolekularen Substanzen und Oligosacchariden, die aufgrund ihres Molekulargewichtes die Ausschlußgrenze der Porine überschreiten und nur zum Teil durch gerichtete Diffusion oder durch rezeptorvermittelte Aufnahme die Membran passieren können.

Während die Translokation von Proteinen über die Zytoplasmamembran durch den so genannten „*general secretory pathway*“ (GSP) bei Pro- und Eukaryonten hoch konserviert ist (Sakaguchi, 1997), werden Proteine bei Gram-negativen Bakterien durch spezifische Sekretionsmechanismen über beide Membranen transloziert. Gram-negative Bakterien benutzen vier verschiedene Wege (Typ I – IV) der Proteinsekretion. Typ-I und Typ-III Exportsysteme vermitteln den Export von Zielproteinen unabhängig vom GSP. Die zu exportierenden Proteine werden unter Ausschluss des Periplasmas in einem Schritt durch die Zellhülle geschleust und in das umgebende Medium sezerniert. Eine Prozessierung der exportierten Proteine findet nicht statt. Das *E. coli*  $\alpha$ -Hämolyisin - Transportsystem ist das ursprünglichste und am besten charakterisierte Typ I Sekretionssystem (Andersen *et al.*, 2000; Gentschev *et al.*, 2002). Das Typ I - Sekretionssystem unterscheidet sich von anderen Sekretionswegen dadurch, dass 1) nur drei Transport-Komponenten beteiligt sind, wobei zwei funktionell mit der inneren Membran und eines mit der äußeren Membran assoziiert sind. 2) die beteiligten Proteine eine Pore bilden, welche die innere und äußere Membran verbindet. 3) das zu exportierende Protein direkt und ohne die Bildung von periplasmatischen Zwischenstufen in das extrazelluläre Medium sekretiert wird, wobei 4) das Sekretionssignal stets am Carboxyl –Terminus des zu sekretierenden Proteins lokalisiert ist, und 5) dieses Sekretionssignal in den meisten Fällen weder während noch nach dem Export abgespalten wird. 6) Einige dieser Typ I Genecluster befinden sich auf Plasmiden, und sind dadurch leicht zugänglich für genetische Manipulationen (Gentschev *et al.*, 2002).

*Escherichia coli*  $\alpha$ -Hämolyisin gehört in die Gruppe der sogenannten RTX-Proteine (repeats in toxins) und wird vor allem von uropathogenen *E. coli* – Stämmen (UPEC) gebildet (Welch *et al.*, 1981). Aufgrund der zytolytischen und zytotoxischen Eigenschaften von  $\alpha$ -Hämolyisin (HlyA) stellt dieses einen bedeutenden Virulenzfaktor für eine große Bandbreite von Säugetierzellen dar. Synthese, Aktivierung und Sekretion von *E. coli* – HlyA wird von *hlyCABD*-Operon gesteuert. Dieses kann entweder auf chromosomalen Pathogenitätsinseln gelagert sein oder aber auf übertragbaren Plasmiden. Der Exportmechanismus von  $\alpha$ -Hämolyisin basiert auf dem Zusammenspiel dreier Komponenten: HlyB, HlyD und TolC (Wandersman & Delepelaire, 1990). HlyC ist eine Fettsäure-Acetyltransferase, welche im Zytoplasma Pro-HlyA in dessen hämolytisch aktive Form acyliert und dessen Sekretion nicht beeinflusst (Issartel *et al.*, 1991). HlyB gehört zu den ABC-Transportern, eine Superfamilie eukaryotischer und prokaryotischer Membranproteine, welche als gemeinschaftliches Strukturelement eine ATP-bindende Kasette (ATP-binding cassette, ABC) aufweisen (Holland and Blight, 1999). In der inneren Membran ist HlyB mit acht hydrophobischen,  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomainen eingebettet (Gentschev & Goebel, 1992). HlyD ist ein eingehend beschriebenes Mitglied der Periplasmatischen Efflux Proteine (PEP). Es ist in der zytoplasmatischen Membran mit einer einzigen Transmembrandomain verankert und besitzt zusätzlich eine lange periplasmatische Domäne, welche unter den Membran Fusions Proteinen (MFP) hoch konserviert ist (Dinh *et al.*, 1994). Durch die Bindung von HlyA – Sekretionssignal durch den HlyB-D-Komplex, wird mittels HlyD eine Interaktion mit TolC induziert.

TolC ist ein allgemein verbreitetes Protein der äußeren Membran (OMP = outer membran protein), welches an mindestens vier verschiedenen Export-Systemen beteiligt ist (Zgurskaya & Nikaido, 2000). Im trimeren Zustand formt TolC einen trans-periplasmatischen Tunnel, dessen periplasmatisches,  $\alpha$ -helikales, superspiralisiertes Ende sich beim Kontakt mit einer vermutlich ebenfalls  $\alpha$ -helikalen Domäne von HlyD entspiralisiert und dadurch eine Transport-Pore bildet, durch welche HlyA sekretiert wird (Koronakis *et al.*, 2000).

Das HlyA-Export-System konnte bisher zur direkten Expression von Antigenen mehrfach erfolgreich eingesetzt werden (Garmory *et al.*, 2003; Gentschev *et al.*, 1998; Hotz *et al.*, 2009).

Durch den Einsatz des Plasmides pVDL9.3 (Tzschaschel *et al.*, 1996) gelang es in dieser Arbeit das Metazestoden-Protein EM95 des Zestoden *Echinococcus multilocularis* erfolgreich mittels des HlyA-Systems aus dem Vektor *Salmonella* zu exportieren. Die Expression und der Export konnte in konzentrierten Überständen nachgewiesen werden. Die konstruierte Lebendvaccine ZpVDL9.3EM95 wurde stabil propagiert, die Generationszeiten lagen zwischen 26 und 29 Minuten. Kein Export konnte mittels ZpVDL9.3EMGAPDH erzielt werden. Die Ursachen dafür liegen im Unklaren. Durch das verwendete Klonierungsschema entstand weder aufgrund der verwendeten Primer, noch der angefügten Schnittstellen ein Stoppkodon, was eine plausible Erklärung für das Fehlen des Hly-Anteils wäre. Es bleibt zudem unklar, inwieweit GAPDH im Generellen, aufgrund seiner homotetrameren Struktur und dessen Größe von ca 36 kDa (334 aa), überhaupt mit dem hier angewendeten System exportierbar ist.

#### 5.10 Immunisierungsstudien mit *Salmonella*-Vektoren

Zur Ermittlung der schützenden Eigenschaften von der in dieser Arbeit entwickelten rekombinanten *S. typhimurium*-Lebendvaccine, welche die *E. multilocularis*-Antigen EM95 sowie EMGAPDH exportierten, wurden zwei Immunisierungsstudien durchgeführt. Dazu wurden BALB/c-Mäuse mit einer vorher ausgetesteten Dosis dieser Salmonellen-Konstrukte zweimalig oral immunisiert und daraufhin mit *E. multilocularis* – Eiern infiziert.

Die erste Immunisierungsstudie führte aufgrund einer hohen Verlustrate an Versuchstieren zu schwer interpretierbaren Resultaten. Von insgesamt 17 Mäusen (die anfänglichen Verluste wurden im Abstand von einer Woche unter identischen Bedingungen ersetzt), welche mit ZpVDL9.3EM95 immunisiert worden waren, überlebten nur vier Tiere. Die Immunisierung mit ZpVDL9.3EMGAPDH überlebten nur 6 von 14, die Immunisierung mit dem plasmidfreien Kontrollstamm Zoosoral H<sup>®</sup> überlebten immerhin 9 von 13 Tieren. Vorversuche mit jeweils 2 Versuchstieren unter Gabe einer vergleichbaren Dosis an Salmonellen führte zu keinen Verlust an Versuchstieren. Die Ursache für den Tod der Tiere kann einerseits in einer, durch die Reisolation erhöhten Virulenz der Salmonellen gesucht werden, zum anderen lag es wohl in der Verwendung einer Schlundsonde zur Applikation der Salmonellen. Denkbar wäre, dass durch kleinere Rupturen



in der oralen Mukosa bzw. im Ösophagus Salmonellen in den Blutkreislauf gelangten. Die Konsequenz daraus wäre eine Bakteriämie, welche einen endotoxischen Schock und damit den Tod der Tiere verursacht haben könnte. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass in dem nachfolgenden Versuch, bei welchem die Salmonellen per Fütterung appliziert wurden, alle Mäuse überlebten. Die überlebenden immunisierten Mäuse dieser ersten Studie zeigten nach Immunisierung sowohl mit ZpVDL9.3EM95 als auch mit ZpVDL9.3EMGAPDH eine deutliche Reduktion der Leberzysten von 55% bzw. 39%. Keine Verringerung der sich entwickelnden Metazestoden ergab die Kontrollimmunisierung mit dem plasmidfreien Stamm Zoosaloral H®. Aufgrund der stark verringerten Gruppengröße der Tiere sind diese Ergebnisse jedoch unter Vorbehalt zu beurteilen.

In der zweiten Immunisierungsstudie wurden die *Salmonella*-Impfstämme zweimalig per Fütterung appliziert. Von den pro Versuch eingesetzten 10 BALB/c-Mäusen überlebten diesmal alle Tiere. Tiere die mit ZpVDL9.3EM95 immunisiert wurden zeigten eine 78%ige Reduktion der Metazestodenlast gegenüber der infizierten Kontrollgruppe. Mäuse, die mit ZpVDL9.3EMGAPDH immunisiert wurden, bildeten 73% weniger Zysten aus. In einem weiteren Versuch, in dem zu dem *Salmonella*-Vektor ZpVDL9.3EMGAPDH eine weitere subkutane Immunisierung mit EMGAPDH erfolgte, erzielte eine Abnahme der Metazestodenlast um 87%. Bemerkenswert ist, dass die Kontroll-Immunisierung mit *S. typhimurium* ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Metazestodenlast führte. Dabei verringerte sich die Anzahl der Zysten gegenüber der Kontrollgruppe um 68%.

Obwohl die Ergebnisse der ersten Immunisierungsstudie nur unter Vorbehalt zu bewerten sind, kann aus beiden Vakzinierungsstudien von einer protektiven Wirkung nach Verabreichung von rekombinanten EM95 bzw. EMGAPDH exprimierenden *S. typhimurium* geschlossen werden. Der in der zweiten Immunisierungsstudie beobachtete Rückgang der Parasitenlast bei den nur mit Zoosaloral H® infizierten Tieren könnte durch eine unspezifische Stimulation von Immunzellen zurückzuführen sein. Schon 1983 wurde von Reuben und Tanner die protektive Wirkung von unspezifisch stimulierten Peritonealzellen gegen *Echinococcus*-Infektionen beschrieben. Die Infektion mit *S. typhimurium* induziert in Mäusen, in Abhängigkeit von dem verwendeten Salmonellen-Stamm, der Infektionsdosis und dem infizierten Mausstamm, eine CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort sowie eine funktionelle TH1-Antwort (Chander *et al.*, 1986; Hess *et al.*, 1996; Mastroeni *et al.*, 1992; Mittrucker and Kaufmann, 2000; Nauciel, 1990). Weiterhin kann durch die Infektion mit attenuierten *S. typhimurium* eine generelle Immunsuppression ausgelöst werden, die u.a. durch Stickstoffmonoxid (Mittrucker, 2000, MacFarlane *et al.*, 1999) aber auch durch TGF $\beta$ , IL-10, oder Prostaglandine vermittelt werden kann. Durch ein Proliferationsassay der Milzzellen kann eine generelle Immunsuppression in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Nach Stimulation der Milzzellen mit dem Mitogen ConcanvalinA von immunisierten Tieren sowohl nach Vakzinierung mit ZpVDL9.3EM95 als auch mit ZpVDL9.3EMGAPDH konnte in beiden Versuchen kein Unterschied

zu den nicht infizierten Kontrolltieren beobachtet werden. Die Stimulation mit einem Salmonellen-Gesamt-Antigen führte dagegen in der zweiten Immunisierungsstudie zu einer verminderten Proliferation der Milzzellen. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer generellen Immunsuppression ist die Verwendung von attenuierten Mutanten von *Salmonella typhimurium*. Diese interagieren mit den lymphoiden Geweben des Darmes ohne eine systemische Erkrankung auszulösen (Cardenas *et al.*, 1994). Eine orale Immunisierung von Mäusen (oder auch Hühnern) mit avirulenten *Salmonella*-Stämmen ist daher nicht mit einer Suppression, sondern eher mit einer Stimulation des Immunsystems assoziiert (Curtiss III *et al.*, 1993).

Die Immunisierung mit den *E. multilocularis* – Antigen exprimierenden Salmonellen führte in keinem der Studien zu einer nachweisbaren Antikörper-Bildung gegen EM95 bzw. EMGAPDH. Die Ursache dafür bleibt ungeklärt. Gleiche Ergebnisse erzielt die Arbeit von Müller-Schollenberger, bei welcher durch die orale Applikation von EMGAPDH-exprimierenden *S. typhimurium* ebenfalls eine signifikante Reduktion der Metazestodenlast erzielt wurde, jedoch keine spezifischen Antikörper gegen EMGAPDH detektiert werden konnte (Müller-Schollenberger *et al.*, 2001). Eine antikörpervermittelte Komplementlyse von Onkosphären, welche im Allgemeinen als Ursache für protektive Mechanismen betrachtet wird, scheint somit hier nicht zu greifen. Eine deutliche IgG-Produktion konnte jedoch gegen die verwendeten Salmonellen nachgewiesen werden. Daher scheint dem Adjuvans-Effekt der Salmonellen eine besondere Rolle zu zukommen. Die durch die Salmonellen verstärkte zellvermittelte Immunantwort ist charakterisiert durch eine vermehrte Synthese u.a. von IFN $\gamma$ , IL12 und IL2 sowie eine starke Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischer Lymphozyten (Mastroeni *et al.*, 2001). Eine Reihe von Studien mit rekombinanten *Salmonella*-Stämmen berichten von CTL (zytotoxische T-Lymphozyten)-Antworten gegen Antigene, die zwar von den Salmonellen exprimiert wurden, aber mit den Original-Parasiten-Antigenen vergleichbar sind (Jenkins, 1998). Als Beispiel sei hier die Anwendung einer *S. typhimurium* – Vakzine als Carrier für das Circumsporozoiten – Antigen von *Plasmodium berghei* erwähnt (Sadoff *et al.*, 1988). Die Salmonellen exprimieren das rekombinante *Plasmodium*-Antigen in den Makrophagen, was zu einer Verarbeitung und Präsentation des Antigens in Verbindung mit MHC I – Molekülen führt. Als Konsequenz daraus konnte eine Induktion der CTL nachgewiesen werden (Aggarwal *et al.*, 1990). Neuere Untersuchungen bestätigen diese Erkenntnisse jedoch nicht. McSorley und Jenkins konnten zeigen, dass Knockout-Mäuse mit Defekten von T-Zell-Rezeptoren und des MHC- Klasse II – Rezeptors nicht in der Lage sind, eine Infektion mit avirulenten Salmonellen zu beherrschen. Eine Induktion von IFN $\gamma$  produzierenden CD4+-Zellen (Th1) scheint somit für eine Kontrolle der Salmonellen-Infektion von Bedeutung (McSorley *et al.*, 2000; McSorley & Jenkins, 2000). Die Aktivierung der Th1-Zellen wird daher auf die intrazelluläre Lokalisation der Salmonellen, v.a. in den Makrophagen der Milz zurückgeführt (Comoy *et al.*, 1997). Durch die Versuche von McSorley konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle einer primären Infektion mit attenuierten *S. typhimurium* wesentlich von einer Kostimulation mit CD28 – Zellen abhängt und daher komplett unabhängig von B-Zellen stattfindet

(McSorley & Jenkins, 2000). Die Resistenz gegenüber einem virulenten *Salmonella*-Stamm dagegen ist abhängig von der Präsenz von Antikörpern. Dieser qualitative Unterschied der Notwendigkeit von Antikörpern bei virulenten und attenuierten Salmonellen wird mit unterschiedlichen Wachstumsraten *in vivo* erklärt. Diese Erkenntnisse unterstützen die in dieser Arbeit gefundene Abwesenheit der vermuteten spezifischen Antikörper gegen EM95 und EMGAPDH.

#### 5.11 Post-infectionem Vakzinierung mit EM95

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, welchen Einfluß eine *post infectionem* Immunisierung mit dem rekombinanten Antigen EM95 auf eine bereits bestehende Infektion hat. Em95 wurde aufgrund seiner ausgeprägten protektiven Eigenschaften für diese Studie gewählt. Die Immunisierung mit EM95 erfolgte zu den Zeitpunkten 4dpi, 7dpi, 24dpi und 60dpi.

In keinem dieser vier Versuchsgruppen konnte eine signifikante Verringerung der Läsionen festgestellt werden. Die gebildeten Metazestoden unterschieden sich bei allen immunisierten Gruppen weder in Form noch Größe zu den nicht immunisierten Kontrolltieren. Die *post-infectionem* Immunisierung mit dem rekombinanten Antigen EM95 hatte somit, unabhängig von dem Immunisierungszeitpunkt, keine Auswirkung auf die sich bildenden Läsionen. Diese Ergebnisse lassen erkennen, das *E. multilocularis* sowohl vor als auch nach Ausbildung der Laminareschicht gegen eine nachträgliche, durch die Immunisierung mit EM95 induzierte, Immunantwort geschützt ist.

## 6 Zusammenfassung

Die Larvalstadien von *Echinococcus multilocularis* verursachen beim Menschen das Krankheitsbild der alveolären Echinokokkose (AE), welches laut WHO die gefährlichste parasiteninduzierte Zoonose in Mitteleuropa darstellt. Aufgrund zunehmender Fuchspopulationen, insbesondere in urbanen Ballungsräumen, ist ein ansteigender Infektionsdruck auf die Bevölkerung anzunehmen. Weitere Erkenntnisse über Infektionsverlauf und mögliche protektive Mechanismen gegen eine Infektion mit diesem Zestoden sind daher von großem Wert.

In beinahe allen vorangegangenen Infektionsstudien mit *Echinococcus multilocularis* im Zwischenwirt wurde die Methode der intraperitonealen bzw. intrahepatischen Applikation von Metazestodengewebe (sekundäre Echinokokkose) als Infektionsweg gewählt. Da diese nicht dem natürlichen Verlauf entspricht, können sowohl schützende Mechanismen als auch resultierende Immunantworten, insbesondere in der Frühphase der Infektion, nicht ohne Einschränkungen auf die einer primären alveolären Echinokokkose, d.h. Oralinfektion übertragen werden. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der primären AE durchgeführt, welche, gegeben durch die Humanpathogenität des Parasiten, durch die Einrichtung eines speziellen Hochsicherheitslabors in FG Parasitologie der Universität Hohenheim möglich ist. Ein nicht zu unterschätzendes Problem besteht in der Beschaffung von infektiösen *Echinococcus multilocularis* Eiern. Von über 1600 untersuchten Füchsen bzw. Fuchsdärmen konnten in einem Zeitraum von 4 Jahren nur 7 Eichargen mit ausreichender Infektiosität erhalten werden.

Um die protektiven Eigenschaften der *E. multilocularis*-Antigene EM95 und EMGAPDH in verschiedenen Immunisierungsmodellen zu testen, wurden mehrere Vakzinierungsstudien durchgeführt. Die Antigene wurden einerseits in einer konservativen Vakzinierungsstrategie als aufgereinigte Proteine in Verbindung mit einem Adjuvans subkutan appliziert, andererseits wurde ein System entwickelt, in welchem diese Antigene von Salmonellen exprimiert und im Falle von EM95 durch das HämolysinA-Transportsystems erfolgreich exportiert werden.

Die neu konstruierten *Salmonella typhimurium* – Lebendvakzinen ZpVDL9.3EM95 und ZpVDL9.3EMGAPDH wurden ebenfalls in Immunisierungsexperimenten getestet.

Sowohl die konservative Immunisierung mit EM95 und EMGAPDH als auch die Immunisierung mit den in dieser Arbeit neu konstruierten *Salmonella*-Lebendvakzinen, führte zu signifikanten Protektionen gegen eine *E. multilocularis* – Infektion im Zwischenwirt.

In zwei unabhängigen Immunisierungsstudien, in welchen EMGAPDH mit Saponin als Adjuvans subkutan appliziert wurde, konnte eine signifikante Reduktion der Zystenbildung erzielt werden. Die Parasitenbürde verringerte sich gegenüber den infizierten Kontrolltieren um 76,4% im ersten Versuch und 86,1% im zweiten Versuch.

Durch die subkutane Immunisierung mit dem Antigen EM95 konnte die Parasitenlast in zwei Versuchen um 96,9% bzw. 98,4% gegenüber den infizierten Kontrolltieren verringert werden. In beiden Versuchen wiesen 60% der Tiere keine Läsionen auf und zeigten somit einen vollständigen (tatsächlichen) Infektionsschutz gegen *E. multilocularis*. Ein Einfluss der sekretorischer Einheit und der Transmembrandomain von EM95 kann aufgrund der hier durchgeführten Studien ausgeschlossen werden. Weiterhin kann ein unterstützender Effekt von Gluthadion-S-Transferase, welches in vorangegangenen Studien als Fusionspartner von EM95 verwendet wurde ausgeschlossen werden.

Die subkutanen Immunisierungen mit den rekombinanten Antigenen EM95 und EMGAPDH induzierten einen hohen Antikörpertiter gegen diese Proteine, welche vorwiegend auf den IgG-Subklassen IgG1 und IgG2a beruhten. *E. multilocularis* - Gesamtantigen – spezifische Antikörper konnten nach 4wöchiger Infektionsdauer weder bei geschützten Tieren noch den infizierten Kontrollgruppen festgestellt werden. Die Vakzinierungsstudien mit den rekombinanten Antigenen EM95 und EMGAPDH lassen den Schluss zu, dass das Immunsystem der Mäuse angeregt wird geeignete Zielepitope auf der Onkosphärenoberfläche zu erkennen und über den Mechanismus der klassischen Komplementaktivierung die Onkosphären abzutöten. Eine allgemeine Immunsuppression nach einer Infektion mit *E. multilocularis* kann weder nach Infektion noch nach Immunisierung mit EMGAPDH erkannt werden. Einzig die subkutane Immunisierung mit EM95 führte zu einer verminderten Proliferationsfähigkeit der Milzzellen nach Stimulation mit Gesamt – *E. multilocularis* – Antigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulierung ausgewählter Zytokine während einer Infektion mit *E. multilocularis* erstmalig anhand der mRNA-Expression mittels quantitativer PCR ermittelt. Aufgrund der erhöhten Ausschüttung von IFN $\gamma$  nach Immunisierung mit den rekombinanten Antigenen EM95 und EMGAPDH scheint eine Beteiligung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen an den protektiven Immunmechanismen gegen eine Infektion mit *E. multilocularis* höchst wahrscheinlich. Werden die hier untersuchten immunologischen Parameter der vakzinieren Tiere zusammengefasst, beruhen die protektiven Mechanismen auf eine Th1-geprägte Immunantwort. Eine Beteiligung von Th2-Komponenten ist jedoch denkbar, da zumindest in einem Teil der Studien eine Detektion von IL-10 erfolgte und eine ausgeprägte IgG1 Antikörper-Bildung nach Immunisierung stattfand.

Durch den Einsatz des Plasmides pVDL9.3 gelang es in dieser Arbeit erstmalig das Metazooen-Protein EM95 des Zestoden *Echinococcus multilocularis* erfolgreich mittels des HämolyisinA-Systems aus dem Vektor *Salmonella typhimurium* zu exportieren. Die Expression und der Export von EM95 konnte in konzentrierten Überständen der Lebendvakzinen nachgewiesen werden.

Durch die Immunisierung mit ZpVDL9.3EM95 konnte in einer Studie eine 78%ige Reduktion der Metazestodenlast gegenüber der infizierten Kontrollgruppe erzielt werden. Mäuse, welche mit dem EMGAPDH exprimierenden Salmonellen-Stamm ZpVDL9.3EMGAPDH immunisiert wurden,

bildeten 73% weniger Zysten aus. In einem weiteren Versuch, in dem zu dem *Salmonella*-Vektor ZpVDL9.3EMGAPDH eine weitere subkutane Immunisierung mit EMGAPDH erfolgte, erzielte eine Abnahme der Metazestodenbildung um 87%. Eine Kontroll-Immunisierung mit *S. typhimurium* führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Metazestodenlast um 68%. Eine Bildung von Antikörpern gegen die *E. multilocularis* – Antigene EM95 und EMGAPDH konnte nach Immunisierung mit den *Salmonella*-Vektoren nicht nachgewiesen werden. Die Antikörperbildung gegen *S. typhimurium* dagegen war deutlich ausgeprägt.

Eine subkutane Immunisierung *post infectionem* mit EM95 und Saponin als Adjuvans zu den Zeitpunkten 4dpi, 7dpi, 24dpi und 60dpi führte weder zu einer Reduktion der Metazestodenlast, noch wurde eine Veränderung in der Größe der einzelnen Zysten festgestellt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der schützenden Eigenschaften von EM95 und EMGAPDH unter Anwendung des natürlichen Infektionsmodus erhöhen das Verständnis protektiver Immunmechanismen gegen eine *Echinococcus multilocularis* Infektion. Die Konstruktion eines Immunisierungssystems in Form einer *Salmonella typhimurium* – Lebendvaccine, welche Metazoen-Antigene exportiert, eröffnet neue Möglichkeiten für zukünftige Immunisierungsansätze gegen diverse Parasiten.

## 7 Summary

The larval stages of *Echinococcus multilocularis* are the causative agents of the human alveolar echinococcosis (AE), which is according to the WHO the most important parasite-induced zoonosis in middle Europe. It is supposed that the infection pressure on the human population will increase due to the rising fox population, especially in urban surroundings. Therefore, additional knowledge about the infection process and possible protective mechanisms against an infection with this cestode would be of great value.

Almost all previous studies about *Echinococcus multilocularis* infections in the intermediate host were carried out by using the secondary echinococcosis as route of infection, which means the intraperitoneal or intrahepatic administration of metacestode tissue. This route of infection doesn't correspond to the natural route, the oral uptake of *Echinococcus* eggs resulting in a primary alveolar echinococcosis. Thereby, the protective mechanisms as well as the resulting immune responses of the secondary AE cannot be converted without reservations to the primary AE, especially in the early stages of the infection. On that account the primary AE was carried out in this study. This was possible due to the fact that the department of Parasitology of the University of Hohenheim is in possession of a high security laboratory in which such experiments with highly infectious material can be performed. A not to be underestimated problem is the acquisition of infectious *Echinococcus multilocularis* eggs. Over a period of 4 years just 7 egg isolates with sufficient infectiousness could be obtained of more than 1600 examined foxes and fox intestines respectively.

Several vaccination trials were carried out to test the protective properties of the *E. multilocularis* antigens EM95 and EMGAPDH with different schemes of immunisation. On the one hand a conservative vaccination with purified antigen proteins in combination with an adjuvant was subcutaneous administered and on the other hand a system was developed in which the antigen EM95 were expressed by salmonellae and exported via the hemolysinA-transport system.

The conservative immunisation with EM95 and EMGAPDH as well as the immunisation with the newly designed *Salmonella* – live vaccine resulted in a significant protection of the intermediate host against an *E. multilocularis* infection.

A significant reduction of the formation of cysts could be achieved in two separate immunisation trials with EMGAPDH combined with the adjuvant Saponin which was administered subcutaneously. The manifestation of cysts was reduced by 76.4 % in the first and 86.1 % in the second trial compared to the infected control group.

The subcutaneous immunisation with the antigen EM95 reduced the manifestation of cysts even by 96.9 % and 98.4 % respectively. Sixty percentages of the animals showed a complete protection against an infection with *E. multilocularis* in both trials. Based of the experiments which

were carried out during this study, the influence of the secretory unit or the transmembrane domain of EM95 can be excluded. Furthermore, it could be shown that a protection supporting effect of Glutathion S-transferase, which was used as a fusion protein of EM95 in previous studies, does not exist.

The subcutaneous immunisation with the recombinant antigens EM95 and EMGAPDH induced a high antibody titre against those proteins, which based predominantly on the IgG-subclasses IgG1 and IgG2a. The detection of specific antibodies against *E. multilocularis* crude antigen after duration of infection of 4 weeks was neither in protected animals nor in the infected control group possible. The vaccination trials with the recombinant antigens EM95 and EMGAPDH lead us to the conclusion that the murine immune system was stimulated to detect suitable target epitopes of the oncosphere surface and to destroy these oncospheres by classical complement activation. A general immunosuppression of an *E. multilocularis* infection could not be observed after infection in not-immunized animals or mice with EMGAPDH treatment. Only the subcutaneous immunisation with EM95 resulted in a reduced proliferation of spleen cells after stimulation with *E. multilocularis* crude antigen.

For the first time, the regulation of selected cytokines during an *E. multilocularis* infection was detected by analysis of the mRNA expression through a quantitative PCR. It seems very probable that cytotoxic T-cells and natural killer cells are involved in the protective immune mechanisms against an *E. multilocularis* infection owing to the finding of an increased release of IFN $\gamma$  as a result of an immunisation with the recombinant antigens EM95 and EMGAPDH. Summarizing the investigated immunological parameters, the protective mechanisms are based on a Th1 associated immune response. Nevertheless, an involvement of Th2 components is conceivable due to the fact that at least in parts of the study the cytokine IL-10 and a distinct IgG1 antibody response could be detected past the immunisation.

By the use of the plasmid pVDL9.3 we succeeded for the first time to manipulate *Salmonella typhimurium* to export the metazoan protein EM95 via the hemolysinA-system. The effective expression and export of this protein could be verified in concentrated supernatants of the live vaccines.

The immunisation with ZpVDL9.3EM95 resulted in a reduction of manifested cysts by 78 % compared to the infected control group. Mice immunized with ZpVDL9.3EMGAPDH, where an export was not accomplished, showed a decrease in cysts manifestation by 73 %. The amount of cysts could be further reduced up to 87 % by the combined immunisation with the *Salmonella* vector ZpVDL9.3EMGAPDH and a subcutaneous application of EMGAPDH. A significant reduction of cysts (68 %) could be also observed by the control immunisation with plain *S. typhimurium*. Antibodies against the *E. multilocularis* antigens EM95 and EMGAPDH could not be detected after the immunisation with the *Salmonella* vectors. However, the antibody formation against *S. typhimurium* was strongly developed.



A subcutaneous post infection immunisation trial with EM95 in combination with the adjuvant Saponin at the time of 4dpi, 7dpi, 24dpi and 60dpi led neither to a reduction of the amount of cysts nor to a change in size of the developed cysts.

The gained insights of this study into the protective potential of EM95 and EMGAPDH on the basis of a natural infection route expand the knowledge and understanding about the protective immune mechanisms against an *Echinococcus multilocularis* infection. The development of an immunisation system in form of a *Salmonella typhimurium* live vaccine, with the ability of exporting metazoan antigens, opens up new possibilities of immunisation strategies against diverse parasites in future.

## 8 Literatur

- ABBAS, A. K., MURPHY, K. M. and SHER, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**, 787-793.
- AGGARWAL, A., KUMAR, S., JAFFE, R., HONE, D., GROSS, M. and SADOFF, J. (1990). Oral Salmonella: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. *J Exp Med*, **172**, 1083-1090.
- ALI-KHAN, Z. and SIBOO, R. (1981). Echinococcus multilocularis: distribution and persistence of specific host immunoglobulins on cysts membranes. *Exp Parasitol*, **51**, 159-168.
- ALI-KHAN, Z., SIPE, J. D., DU, T. and RIML, H. (1988). Echinococcus multilocularis: relationship between persistent inflammation, serum amyloid A protein response and amyloidosis in four mouse strains. *Exp Parasitol*, **67**, 334-345.
- ALKARMI, T., DAR, F. K. and OOI, H. K. (1994). Echinococcus multilocularis: effect of size of inoculum and route of infection on metastasis, amyloidogenesis and alveolar hydatid cysts mass in mice. *J Vet Med Sci*, **56**, 335-339.
- ALKARMI, T. O. and ALI-KHAN, Z. (1984). Chronic alveolar hydatidosis and secondary amyloidosis: pathological aspects of the disease in four strains of mice. *Br J Exp Pathol*, **65**, 405-417.
- AMMANN, R. W. and ECKERT, J. (1996). Cestodes. Echinococcus. *Gastroenterol Clin North Am*, **25**, 655-689.
- ANDERSEN, C., HUGHES, C. and KORONAKIS, V. (2000). Chunnel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels. *EMBO Rep*, **1**, 313-318.
- ARGIRO, L. L., KOHLSTADT, S. S., HENRI, S. S., DESSEIN, H. H., MATABIAU, V. V., PARIS, P. P., BOURGOIS, A. A. and DESSEIN, A. J. (2000). Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kDa Schistosoma mansoni GAPDH. *Vaccine*, **18**, 2039-2048.
- BAUDER, B. (1998). EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR B- UND T-ZELL-IMMUNANTWORT BEI PRIMÄRER ALVEOLÄRER ECHINOKOKKOSE.
- BAUDER, B., AUER, H., SCHILCHER, F., GABLER, C., ROMIG, T., BILGER, B. and ASPOCK, H. (1999). Experimental investigations on the B and T cell immune response in primary alveolar echinococcosis. *Parasite Immunol*, **21**, 409-421.
- BILGER, B. (1999). Identifizierung und Charakterisierung von Antigenen der frühen Infektionsstadien *Echinococcus multilocularis*. *Dissertation Universität Hohenheim*.
- BRESSON-HADNI, S., LAPLANTE, J. J., LENYS, D., ROHMER, P., GOTTSTEIN, B., JACQUIER, P., MERCET, P., MEYER, J. P., MIGUET, J. P. and VUITTON, D. A. (1994). Seroepidemiologic screening of Echinococcus multilocularis infection in a European area endemic for alveolar echinococcosis. *Am J Trop Med Hyg*, **51**, 837-846.

- BRESSON-HADNI, S., LIANCE, M., MEYER, J. P., HOUIN, R., BRESSON, J. L. and VUITTON, D. A. (1990). Cellular immunity in experimental *Echinococcus multilocularis* infection. II. Sequential and comparative phenotypic study of the periparasitic mononuclear cells in resistant and sensitive mice. *Clin Exp Immunol*, **82**, 378-383.
- CAMPBELL, I. D. and SPITZFADEN, C. (1994). Building proteins with fibronectin type III modules. *Structure*, **2**, 333-337.
- CAPRON, A., CAPRON, M., DOMBROWICZ, D. and RIVEAU, G. (2001). Vaccine strategies against schistosomiasis: from concepts to clinical trials. *Int Arch Allergy Immunol*, **124**, 9-15.
- CAPRON, A., DESSAINT, J. P., CAPRON, M. and PIERCE, R. J. (1992). Vaccine strategies against schistosomiasis. *Immunobiology*, **184**, 282-294.
- CARDENAS, L. and CLEMENTS, J. D. (1992). Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clin Microbiol Rev*, **5**, 328-342.
- CARDENAS, L., DASGUPTA, U. and CLEMENTS, J. D. (1994). Influence of strain viability and antigen dose on the use of attenuated mutants of *Salmonella* as vaccine carriers. *Vaccine*, **12**, 833-840.
- CHONG, C., BOST, K. L. and CLEMENTS, J. D. (1996). Differential production of interleukin-12 mRNA by murine macrophages in response to viable or killed *Salmonella* spp. *Infect Immun*, **64**, 1154-1160.
- COMOY, E. E., CAPRON, A. and THYPHRONITIS, G. (1997). In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *Int Immunol*, **9**, 523-531.
- CONG, H., GU, Q. M., JIANG, Y., HE, S. Y., ZHOU, H. Y., YANG, T. T., LI, Y. and ZHAO, Q. L. (2005). Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*, **27**, 29-35.
- COX, F. E. (1997). Designer vaccines for parasitic diseases. *Int J Parasitol*, **27**, 1147-1157.
- CURTISS, R., 3RD, KELLY, S. M., GULIG, P. A. and NAKAYAMA, K. (1989a). Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*, **146**, 35-49.
- CURTISS, R., 3RD, KELLY, S. M. and HASSAN, J. O. (1993). Live oral avirulent *Salmonella* vaccines. *Vet Microbiol*, **37**, 397-405.
- CURTISS, R., 3RD, NAKAYAMA, K. and KELLY, S. M. (1989b). Recombinant avirulent *Salmonella* vaccine strains with stable maintenance and high level expression of cloned genes in vivo. *Immunol Invest*, **18**, 583-596.
- CURTISS, R., 3RD, WANDA, S. Y., GUNN, B. M., ZHANG, X., TINGE, S. A., ANANTHNARAYAN, V., MO, H., WANG, S. and KONG, W. (2009). *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect Immun*, **77**, 1071-1082.

- D'ALESSANDRO, A. and RAUSCH, R. L. (2008). New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. *Clin Microbiol Rev*, **21**, 380-401, table of contents.
- DAI, W. J. and GOTTSTEIN, B. (1999). Nitric oxide-mediated immunosuppression following murine *Echinococcus multilocularis* infection. *Immunology*, **97**, 107-116.
- DAI, W. J., HEMPHILL, A., WALDVOGEL, A., INGOLD, K., DEPLAZES, P., MOSSMANN, H. and GOTTSTEIN, B. (2001). Major carbohydrate antigen of *Echinococcus multilocularis* induces an immunoglobulin G response independent of alpha beta+ CD4+ T cells. *Infect Immun*, **69**, 6074-6083.
- DANSON, F. M., GIRAUDOUX, P. and CRAIG, P. S. (2006). Spatial modelling and ecology of *Echinococcus multilocularis* transmission in China. *Parasitol Int*, **55 Suppl**, S227-231.
- DEMATTEIS, S., ROTTENBERG, M. and BAZ, A. (2003). Cytokine response and outcome of infection depends on the infective dose of parasites in experimental infection by *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol*, **25**, 189-197.
- DEMPSTER, R. P., BERRIDGE, M. V., HARRISON, G. B. and HEATH, D. D. (1991). *Echinococcus granulosus*: development of an intermediate host mouse model for use in vaccination studies. *Int J Parasitol*, **21**, 549-554.
- DEMPSTER, R. P. and HARRISON, G. B. (1995). Maternal transfer of protection from *Echinococcus granulosus* infection in sheep. *Res Vet Sci*, **58**, 197-202.
- DEMPSTER, R. P., HARRISON, G. B., BERRIDGE, M. V. and HEATH, D. D. (1992). *Echinococcus granulosus*: use of an intermediate host mouse model to evaluate sources of protective antigens and a role for antibody in the immune response. *Int J Parasitol*, **22**, 435-441.
- DEPLAZES, P., HEGGLIN, D., GLOOR, S. and ROMIG, T. (2004). Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends Parasitol*, **20**, 77-84.
- DINH, T., PAULSEN, I. T. and SAIER, M. H., JR. (1994). A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, **176**, 3825-3831.
- DVOROZNAKOVA, E., PORUBCOVA, J. and SEVCIKOVA, Z. (2009). Immune response of mice with alveolar echinococcosis to therapy with transfer factor, alone and in combination with albendazole. *Parasitol Res*, **105**, 1067-1076.
- ECKERT, J. and DEPLAZES, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev*, **17**, 107-135.
- ECKERT, J., GEMMELL, M. A., MESLIN, F.-X. and PAWŁOWSKI, Z. S. (2002). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern.

- EIERMANN, T. H., BETTENS, F., TIBERGHIE, P., SCHMITZ, K., BEURTON, I., BRESSON-HADNI, S., AMMANN, R. W., GOLDMANN, S. F., VUITTON, D. A., GOTTSTEIN, B. and KERN, P. (1998). HLA and alveolar echinococcosis. *Tissue Antigens*, **52**, 124-129.
- EMERY, I., LECLERC, C., SENGPHOMMACHANH, K., VUITTON, D. A. and LIANCE, M. (1998). In vivo treatment with recombinant IL-12 protects C57BL/6J mice against secondary alveolar echinococcosis. *Parasite Immunol*, **20**, 81-91.
- EMERY, I., LIANCE, M., DERIAUD, E., VUITTON, D. A., HOUIN, R. and LECLERC, C. (1996). Characterization of T-cell immune responses of Echinococcus multilocularis-infected C57BL/6J mice. *Parasite Immunol*, **18**, 463-472.
- EMERY, I., LIANCE, M. and LECLERC, C. (1997). Secondary Echinococcus multilocularis infection in A/J mice: delayed metacestode development is associated with Th1 cytokine production. *Parasite Immunol*, **19**, 493-503.
- FINLAY, B. B. and FALKOW, S. (1989). Salmonella as an intracellular parasite. *Mol Microbiol*, **3**, 1833-1841.
- FRANK, W. (1984). Echinococcus multilocularis- ein endemischer Bandwurm des Rotfuchses in Süddeutschland. Biologie, Epidemiologie und humanmedizinische Bedeutung. *Wien. tierärztl. Mschr.*, **1**, 19-22.
- GARMORY, H. S., TITBALL, R. W., GRIFFIN, K. F., HAHN, U., BOHM, R. and BEYER, W. (2003). Salmonella enterica serovar typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the Bacillus anthracis protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. *Infect Immun*, **71**, 3831-3836.
- GAUCI, C., MERLI, M., MULLER, V., CHOW, C., YAGI, K., MACKENSTEDT, U. and LIGHTOWLERS, M. W. (2002). Molecular cloning of a vaccine antigen against infection with the larval stage of Echinococcus multilocularis. *Infect Immun*, **70**, 3969-3972.
- GAUCI, C. G., FLISSER, A. and LIGHTOWLERS, M. W. (1998). A Taenia solium oncosphere protein homologous to host-protective Taenia ovis and Taenia saginata 18 kDa antigens. *Int J Parasitol*, **28**, 757-760.
- GEMMELL, M. A. (1966). Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. IV. Species specificity of hexacanth embryos in protecting sheep against Echinococcus granulosus. *Immunology*, **11**, 325-335.
- GEMMELL, M. A., LAWSON, J. R. and ROBERTS, M. G. (1987). Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: evaluation of the biological parameters of Taenia hydatigena and T. ovis and comparison with those of Echinococcus granulosus. *Parasitology*, **94 ( Pt 1)**, 161-180.

- GEMMELL, M. A., LAWSON, J. R., ROBERTS, M. G. and GRIFFIN, J. F. (1990). Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: regulation of *Taenia hydatigena* and *T. ovis* in lambs through passively transferred immunity. *Parasitology*, **101 Pt 1**, 145-151.
- GENTSCHEV, I., DIETRICH, G. and GOEBEL, W. (2002). The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol*, **10**, 39-45.
- GENTSCHEV, I., GLASER, I., GOEBEL, W., MCKEEVER, D. J., MUSOKE, A. and HEUSSLER, V. T. (1998). Delivery of the p67 sporozoite antigen of *Theileria parva* by using recombinant *Salmonella dublin*: secretion of the product enhances specific antibody responses in cattle. *Infect Immun*, **66**, 2060-2064.
- GENTSCHEV, I. and GOEBEL, W. (1992). Topological and functional studies on HlyB of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, **232**, 40-48.
- GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALLONNE, B., BOUILLON, R. and MATHIEU, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, **25**, 386-401.
- GODOT, V., HARRAGA, S., BEURTON, I., TIBERGHIE, P., SARCIRON, E., GOTTSTEIN, B. and VUITTON, D. A. (2000). Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. II. Influence of the HLA B8, DR3, DQ2 haplotype. *Clin Exp Immunol*, **121**, 491-498.
- GODOT, V., HARRAGA, S., PODOPRIGORA, G., LIANCE, M., BARDONNET, K. and VUITTON, D. A. (2003). IFN alpha-2a protects mice against a helminth infection of the liver and modulates immune responses. *Gastroenterology*, **124**, 1441-1450.
- GOTTSTEIN, B., DAI, W. J., WALKER, M., STETTLER, M., MULLER, N. and HEMPHILL, A. (2002). An intact laminated layer is important for the establishment of secondary *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasitol Res*, **88**, 822-828.
- GOTTSTEIN, B. and FELLEISEN, R. (1995). Protective immune mechanisms against the metacestode of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Today*, **11**, 320-326.
- GOTTSTEIN, B., HAAG, K., WALKER, M., MATSUMOTO, J., MEJRI, N. and HEMPHILL, A. (2006). Molecular survival strategies of *Echinococcus multilocularis* in the murine host. *Parasitol Int*, **55 Suppl**, S45-49.
- GOTTSTEIN, B. and HEMPHILL, A. (1997). Immunopathology of echinococcosis. *Chem Immunol*, **66**, 177-208.
- GOTTSTEIN, B. and HEMPHILL, A. (2008). *Echinococcus multilocularis*: the parasite-host interplay. *Exp Parasitol*, **119**, 447-452.
- GOTTSTEIN, B., SCHANTZ, P. M. and WILSON, J. F. (1985). Serological screening for *Echinococcus multilocularis* infections with ELISA. *Lancet*, **1**, 1097-1098.

- GOTTSTEIN, B., WUNDERLIN, E. and TANNER, I. (1994). Echinococcus multilocularis: parasite-specific humoral and cellular immune response subsets in mouse strains susceptible (AKR, C57B1/6J) or 'resistant' (C57B1/10) to secondary alveolar echinococcosis. *Clin Exp Immunol*, **96**, 245-252.
- GUERRET, S., VUITTON, D. A., LIANCE, M., PATER, C. and CARBILLET, J. P. (1998). Echinococcus multilocularis: relationship between susceptibility/resistance and liver fibrogenesis in experimental mice. *Parasitol Res*, **84**, 657-667.
- GULER, M. L., GORHAM, J. D., HSIEH, C. S., MACKEY, A. J., STEEN, R. G., DIETRICH, W. F. and MURPHY, K. M. (1996). Genetic susceptibility to Leishmania: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. *Science*, **271**, 984-987.
- HAAG, K. L., ZAHA, A., ARAUJO, A. M. and GOTTSTEIN, B. (1997). Reduced genetic variability within coding and non-coding regions of the Echinococcus multilocularis genome. *Parasitology*, **115 (Pt 5)**, 521-529.
- HANAUER, A. and MANDEL, J. L. (1984). The glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase gene family: structure of a human cDNA and of an X chromosome linked pseudogene; amazing complexity of the gene family in mouse. *EMBO J*, **3**, 2627-2633.
- HANLE, M. M., BANZHAF, H. M., FORSBACH-BIRK, V., KIRCH, A., AKINLI, A. S., MASON, R. A., REUTER, S. and KRATZER, W. (2009). Screening methods in alveolar echinococcosis: a follow-up study comparing Emc- and Emf-ELISA with Em2plus-ELISA and ultrasonography. *Epidemiol Infect*, **137**, 139-144.
- HARALABIDIS, S., KARAGOUNI, E., FRYDAS, S. and DOTSIKA, E. (1995). Immunoglobulin and cytokine profile in murine secondary hydatidosis. *Parasite Immunol*, **17**, 625-630.
- HARRAGA, S., GODOT, V., BRESSON-HADNI, S., PATER, C., BEURTON, I., BARTHOLOMOT, B. and VUITTON, D. A. (1999). Clinical efficacy of and switch from T helper 2 to T helper 1 cytokine profile after interferon alpha2a monotherapy for human echinococcosis. *Clin Infect Dis*, **29**, 205-206.
- HARRISON, G. B., HEATH, D. D., DEMPSTER, R. P., GAUCI, C., NEWTON, S. E., CAMERON, W. G., ROBINSON, C. M., LAWRENCE, S. B., LIGHTOWLERS, M. W. and RICKARD, M. D. (1996). Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from Taenia ovis oncospheres. *Int J Parasitol*, **26**, 195-204.
- HEATH, D. D., HOLCMAN, B. and SHAW, R. J. (1994). Echinococcus granulosus: the mechanism of oncosphere lysis by sheep complement and antibody. *Int J Parasitol*, **24**, 929-935.
- HEATH, D. D., LAWRENCE, S. B. and YONG, W. K. (1979). Cross-protection between the cysts of Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena and T ovis in lambs. *Res Vet Sci*, **27**, 210-212.
- HEATH, D. D., PARMETER, S. N., OSBORN, P. J. and LAWRENCE, S. B. (1981). Resistance to Echinococcus granulosus infection in lambs. *J Parasitol*, **67**, 797-799.

- HEGLIN, D., BONTADINA, F., GLOOR, S., ROMIG, T., DEPLAZES, P. and KERN, P. (2008). Survey of public knowledge about *Echinococcus multilocularis* in four European countries: need for proactive information. *BMC Public Health*, **8**, 247.
- HEMPHILL, A. and MULLER, J. (2009). Alveolar and cystic echinococcosis: towards novel chemotherapeutical treatment options. *J Helminthol*, **83**, 99-111.
- HERMEKING, H. and BENZINGER, A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol*, **16**, 183-192.
- HINTZ, E. (1972). Die Aufbereitung des Infektionsmaterials für die intraperitoneale Infektion der Maus mit *Echinococcus multilocularis*. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, **23**, 3279-3286.
- HOTZ, C., FENSTERLE, J., GOEBEL, W., MEYER, S. R., KIRCHGRABER, G., HEISIG, M., FURER, A., DIETRICH, G., RAPP, U. R. and GENTSCHKEV, I. (2009). Improvement of the live vaccine strain *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a for antigen delivery via the hemolysin secretion system of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, **299**, 109-119.
- HUITOREL, P. and PANTALONI, D. (1985). Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur J Biochem*, **150**, 265-269.
- HÜTTNER, M., NAKAO, M., WASSERMANN, T., SIEFERT, L., BOOMKER, J. D., DINKEL, A., SAKO, Y., MACKENSTEDT, U., ROMIG, T. and ITO, A. (2007). Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol*.
- IRIGOIN, F., LAICH, A., FERREIRA, A. M., FERNANDEZ, C., SIM, R. B. and DIAZ, A. (2008). Resistance of the *Echinococcus granulosus* cyst wall to complement activation: analysis of the role of InsP6 deposits. *Parasite Immunol*, **30**, 354-364.
- ISSARTEL, J. P., KORONAKIS, V. and HUGHES, C. (1991). Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature*, **351**, 759-761.
- ITO, A., OSAWA, Y., NAKAO, M., HORII, T., OKAMOTO, M., ITOH, M. and YAMASHITA, T. (1995). Em18 and Em16, new serologic marker epitopes for alveolar echinococcosis in western blot analysis, are the only two epitopes recognized by commercially available weak positive (cut off) sera for Em2plus-ELISA. *J Helminthol*, **69**, 369-371.
- JENKINS, D. J. and MACPHERSON, C. N. (2003). Transmission ecology of *Echinococcus* in wild-life in Australia and Africa. *Parasitology*, **127 Suppl**, S63-72.
- JENNE, L., KILWINSKI, J., SCHEFFOLD, W. and KERN, P. (1997). IL-5 expressed by CD4+ lymphocytes from *Echinococcus multilocularis*-infected patients. *Clin Exp Immunol*, **109**, 90-97.



- JOHNSON, K. S., HARRISON, G. B., LIGHTOWLERS, M. W., O'HOY, K. L., COUGLE, W. G., DEMPSTER, R. P., LAWRENCE, S. B., VINTON, J. G., HEATH, D. D. and RICKARD, M. D. (1989). Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*, **338**, 585-587.
- JONES, B. D., GHORI, N. and FALKOW, S. (1994). Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med*, **180**, 15-23.
- KAMIYA, M. and SATO, H. (1990). Complete life cycle of the canid tapeworm, Echinococcus multilocularis, in laboratory rodents. *FASEB J*, **4**, 3334-3339.
- KATOH, Y., KOUJUCHI, H., MATSUMOTO, J., GOTO, A., SUZUKI, T., OKU, Y. and YAGI, K. (2008). Characterization of emY162 encoding an immunogenic protein cloned from an adult worm-specific cDNA library of Echinococcus multilocularis. *Biochim Biophys Acta*, **1780**, 1-6.
- KAUFMANN, S. H. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol*, **11**, 129-163.
- KENSIL, C. R. (1996). Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **13**, 1-55.
- KERN, P., KRATZER, W. and REUTER, S. (2000). [Alveolar echinococcosis: diagnosis]. *Dtsch Med Wochenschr*, **125**, 59-62.
- KIMURA, H., FURUYA, K., KAWASE, S., SATO, C., YAMANO, K., TAKAHASHI, K., URAGUCHI, K., ITO, T., YAGI, K. and SATO, N. (1999). Recent epidemiologic trends in alveolar echinococcosis prevalence in humans and animals in Hokkaido. *Jpn J Infect Dis*, **52**, 117-120.
- KIZAKI, T., KOBAYASHI, S., OGASAWARA, K., DAY, N. K., GOOD, R. A. and ONOE, K. (1991). Immune suppression induced by protoscoleces of Echinococcus multilocularis in mice. Evidence for the presence of CD8dull suppressor cells in spleens of mice intraperitoneally infected with E. multilocularis. *J Immunol*, **147**, 1659-1666.
- KLIMPEL, G. R., ASUNCION, M., HAITHCOAT, J. and NIESEL, D. W. (1995). Cholera toxin and Salmonella typhimurium induce different cytokine profiles in the gastrointestinal tract. *Infect Immun*, **63**, 1134-1137.
- KNAPP, J., GUISLAIN, M. H., BART, J. M., RAOUL, F., GOTTSTEIN, B., GIRAUDOUX, P. and PIARROUX, R. (2008). Genetic diversity of Echinococcus multilocularis on a local scale. *Infect Genet Evol*, **8**, 367-373.
- KORONAKIS, V., SHARFF, A., KORONAKIS, E., LUISI, B. and HUGHES, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, **405**, 914-919.
- KOUJUCHI, H., MATSUMOTO, J., KATOH, Y., OKU, Y., SUZUKI, T. and YAGI, K. (2007). The vaccination potential of EMY162 antigen against Echinococcus multilocularis infection. *Biochem Biophys Res Commun*, **363**, 915-920.

- KROEZE, W. K. and TANNER, C. E. (1987). Echinococcus multilocularis: susceptibility and responses to infection in inbred mice. *Int J Parasitol*, **17**, 873-883.
- LEE, V. T. and SCHNEEWIND, O. (1999). Type III secretion machines and the pathogenesis of enteric infections caused by Yersinia and Salmonella spp. *Immunol Rev*, **168**, 241-255.
- LETTERIO, J. J. and ROBERTS, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*, **16**, 137-161.
- LIANCE, M., BRESSON-HADNI, S., MEYER, J. P., HOUIN, R. and VUITTON, D. A. (1990). Cellular immunity in experimental Echinococcus multilocularis infection. I. Sequential and comparative study of specific in vivo delayed-type hypersensitivity against E. multilocularis antigens in resistant and sensitive mice. *Clin Exp Immunol*, **82**, 373-377.
- LIANCE, M., VUITTON, D. A., GUERRET-STOCKER, S., CARBILLET, J. P., GRIMAUD, J. A. and HOUIN, R. (1984). Experimental alveolar echinococcosis. Suitability of a murine model of intrahepatic infection by Echinococcus multilocularis for immunological studies. *Experientia*, **40**, 1436-1439.
- LIGHTOWLERS, M. W. (2003). Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Trop*, **87**, 129-135.
- LIGHTOWLERS, M. W. (2006). Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology*, **133 Suppl**, S27-42.
- LIGHTOWLERS, M. W., FLISSER, A., GAUCI, C. G., HEATH, D. D., JENSEN, O. and ROLFE, R. (2000). Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitol Today*, **16**, 191-196.
- LIGHTOWLERS, M. W., GAUCI, C. G., CHOW, C., DREW, D. R., GAUCI, S. M., HEATH, D. D., JACKSON, D. C., DADLEY-MOORE, D. L. and READ, A. J. (2003). Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestode parasites. *Int J Parasitol*, **33**, 1207-1217.
- LIGHTOWLERS, M. W., JENSEN, O., FERNANDEZ, E., IRIARTE, J. A., WOOLLARD, D. J., GAUCI, C. G., JENKINS, D. J. and HEATH, D. D. (1999). Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *Int J Parasitol*, **29**, 531-534.
- LIGHTOWLERS, M. W., LAWRENCE, S. B., GAUCI, C. G., YOUNG, J., RALSTON, M. J., MAAS, D. and HEATH, D. D. (1996a). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol*, **18**, 457-462.
- LIGHTOWLERS, M. W., ROLFE, R. and GAUCI, C. G. (1996b). Taenia saginata: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Exp Parasitol*, **84**, 330-338.
- MANFREDI, M. T., CASULLI, A., LA ROSA, G., DI CERBO, A. R., TREVISIO, K., GENCHI, C. and POZIO, E. (2006). Echinococcus multilocularis in north Italy. *Parassitologia*, **48**, 43-46.
- MASTROENI, P., CHABALGOITY, J. A., DUNSTAN, S. J., MASKELL, D. J. and DOUGAN, G. (2001). Salmonella: immune responses and vaccines. *Vet J*, **161**, 132-164.

- MATSUMOTO, J., MULLER, N., HEMPHILL, A., OKU, Y., KAMIYA, M. and GOTTSTEIN, B. (2006). 14-3-3- and II/3-10-gene expression as molecular markers to address viability and growth activity of *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology*, **132**, 83-94.
- MATSUMOTO, J., YAGI, K., NONAKA, N., OKU, Y. and KAMIYA, M. (1998). Time-course of antibody response in mice against oral infection with eggs of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology*, **116** ( Pt 5), 463-469.
- MCSORLEY, S. J., COOKSON, B. T. and JENKINS, M. K. (2000). Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. *J Immunol*, **164**, 986-993.
- MCSORLEY, S. J. and JENKINS, M. K. (2000). Antibody is required for protection against virulent but not attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun*, **68**, 3344-3348.
- MERLI, M. (2001). Induktion und Charakterisierung protektiver Immunantworten gegen *Echinococcus multilocularis* Metacestoden. *Dissertation Universität Hohenheim*.
- MEYER-SIEGLER, K., MAURO, D. J., SEAL, G., WURZER, J., DERIEL, J. K. and SIROVER, M. A. (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8460-8464.
- MOREIN, B., LÖVGREN-BENGTSSON, K. and COX, J. (1996). Modern adjuvants. Functional Aspects. In Kaufmann, S.H.E. (Eds.): *Concepts in vaccine development*. de Gruyter, Berlin, New York, 243-263.
- MOSMANN, T. R. and COFFMAN, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, **7**, 145-173.
- MÜLLER-SCHOLLENBERGER, V. (1995). Studien zu einer rekombinanten Vakzine gegen *Echinococcus multilocularis* im Mausmodell. *Dissertation Universität Hohenheim*.
- MULLER-SCHOLLENBERGER, V., BEYER, W., SCHNITZLER, P., MERCKELBACH, A., ROTH, S., KALINNA, B. H. and LUCIUS, R. (2001). Immunisation with *Salmonella typhimurium*-delivered glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protects mice against challenge infection with *Echinococcus multilocularis* eggs. *Int J Parasitol*, **31**, 1441-1449.
- NAKAGAWA, T., HIRANO, Y., INOMATA, A., YOKOTA, S., MIYACHI, K., KANEDA, M., UMEDA, M., FURUKAWA, K., OMATA, S. and HORIGOME, T. (2003). Participation of a fusogenic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in nuclear membrane assembly. *J Biol Chem*, **278**, 20395-20404.
- NAKAO, M., MCMANUS, D. P., SCHANTZ, P. M., CRAIG, P. S. and ITO, A. (2007). A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, **134**, 713-722.

- NAKAO, M., XIAO, N., OKAMOTO, M., YANAGIDA, T., SAKO, Y. and ITO, A. (2009). Geographic pattern of genetic variation in the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Int*.
- NAKAYA, K., NAKAO, M. and ITO, A. (1997). *Echinococcus multilocularis*: mouse strain difference in hydatid development. *J Helminthol*, **71**, 53-56.
- NAUNDORF, S., SCHRODER, M., HOFLICH, C., SUMAN, N., VOLK, H. D. and GRUTZ, G. (2009). IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. *Eur J Immunol*, **39**, 1066-1077.
- OHNISHI, K. and KUTSUMI, H. (1995). Possible formation of new brood capsule by the previously formed brood capsule in *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **26**, 319-321.
- ORTLEPP, J. R. (1937). South African Helminths. - Part I. *The Onderstepoort journal of veterinary science and animal industry*, **9**, 311-336.
- OSBORN, P. J. and HEATH, D. D. (1982). Immunisation of lambs against *Echinococcus granulosus* using antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro. *Res Vet Sci*, **33**, 132-133.
- OVERBERGH, L., GIULIETTI, A., VALCKX, D., DECALLONNE, R., BOUILLON, R. and MATHIEU, C. (2003). The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech*, **14**, 33-43.
- PACHECO, L. G., ZUCCONI, E., MATI, V. L., GARCIA, R. M., MIYOSHI, A., OLIVEIRA, S. C., DE MELO, A. L. and AZEVEDO, V. (2005). Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. *Acta Trop*, **95**, 132-142.
- PATER, C., MULLER, V., HARRAGA, S., LIANCE, M., GODOT, V., CARBILLET, J. P., MEILLET, D., ROMIG, T. and VUITTON, D. A. (1998). Intestinal and systemic humoral immunological events in the susceptible Balb/C mouse strain after oral administration of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasite Immunol*, **20**, 623-629.
- PETAVY, A. F., HORMAECHE, C., LAHMAR, S., OUHELLI, H., CHABALGOITY, A., MARCHAL, T., AZZOUZ, S., SCHREIBER, F., ALVITE, G., SARCIRON, M. E., MASKELL, D., ESTEVES, A. and BOSQUET, G. (2008). An Oral Recombinant Vaccine in Dogs against *Echinococcus granulosus*, the Causative Agent of Human Hydatid Disease: A Pilot Study. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**, e125.
- PETAVY, A. F., TENORA, F. and DEBLOCK, S. (2003). Co-occurrence of metacestodes of *Echinococcus multilocularis* and *Taenia taeniaeformis* (Cestoda) in *Arvicola terrestris* (Rodentia) in France. *Folia Parasitol (Praha)*, **50**, 157-158.
- PLAYFORD, M. C. and KAMIYA, M. (1992). Immune response to *Echinococcus multilocularis* infection in the mouse model: a review. *Jpn J Vet Res*, **40**, 113-130.

- QU, D., YU, H., WANG, S., CAI, W. and DU, A. (2009). Induction of protective immunity by multiantigenic DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vet Parasitol*.
- RAJASEKARIAH, G. R., RICKARD, M. D., MITCHELL, G. F. and ANDERS, R. F. (1982). Immunization of mice against *Taenia taeniaeformis* using solubilized oncospherical antigens. *Int J Parasitol*, **12**, 111-116.
- RAJPUT, Z. I., HU, S. H., XIAO, C. W. and ARIJO, A. G. (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B*, **8**, 153-161.
- RAU, M. E. and TANNER, C. E. (1975). BCG suppresses growth and metastasis of hydatid infections. *Nature*, **256**, 318-319.
- RAUSCH, R. L. and FAY, F. H. (2002). Epidemiology of alveolar echinococcosis, with reference to St. Lawrence Island, Bering Sea., In P. Craig and Z. Pawlowski (ed.), *Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands., pp. 309–325.
- REUBEN, J. M. and TANNER, C. E. (1983). Protection against experimental echinococcosis by non-specifically stimulated peritoneal cells. *Parasite Immunol*, **5**, 61-66.
- RICKARD, M. D. and BELL, K. J. (1971). Successful vaccination of lambs against infection with *Taenia ovis* using antigens produced during in vitro cultivation of the larval stages. *Res Vet Sci*, **12**, 401-402.
- ROGAN, M. T. (1998). T-cell activity associated with secondary infections and implanted cysts of *Echinococcus granulosus* in BALB/c mice. *Parasite Immunol*, **20**, 527-533.
- ROGAN, M. T. and CRAIG, P. S. (1997). Immunology of *Echinococcus granulosus* infections. *Acta Trop*, **67**, 7-17.
- ROMIG, T. (2003). Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg*, **388**, 209-217.
- ROMIG, T. (2009). *Echinococcus multilocularis* in Europe - state of the art. *Vet Res Commun*.
- ROMIG, T. and BILGER, B. (1999). Animal models for echinococcosis. in Zak, O. und Sande, M (Eds). *Handbook of Animal Models infections*. Academic Press, London., 877-884.
- ROMIG, T., DINKEL, A. and MACKENSTEDT, U. (2006). The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int*, **55 Suppl**, S187-191.
- ROMIG, T., KRATZER, W., KIMMIG, P., FROSCH, M., GAUS, W., FLEGEL, W. A., GOTTSTEIN, B., LUCIUS, R., BECKH, K. and KERN, P. (1999). An epidemiologic survey of human alveolar echinococcosis in southwestern Germany. Romerstein Study Group. *Am J Trop Med Hyg*, **61**, 566-573.

- SAARMA, U., JOGISALU, I., MOKS, E., VARCASIA, A., LAVIKAINEN, A., OKSANEN, A., SIMSEK, S., ANDRESIUUK, V., DENEGRİ, G., GONZALEZ, L. M., FERRER, E., GARATE, T., RINALDI, L. and MARAVILLA, P. (2009). A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology*, **136**, 317-328.
- SADOFF, J. C., BALLOU, W. R., BARON, L. S., MAJARIAN, W. R., BREY, R. N., HOCKMEYER, W. T., YOUNG, J. F., CRYZ, S. J., OU, J., LOWELL, G. H. and ET AL. (1988). Oral *Salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. *Science*, **240**, 336-338.
- SAEED, I., KAPEL, C., SAIDA, L. A., WILLINGHAM, L. and NANSEN, P. (2000). Epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Arbil province, northern Iraq, 1990-1998. *J Helminthol*, **74**, 83-88.
- SAEED, I., MADDOX-HYTEL, C., MONRAD, J. and KAPEL, C. M. (2006). Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Vet Parasitol*, **139**, 168-179.
- SAKAGUCHI, M. (1997). Eukaryotic protein secretion. *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 595-601.
- SARCIRON, M. E., DELABRE, I., WALBAUM, S., RAYNAUD, G. and PETAVY, A. F. (1992). Effects of multiple doses of isoprinosine on *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob Agents Chemother*, **36**, 191-194.
- SATO, Y., NAKAO, M., NAKAYA, K. and ITO, A. (1998). Experimental infection of larval *Echinococcus multilocularis* in the rodent brain as a model for cerebral alveolar echinococcosis. *J Helminthol*, **72**, 59-64.
- SCHELLING, U., FRANK, W., WILL, R., ROMIG, T. and LUCIUS, R. (1997). Chemotherapy with praziquantel has the potential to reduce the prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild foxes (*Vulpes vulpes*). *Ann Trop Med Parasitol*, **91**, 179-186.
- SCHWEIGER, A., AMMANN, R. W., CANDINAS, D., CLAVIEN, P. A., ECKERT, J., GOTTSTEIN, B., HALKIC, N., MUELLHAUPT, B., PRINZ, B. M., REICHEN, J., TARR, P. E., TORGERSON, P. R. and DEPLAZES, P. (2007). Human alveolar echinococcosis after fox population increase, Switzerland. *Emerg Infect Dis*, **13**, 878-882.
- SILES-LUCAS, M., FELLEISEN, R. S., HEMPHILL, A., WILSON, W. and GOTTSTEIN, B. (1998). Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol*, **91**, 281-293.
- SILES-LUCAS, M. and GOTTSTEIN, B. (2003). The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends Parasitol*, **19**, 575-581.
- SILES-LUCAS, M., MERLI, M. and GOTTSTEIN, B. (2008). 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens. *Exp Parasitol*, **119**, 516-523.

- SILES-LUCAS, M., MERLI, M., MACKENSTEDT, U. and GOTTSTEIN, B. (2003). The Echinococcus multilocularis 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine*, **21**, 431-439.
- SINGH, R. and GREEN, M. R. (1993). Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science*, **259**, 365-368.
- SIRACUSANO, A., RIGANO, R., ORTONA, E., PROFUMO, E., MARGUTTI, P., BUTTARI, B., DELUNARDO, F. and TEGGI, A. (2008). Immunomodulatory mechanisms during Echinococcus granulosus infection. *Exp Parasitol*, **119**, 483-489.
- SIRARD, J. C., NIEDERLANG, F. and KRAEHNBUHL, J. P. (1999). Live attenuated Salmonella: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev*, **171**, 5-26.
- STEHR-GREEN, J. K., STEHR-GREEN, P. A., SCHANTZ, P. M., WILSON, J. F. and LANIER, A. (1988). Risk factors for infection with Echinococcus multilocularis in Alaska. *Am J Trop Med Hyg*, **38**, 380-385.
- STOCKER U. and M, S. (2006). Echinokokkose, Infektionsgefährdung durch Fuchsbandwurm Echinococcus multilocularis. Bayerisches Landesamt für Arbeitsschutz, Arbeitsmedizin und Sicherheitstechnik, [www.lfas.bayern.de](http://www.lfas.bayern.de).
- STURM, D., MENZEL, J., GOTTSTEIN, B. and KERN, P. (1995). Interleukin-5 is the predominant cytokine produced by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis. *Infect Immun*, **63**, 1688-1697.
- SWIRSKI, F. K., NAHRENDORF, M., ETZRODT, M., WILDGRUBER, M., CORTEZ-RETAMOZO, V., PANIZZI, P., FIGUEIREDO, J. L., KOHLER, R. H., CHUDNOVSKIY, A., WATERMAN, P., AIKAWA, E., MEMPEL, T. R., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. and PITTEP, M. J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, **325**, 612-616.
- TAPPE, D., STICH, A. and FROSCH, M. (2008). Emergence of polycystic neotropical echinococcosis. *Emerg Infect Dis*, **14**, 292-297.
- TARTZ, S., RUSSMANN, H., KAMANOVA, J., SEBO, P., STURM, A., HEUSSLER, V., FLEISCHER, B. and JACOBS, T. (2008). Complete protection against P. berghei malaria upon heterologous prime/boost immunization against circumsporozoite protein employing Salmonella type III secretion system and Bordetella adenylate cyclase toxoid. *Vaccine*, **26**, 5935-5943.
- TERRAZAS, L. I., BOJALIL, R., GOVEZENSKY, T. and LARRALDE, C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (Taenia crassiceps). *J Parasitol*, **84**, 74-81.
- THOMPSON, R. C. (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. *Experimental Parasitology*, **119**, 439-446.

- THOMPSON, R. C. and MCMANUS, D. P. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*, **18**, 452-457.
- TIAOYING, L., JIAMIN, Q., WEN, Y., CRAIG, P. S., XINGWANG, C., NING, X., ITO, A., GIRAUDOUX, P., WULAMU, M. and SCHANTZ, P. M. (2005). Echinococcosis in Tibetan populations, western Sichuan Province, China. *Emerg Infect Dis*, **11**, 1866-1873.
- TRAUB, K. (2004). Charakterisierung zellulärer und humoraler Immunmechanismen bei primärer und sekundärer alveolärer Echinokokkose. *Diplomarbeit Universität Hohenheim*.
- TZSCHASCHEL, B. D., GUZMAN, C. A., TIMMIS, K. N. and DE LORENZO, V. (1996). An *Escherichia coli* hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: export of Shiga-like toxin IIeB subunit by *Salmonella typhimurium aroA*. *Nat Biotechnol*, **14**, 765-769.
- VEIT, P. (1995). Experimentelle Studien zum Einfluß von Wirts-Immunreaktionen auf Metacestoden von *Echinococcus multilocularis*. *Dissertation Universität Hohenheim*.
- VEIT, P., BILGER, B., SCHAD, V., SCHAFFER, J., FRANK, W. and LUCIUS, R. (1995). Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology*, **110** (Pt 1), 79-86.
- VUITTON, D. A. (2003). The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? *Acta Trop*, **85**, 119-132.
- WAHL, S. M., WEN, J. and MOUTSOPOULOS, N. (2006). TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev*, **213**, 213-227.
- WALKER, M., BAZ, A., DEMATTEIS, S., STETTLER, M., GOTTSTEIN, B., SCHALLER, J. and HEMPHILL, A. (2004). Isolation and characterization of a secretory component of *Echinococcus multilocularis* metacestodes potentially involved in modulating the host-parasite interface. *Infect Immun*, **72**, 527-536.
- WANDERSMAN, C. and DELEPELAIRE, P. (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4776-4780.
- WELCH, R. A., DELLINGER, E. P., MINSHEW, B. and FALKOW, S. (1981). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature*, **294**, 665-667.
- WELLINGHAUSEN, N., GEBERT, P. and KERN, P. (1999). Interleukin (IL)-4, IL-10 and IL-12 profile in serum of patients with alveolar echinococcosis. *Acta Trop*, **73**, 165-174.
- WHITESIDE, T. L. (2002). Cytokine assays. *Biotechniques*, **Suppl**, 4-8, 10, 12-15.
- WOOLLARD, D. J., GAUCI, C. G., HEATH, D. D. and LIGHTOWLERS, M. W. (1998). Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. *Parasite Immunol*, **20**, 535-540.



XIAO, N., QIU, J., NAKAO, M., LI, T., YANG, W., CHEN, X., SCHANTZ, P. M., CRAIG, P. S. and ITO, A. (2006). *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: discovery and epidemiological implications. *Parasitol Int*, **55 Suppl**, S233-236.

YANG, Y. R., ELLIS, M., SUN, T., LI, Z., LIU, X., VUITTON, D. A., BARTHOLOMOT, B., GIRAUDOUX, P., CRAIG, P. S., BOUFANA, B., WANG, Y., FENG, X., WEN, H., ITO, A. and MCMANUS, D. P. (2006). Unique family clustering of human echinococcosis cases in a chinese community. *Am J Trop Med Hyg*, **74**, 487-494.

YRLID, U., SVENSSON, M., JOHANSSON, C. and WICK, M. J. (2000). Salmonella infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **27**, 313-320.

ZGURSKAYA, H. I. and NIKAIDO, H. (2000). Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **182**, 4264-4267.

ZHANG, S., HUE, S., SENE, D., PENFORNIS, A., BRESSON-HADNI, S., KANTELIP, B., CAILLAT-ZUCMAN, S. and VUITTON, D. A. (2008). Expression of major histocompatibility complex class I chain-related molecule A, NKG2D, and transforming growth factor-beta in the liver of humans with alveolar echinococcosis: new actors in the tolerance to parasites? *J Infect Dis*, **197**, 1341-1349.