

## *Die Bedeutung von Interleukin-4 für den Verlauf einer Infektion mit der Filarie *Litomosoides sigmodontis* in Labormäusen*

Karin Haisch<sup>1</sup>, H. Schulz-Key<sup>1</sup>, M. Kopf<sup>2</sup>, W. H. Hoffmann<sup>1</sup>

### **Einleitung**

Bei vielen Parasitosen wird die Immunantwort durch mindestens zwei verschiedene Subpopulationen von T-Helferzellen kontrolliert (20), die durch die Produktion antagonistisch wirkender Zytokine charakterisiert sind (TH1/TH2-Paradigma) (16). Nematodeninfektionen induzieren eine TH2-dominierte Immunantwort, die bei Darmnematoden zu einer Abstoßung des Parasiten und zum Schutz des Wirtes vor Neuinfektionen führt (6). Interleukin-4 (IL-4) ist das Schlüsselzytokin der TH2-Antwort. Es induziert in murinen B-Zellen eine Differenzierung zu IgG1- und IgE-produzierenden Plasmazellen. Außerdem steigert es in TH2-Zellen die Sekretion von Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10). IL-5 induziert eine Vermehrung der eosinophilen Granulozyten, während IL-10 zusammen mit IL-4 die Ausprägung einer TH1-Antwort hemmt.

Da auch bei Humanfilariosen die klassischen Merkmale einer TH2-Immunantwort wie hohe IgE-Titer und drastisch erhöhte Eosinophilie auftreten, sollte der Einfluß des TH2-Schlüsselzytokins IL-4 auf den Verlauf einer experimentellen Filarieninfektion untersucht werden. Filarien sind allerdings streng wirtsspezifisch; deshalb können sich humanpathogene Arten nicht in Kleinsäugetern entwickeln. Die Infektion von Labormäusen mit der Baumwollrattenfilarie *Litomosoides sigmodontis* stellt daher ein bisher einzigartiges Filariosemodell dar (14). Dieser Parasit durchläuft eine vollständige Entwicklung in immunkompetenten BALB/c-Mäusen, für die ein großes Spektrum an immunologischen Reagenzien erhältlich ist. Die in unseren Versuchen verwendeten Mäuse wiesen eine gezielte Mutation des IL-4-Gens auf, die eine vererbte IL-4-Defizienz verursacht. Um den immunmodulatorischen Einfluß der verschiedenen Parasitenstadien unabhängig voneinander unterscheiden zu können, wurden den Mäusen entweder dritte Larven inokuliert oder Mikrofilarien intravenös injiziert.

### **Material und Methoden**

#### Versuchstiere

Es wurden Mäuse mit BALB/c-Hintergrund verwendet, bei denen durch eine gezielte Mutation des IL-4-Gens eine genetisch fixierte IL-4-Defizienz erreicht worden war (9). Zum Vergleich wurden Mäuse des Wildtypstammes mit sonst identischem genetischen Hintergrund herangezogen.

Gewinnung infektiöser dritter Larven (L3) und Infektion der Versuchstiere	Der <i>L. sigmodontis</i> -Zyklus wurde in Baumwollratten ( <i>Sigmodon hispidus</i> ) und Wüstenrennmäusen ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) gehalten. Die Infestation der Überträgermilben ( <i>Ornithonyssus bacoti</i> ) und die Gewinnung von dritten Larven erfolgte nach Standardprotokollen (17). Zehn IL-4-defizienten und zehn Wildtypmäusen wurden je 30 dritte Larven subkutan inokuliert. Bei fünf Kontrolltieren aus jedem Stamm wurden Scheininfektionen durch Injektion von RPMI 1640-Medium gesetzt. Die Obduktion aller Tiere wurde 81 Tage p. i. durchgeführt.
Isolierung und Injektion der Mikrofilarien (Mf)	Mit <i>L. sigmodontis</i> infizierte Wüstenrennmäuse mit hoher Parasitämie dienten als Spendertiere zur Gewinnung von Mikrofilarien. Mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden die Mikrofilarien aus dem Blut isoliert und in RPMI 1640 suspendiert (3). Sechs IL-4-defiziente Mäuse und sechs Wildtypmäuse erhielten Injektionen von jeweils 120.000 Mikrofilarien in die Vena jugularis. Fünf Kontrolltieren jeden Stammes wurden gleiche Volumina RPMI 1640 i. v. injiziert. Alle Tiere wurden 41 Tage p. i. obduziert.
Blutabnahme und Serumgewinnung	Die Blutabnahme erfolgte am retroorbitalen Venenplexus (23) mit einer heparinisierten 10 µl Glaskapillare in heparinisierte Reaktionsgefäße. Alle zwei Wochen wurde alternierend bei der Hälfte der Mäuse noch zusätzlich ca. 200 µl Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Die Seren wurden in Aliquots von 10 µl bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.
Bestimmung von Eosinophilie und Mikrofilariendichte	Heparinisiertes Blut (5 µl pro Tier) wurde mit Pilots Lösung 1:10 verdünnt und 5 Min. inkubiert. Anschließend wurden eosinophile Granulozyten und Mikrofilarien mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt. Für die Bestimmung der lokalen Eosinophilie wurde bei der Obduktion jedem Tier 3 µl Pleuraflüssigkeit entnommen und die eosinophilen Granulozyten wie beschrieben ausgezählt.
Bestimmung von filarienspezifischen IgG-Subklassen im Serum	Die filarienspezifischen IgG-Subklassen wurde im ELISA bestimmt (modifiziert nach 24). Dabei wurde als Antigen ein PBS-löslicher Extrakt aus homogenisierten <i>L. sigmodontis</i> -Adultwürmern eingesetzt. Die Antigenlösung wurde mit Carbonatpuffer (pH 9,6) auf 10 µg/ml verdünnt, in 96-Loch-Mikrotiterplatten einpipettiert und 4h inkubiert. Danach wurden die Mausseren 1:500 mit PBS/0,05% Tween 20 verdünnt, die Platten damit beschickt und 2h inkubiert. Zur Detektion wurden peroxidasegekoppelte Antikörper gegen murines IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 (Serotec) 2000-fach mit PBS/0,05% Tween 20 verdünnt und 2h auf den Platten inkubiert. Als Substrat wurde 1,2-Phenylendiamin-dihydrochlorid in Zitratpuffer (1,5 mg/ml) mit 0,04% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> verwendet. Zwischen allen Pipettierschritten wurde dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Sämtliche Inkubationen fanden bei 37°C statt. Die Substratumsetzung wurde photometrisch bei 450 nm bestimmt. Dazu wurde eine kinetische Messung durchgeführt und die Steigungen der Enzymreaktionen – angegeben als ELISA-Einheiten (EE) – aus dem linearen Abschnitt der Kurve berechnet.
Bestimmung des Gesamt-IgE im Serum	Das Gesamt-IgE wurde mittels Sandwich-ELISA mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen Maus-IgE bestimmt. Die Seren der Versuchstiere wurden 1:5 verdünnt. Ein Mausserum mit definiertem IgE-Gehalt (Fa. ICN, Meckenheim) diente als Referenzstandard. Die Enzymreaktion wurde – wie oben beschrieben – kinetisch gemessen. Der IgE-Gehalt wurde anhand des Referenzstandards in µg/ml berechnet.
Bestimmung der Zytokine IFN-γ und IL-5	Nach der Obduktion der Versuchstiere wurden Suspensionen von Milzzellen hergestellt (2 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml) und <i>in vitro</i> mit dem Mitogen Conavalin A (Con A) oder <i>L. sigmodontis</i> -Antigen stimuliert. Überstände aus diesen Zellkulturen wurden nach 48h entnommen und mittels Sandwich-ELISA nach Standardprotokoll des Herstellers (Pharmingen) auf ihren Gehalt an IFN-γ und IL-5 überprüft. Die photometrische Bestimmung der Zytokine wurde in gleicher Weise wie bei den Serum-Antikörpern durchgeführt.

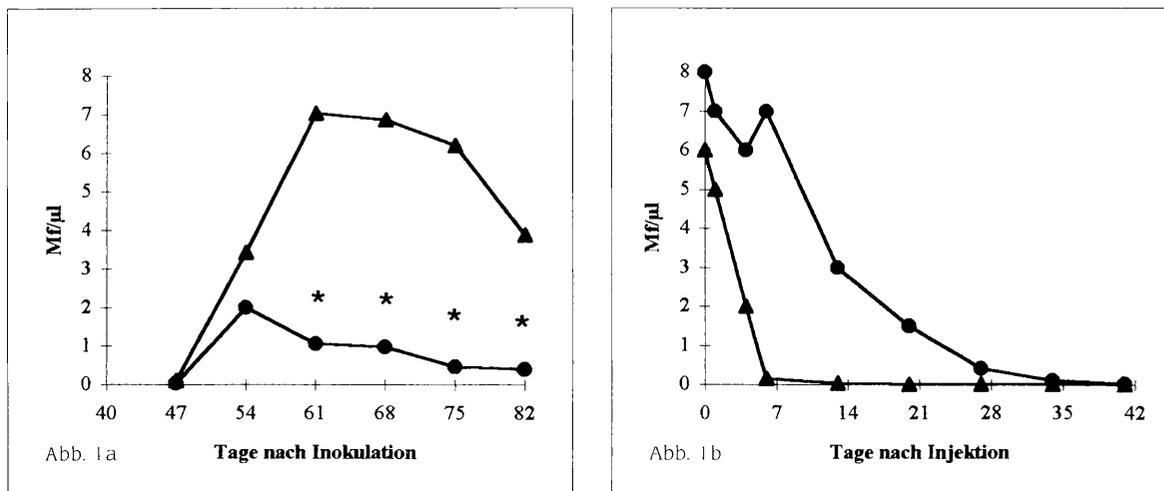


Abbildung 1:

Mikrofilarämie von IL-4-defizienten Mäusen (▲) und Wildtypmäusen (●).

Abb. 1a: Nach Inokulation von 30 L3 (geometrisches Mittel, gM)

Abb. 1b: Nach Injektion von 120.000 Mf (arithmetisches Mittel, aM)

★ = signifikanter Unterschied, Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$

## Ergebnisse

### Mikrofilaridichten

In Tieren beider Mausstämmen konnten sieben Wochen nach Inokulation der 30 L3 erstmalig Mikrofilarien nachgewiesen werden (Abb. 1a). In vier IL-4-defizienten und zwei Wildtypmäusen wurden während des gesamten Versuches niemals Mikrofilarien im peripheren Blut gefunden. Zwei Tiere des Wildtypstammes starben wenige Wochen nach Versuchsbeginn aus unbekanntem Gründen. Die Mikrofilarämie der Wildtypmäuse erreichte ihr Maximum am Tag 54 mit durchschnittlich 2 Mf/µl Blut und fiel danach bis zum Versuchsende auf 0,4 Mf/µl ab. Das Maximum in den IL-4-defizienten Mäusen wurde am Tag 61 mit durchschnittlich 7 Mf/µl Blut erreicht und war am Obduktionstag bis auf 4 Mf/µl abgefallen. Ab Tag 61 unterschieden sich die Mikrofilaridichten in beiden Mausstämmen signifikant.

Nach Injektion von Mikrofilarien kam es zu einer transienten Parasitämie. Die Zahl der Mikrofilarien verringerte sich in den IL-4-defizienten Mäusen schneller als in den Wildtypmäusen (Abb. 1b). Am Tag 20 p. i. war das Blut aller IL-4-defizienten Mäuse mikrofilarienfrei, während zu diesem Zeitpunkt fünf von sechs Wildtypmäusen noch zirkulierende Mikrofilarien enthielten. Die Zirkulationsdauer der injizierten Mikrofilarien war in den IL-4-defizienten Mäusen signifikant kürzer.

### Konzentration IL-4-unabhängiger IgG-Subklassen

Nach Inokulation von dritten Larven stiegen bei den IL-4-defizienten Mäusen die parasiten-spezifischen Immunglobuline der Subklassen IgG2a, IgG2b und IgG3 im Serum stark an, während sie bei den Wildtypmäusen nur leicht zunahmten (Abb. 2a). Der Anstieg verlief in zwei Phasen, die mit der Larvalentwicklung bzw. dem Beginn der Patenz zeitlich korrelierten. Im Gegensatz dazu stiegen nach Injektion von Mikrofilarien parasitenspezifisches IgG2a, IgG2b und IgG3 vor allem bei den Wildtypmäusen an, während sie bei den IL-4-defizienten Mäusen erst vier Wochen p. i. leicht zunahmten (Abb. 2b).

### Gesamt-IgE

Nach Inokulation von L3 stieg bei den Wildtypmäusen der Gehalt an Gesamt-IgE kontinuierlich an und unterschied sich ab drei Wochen p. i. signifikant von den Werten nichtinfizierter Kontrollen (Abb. 3a). Bei den IL-4-defizienten Mäusen war überhaupt kein IgE nachweisbar.

Nach Injektion von Mikrofilarien hingegen kam es auch bei Wildtypmäusen nicht zu einer signifikanten Zunahme an IgE verglichen mit den nichtinfizierten Kontrolltieren (Abb. 3b).

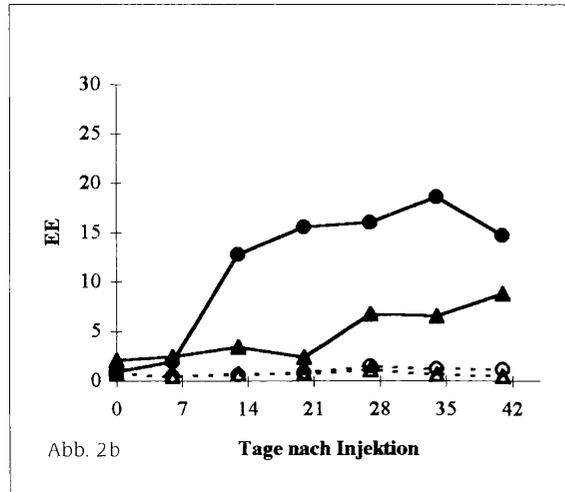
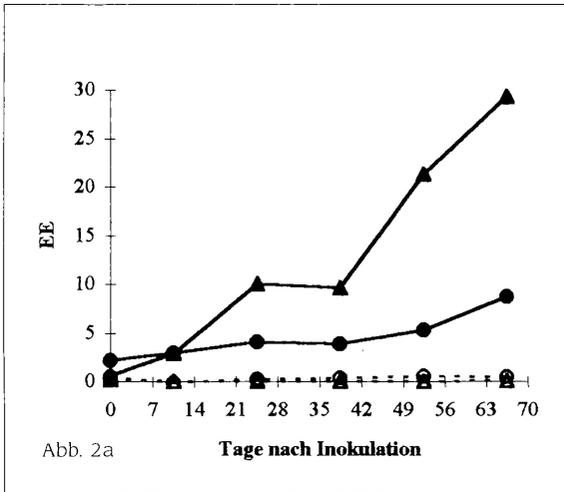


Abbildung 2:

Summenkurven (aE) der filarienspezifischen IgG-Subklassen IgG2a, IgG2b und IgG3.

Abb. 2a: Nach Inokulation von 30 L3

Abb. 2b: Nach Injektion von 120.000 Mikrofilarien im Serum von IL-4-defizienten Mäusen (▲) und Wildtypmäusen (●).

—○— = infizierte Tiere

- - - □ - - - = nichtinfizierte Kontrolltiere

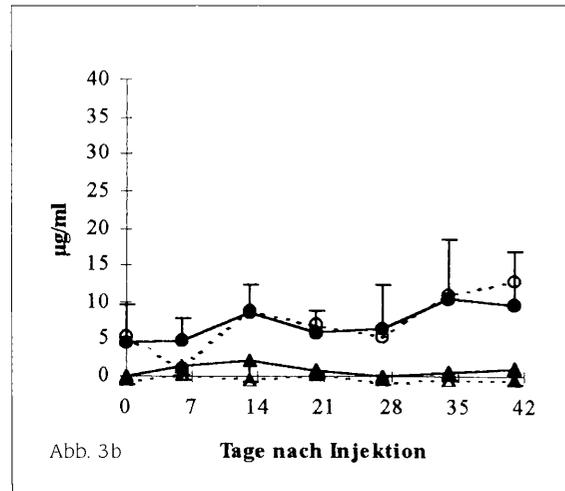
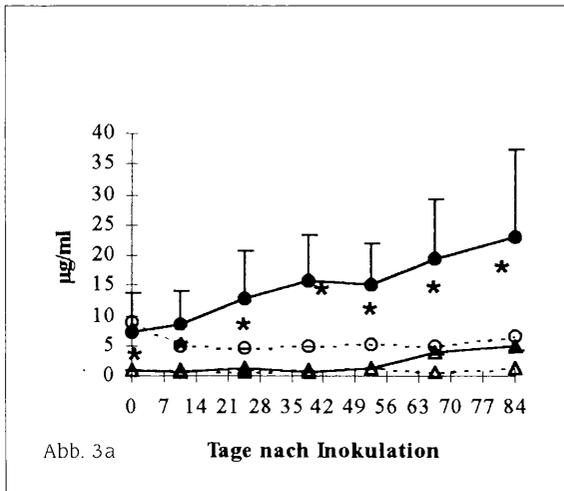


Abbildung 3:

Gesamt-IgE (aE) im Serum von IL-4-defizienten Mäusen (▲) und Wildtypmäusen (●).

Abb. 3a: Nach Inokulation von 30 L3

Abb. 3b: Nach Injektion von 120.000 Mikrofilarien

☆ = signifikanter Unterschied, Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$

Tabelle 1:

Lokale Eosinophilie in der Pleurahöhle von Wildtypmäusen (IL-4 +/+) und IL-4-defizienten Mäusen (IL-4 -/-) nach Inokulation von L3.  
n. i. = nichtinfizierte Kontrolltiere. Es sind die Mediane der Einzelwerte angegeben.

\* =  $p < 0,05$  IL-4 +/+ versus IL-4 -/-.

	eosinophile Granulozyten/ $\mu$ l
IL-4 +/+	25125*
IL-4 +/+ n. i.	419
IL-4 -/-	3163
IL-4 -/- n. i.	988

Tabelle 2:

IFN- $\gamma$ -Produktion (aM) von Milzzellen nach in vitro-Stimulation mit *L. sigmodontis*-Antigen bei mit L3 infizierten Wildtypmäusen (IL-4 +/+) und IL-4-defizienten Mäusen (IL-4 -/-).

n. i. = nichtinfizierte Kontrolltiere

	IFN- $\gamma$ (U/ml)
IL-4 +/+	0,60
IL-4 +/+ n. i.	nicht detektierbar
IL-4 -/-	2,62
IL-4 -/- n. i.	0,27

Tabelle 3:

IFN- $\gamma$ -Produktion von Milzzellen nach in vitro-Stimulation mit *L. sigmodontis*-Antigen bei mit L3 infizierten IL-4-defizienten Mäusen. Die Konzentrationen sind in U/ml angegeben.

SD = Standardabweichung

aM = arithmetisches Mittel

\* =  $p < 0,01$  mikrofilarienneegative versus mikrofilariennepositive Mäuse.

	Mikrofilarien negativ	Mikrofilarien positiv
	6,31	0,84
	6,27	0,99
	7,26	0,15
	5,05	0,21
		nicht detektierbar
		nicht detektierbar
aM	6,22*	0,21
SD	0,91	0,68

## Lokale Eosinophilie

Die Eosinophilie in der Pleurahöhle war bei allen infizierten und mikrofilarienpositiv gewordenen Versuchstieren drastisch erhöht verglichen mit den nichtinfizierten Kontrollen (Tab. 1). Allerdings wurden in den infizierten Wildtypmäusen ca. achtmal mehr eosinophile Granulozyten gefunden als in IL-4-defizienten Tieren.

## Interferon- $\gamma$ in Überständen stimulierter Milzzellen

Milzzellen infizierter IL-4-defizienter Mäuse produzierten nach Stimulation mit *L. sigmodontis*-Antigen mehr IFN- $\gamma$  als Zellen von Wildtypmäusen (Tab. 2). Bei Betrachtung der Einzelwerte fiel auf, daß nur bei solchen IL-4-defizienten Tieren IFN- $\gamma$  nachweisbar war, die während des gesamten Versuchs nie Mikrofilarien im Blut hatten (Tab. 3).

## Interleukin-5 in Überständen stimulierter Milzzellen

Sowohl nach mitogener als auch nach antigener Stimulation produzierten Milzzellen mit L3 infizierter Wildtypmäuse ca. dreimal mehr IL-5 als Zellen aus IL-4-defizienten Tieren (Tab. 4). Nur bei unspezifischer Stimulation mit Con A konnte auch bei nichtinfizierten Kontrolltieren IL-5 nachgewiesen werden, nicht jedoch bei spezifischer Stimulation mit *L. sigmodontis*-Antigen.

## Diskussion

Unsere Untersuchungen belegen den Einfluß von Interleukin-4 auf den Verlauf einer experimentellen Filarieninfektion. In IL-4-defizienten Mäusen kam es nach Infektion mit *L. sigmodontis* zu einer deutlich höheren Parasitämie als in den Wildtyptieren, die IL-4 produzieren konnten. IL-4 beeinflusst als Schlüsselzytokin der TH2-Immunantwort die Expression weiterer Zytokine, wie z. B. IL-5, und die Zahl der eosinophilen Granulozyten. Die Produktion von IgE ist sogar essentiell abhängig von IL-4 (9).

In den Wildtypmäusen nahm im Verlauf der Infektion der IgE-Gehalt im Serum kontinuierlich zu, in der Pleurahöhle entwickelte sich eine massive Eosinophilie und nach *in vitro*-Stimulation wurde vermehrt IL-5 produziert. Offensichtlich reagierten die Wildtypmäuse auf die Filarieninfektion mit einer ausgeprägten Immunantwort vom Typ TH2. Wahrscheinlich führten die dadurch induzierten Effektormechanismen zu der beobachteten niedrigeren Parasitämie.

Im Gegensatz dazu dominierten in den IL-4-defizienten Mäusen die IgG-Subklassen 2a, 2b und 3, die von IFN- $\gamma$ , dem Schlüsselzytokin der TH1-Antwort, teilweise induziert und von IL-4 sogar inhibiert werden (5). Trotz der Präsenz dieser filarienspezifischen Immunglobuline konnte in den IL-4-defizienten Mäusen die Parasitendichte schlechter reguliert werden als im Wildtyp-Stamm. Möglicherweise vermitteln diese IgG-Subklassen die Adhäsion von Effektorzellen schlechter als IgE.

In der Pleurahöhle infizierter Wildtypmäuse waren deutlich mehr eosinophile Granulozyten vorhanden als in den IL-4-defizienten Mäusen. Die Pleurahöhle ist das Habitat der adulten Filarien, aus der die freigesetzten Mikrofilarien über das Diaphragma und die Cisterna chyli in die Blutzirkulation gelangen (26). Eine lokale TH2-Antwort im Habitat der Adultwür-

Tabelle 4:

IL-5-Produktion (aM) von Milzzellen nach in vitro-Stimulation mit Con A und *L. sigmodontis*-Antigen bei mit L3 infizierten Wildtypmäusen (IL-4+/+) und IL-4-defizienten Mäusen (IL-4-/-). n. i. = nichtinfizierte Kontrolltiere. Die Konzentrationen sind in ng/ml angegeben.  
\* = p < 0,05 IL-4+/+ versus IL-4-/-

	Stimulation mit	
	Con A	<i>L. sigmodontis</i> -Antigen
IL-4+0+	0,92*	0,74*
IL-4+/+ n. i.	0,21	nicht detektierbar
IL-4-/-	0,29	0,26
IL-4-/- n. i.	0,25	nicht detektierbar

mer könnte soeben freigesetzte Mikrofilarien angegriffen und abgebaut haben, bevor diese überhaupt ins Blut gelangten. Dabei spielten vermutlich eosinophile Granulozyten neben Mastzellen eine maßgebliche Rolle. Jedenfalls ist bei beiden Zelltypen die Fähigkeit nachgewiesen worden, extrazelluläre Metazoen-Parasiten abzutöten (2).

IL-4 induziert eine lokale Eosinophilie durch Expression von VCAM-1 (vascular endothelium cell adhesion molecule) auf Endothelzellen und VLA-4 (very late antigen) auf eosinophilen und basophilen Granulozyten. Die Bindung dieser beiden Zelloberflächenmoleküle aneinander führt schließlich zu einer Migration der Granulozyten aus dem Blut in das umliegende Gewebe (19). Eine lokale TH2-Antwort gegen Mikrofilarien von *Brugia malayi* wurde auch von PEARLMAN et al. 1995 (18) in immunisierten Mäusen beobachtet.

Die Zahl eosinophiler Granulozyten wird auch auf indirekte Weise von IL-4 beeinflusst, indem es in TH2-Zellen eine vermehrte Sekretion von IL-5 induziert, welches nachfolgend die Differenzierung von Vorläuferzellen zu reifen Eosinophilen fördert (25). Tatsächlich wurde in unseren Versuchen eine vermehrte IL-5 Produktion nach Stimulation von Milzzellen mit Mitogen und Antigen festgestellt.

Interessanterweise war die Überlebenszeit von Mikrofilarien nach intravenöser Injektion in naive Tiere bei den IL-4-defizienten Mäusen signifikant kürzer als im Wildtypstamm. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit Mikrofilarien von *Onchocerca lienalis*, einer Rinderfilarie, nach Injektion in IL-4-defiziente (129Sv x C57BL/6) -Mäuse erzielt (7). Die Eliminierung der blutkreislaufierenden Mikrofilarien in den IL-4-defizienten Mäusen verlief in unseren Versuchen so schnell, daß sie nicht durch Antikörper vermittelt sein konnte. Bei diesen Tieren kam es auch später nicht zu einer ausgeprägten humoralen Immunantwort.

Abtötungsmechanismen, die antikörperunabhängig verlaufen, sind bei vielen Parasitosen beschrieben worden. Der alternative Weg der Komplementaktivierung (8) oder Akute-Phase-Reaktionen (22) könnten dafür in Frage kommen. Außerdem werden in aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten chemisch hochreaktive Stickstoff- und Sauerstoffradikale gebildet, die intra- oder extrazellulär lebende Parasiten abtöten können (12). Dieser Prozeß wird durch das Schlüsselzytokin IFN- $\gamma$  induziert und ist somit der TH1-Immunantwort zuzurechnen. LAWRENCE et al. 1994 (10) hatten gezeigt, daß Mikrofilarien nach Injektion in normale BALB/c Mäuse TH1-Antworten auslösen. Da in IL-4-defizienten Mäusen schon vor Versuchsbeginn von einer TH1-Dominanz auszugehen ist, könnte das rasche Verschwinden der Mikrofilarien nach intravenöser Injektion mit einer frühen Produktion derartiger toxischer Substanzen erklärt werden. Auch in den Wildtypmäusen führte die Injektion von Mikrofilarien zu einer TH1-Immunantwort, die jedoch in ihrer Dynamik schwächer verlief und später einsetzte. Zumindest traten zwei Wochen p. i. TH1-typische Immunglobuline auf, während TH2-assoziiertes IgE kaum zunahm. Möglicherweise wird IgE nur nach lang anhaltendem Antigenstimulus gebildet.

LAWRENCE et al. 1995 (11) fanden in ähnlichen Experimenten mit der Filarie *Brugia malayi* keine signifikante Änderung des Parasitoseverlaufes, wenn in den verwendeten Mäusen eine IL-4-Defizienz vorhanden war. Allerdings konnten sie nur adulte Würmer implantieren oder Mikrofilarien injizieren, da bei ihrem Modell keine Entwicklung dritter Larven stattfand. Außerdem verwendeten sie einen Mausstamm mit anderem genetischen Hintergrund.

Im Verlauf einer natürlichen Filarieninfektion dominiert offensichtlich eine TH2-Immunantwort. Jedenfalls ist dieser Reaktionstyp bei vielen Humanfilariosen beschrieben worden (13). Unklar blieb jedoch, ob die dadurch hervorgerufenen Effekte für den Wirt protektiv oder eher schädlich sind. Einerseits sind pathologische Manifestationen von Humanfilariosen deut-

lich mit starken TH2-Antworten korreliert. Andererseits konnten bei Tierfilariosen auch schutzvermittelnde TH2-Immunantworten induziert werden. So zeigten BALB/c Mäuse, die mit strahlungsattenuierten dritten Larven von *B. pahangi* immunisiert waren, einen signifikanten TH2-vermittelten Immunschutz gegen eine nachfolgende Belastungsinfektion (1).

Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen bei bestimmten Individuen aus Onchozerkose-Gebieten (sog. „putative immunes“), in denen der Schutz gegen *Onchocerca volvulus* mit einer starken TH1-Antwort assoziiert war (4). Auch die nach Chemotherapie beobachtete „Ivermectin-facilitated immunity“ bei Onchozerkose-Patienten war durch typische TH1-Antworten, wie hohe IFN- $\gamma$ -Spiegel, charakterisiert (21). In beiden Fällen war der parasitologische Status dieser Personen vor allem durch die Abwesenheit von Mikrofilarien gekennzeichnet, während adulte Würmer durchaus vorhanden waren.

Auch bei unseren experimentellen Filarieninfektionen gab es Tiere, in denen nach Inokulation von dritten Larven niemals Mikrofilarien im Blut nachweisbar waren. Interessanterweise konnten auch hier typische Kennzeichen einer TH1-Immunantwort festgestellt werden. So zeigten nur diejenigen Tiere eine starke IFN- $\gamma$ -Produktion, die keine patente Infektion entwickelten. Da IFN- $\gamma$  die oben erwähnten mikrofilarienabtötenden Mechanismen induziert, konnte in diesen Tieren eine TH1-Immunantwort dominiert haben, die das Erscheinen zirkulierender Mikrofilarien verhinderte.

Da bei den meisten natürlichen Infektionen jedoch Mikrofilarien nachweisbar sind, kann die mit Filariosen assoziierte TH2-Antwort nicht schutzvermittelnd sein. Möglicherweise induzieren die prämaternen und später die adulten Filarien TH2-Reaktionen, um dadurch unspezifische TH1-gekoppelte Mechanismen, wie die Produktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffmetabolite, zu verhindern. Dadurch werden vielleicht erst die Bedingungen geschaffen, die dem Parasiten eine vollständige Entwicklung im Wirt ermöglichen. Jedenfalls soll IL-4 das Stickstoffmonoxid produzierende Enzym iNOS (induzierbare NO-Synthetase) inhibieren können (6). Allerdings müßte diese Inhibierung unspezifischer TH1-Mechanismen auch unabhängig von IL-4 möglich sein, denn *L. sigmodontis* konnte sich auch in den meisten IL-4-defizienten Tieren etablieren. Ein Zytokin, das eine ähnliche Funktion wie IL-4 hat und dieses teilweise ersetzen kann, ist das IL-13 (15).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß IL-4 den Verlauf einer experimentellen Filarieninfektion mit *L. sigmodontis* wesentlich beeinflusst, indem es vermutlich lokal IgE-vermittelte Zytotoxizitätsreaktionen von eosinophilen Granulozyten und/oder Mastzellen induziert und dadurch die Mikrofilariendichte im Blut reguliert. Die Modellinfektion *L. sigmodontis* in der Labormaus – besonders auch die Verwendung zytokindefizienter Stämme – ist für die Untersuchung grundlegender Mechanismen der Immunregulation bei Filariosen hervorragend geeignet.

## Zusammenfassung

Nematodeninfektionen führen zu einer TH2-dominierten Immunantwort. Da auch bei Humanfilariosen die klassischen Merkmale einer TH2-Immunantwort wie hohe IgE-Titer und drastisch erhöhte Eosinophilie auftreten, sollte der Einfluß des TH2-Schlüsselzytokins IL-4 auf den Verlauf einer experimentellen Filarieninfektion untersucht werden. Dazu wurden Mäuse mit einer gezielten Mutation des IL-4-Gens verwendet, die eine vererbte IL-4-Defizienz verursacht. Zum Vergleich wurden Mäuse des Wildtypstammes mit sonst identischem genetischen Hintergrund herangezogen. Den Tieren wurden entweder je 30 dritte Larven von *Litomosoides sigmodontis* subkutan inokuliert oder 120.000 isolierte Mikrofilarien intravenös injiziert.

In IL-4-defizienten Mäusen war nach Inokulation von dritten Larven eine signifikant höhere und länger anhaltende Mikrofilariämie als in Wildtypmäusen zu beobachten. Nur in den Wildtypmäusen konnten im Verlauf der Infektion zunehmende Mengen an IgE und eine starke

lokale Eosinophilie im Habitat der adulten Würmer festgestellt werden. Diese typischen IL-4-abhängigen Immunantworten scheinen folglich die Dauer und Höhe der Mikrofilariämie zu regulieren.

Nach Injektion von Mikrofilarien hingegen eliminierten IL-4-defiziente Mäuse die Mikrofilarien signifikant schneller aus ihrem Blut als Wildtypmäuse. Der Mikrofilarienabbau verlief so schnell, daß er nicht durch Antikörper vermittelt sein konnte. Vermutlich wurden Makrophagen und neutrophile Granulozyten dazu aktiviert, stark reaktive Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid freizusetzen, was die Zerstörung der Mikrofilarien bewirkte. Dieser Effektormechanismus wird durch IFN- $\gamma$  induziert und der TH1-Immunantwort zugerechnet. Die IL-4-defizienten Mäuse konnten wahrscheinlich eine initial starke TH1-Antwort aufbauen, die zur raschen Eliminierung der Mikrofilarien führte. Auch nach Inokulation von dritten Larven scheint in manchen Tieren eine TH1-Antwort induziert worden zu sein. Bei solchen Tieren, die nie Mikrofilarien im Blut hatten, wurden erhöhte Konzentrationen von IFN- $\gamma$  nachgewiesen. IL-4 beeinflußt also wesentlich den Verlauf einer experimentellen Filariose.

**Schlüsselwörter** Filarien, *Litomosoides sigmodontis*, TH1/TH2-Dichotomie, IL-4-defiziente Mäuse, Zytokine.

**Summary** *Relevance of interleukin-4 for the outcome of infection with the filaria Litomosoides sigmodontis in laboratory mice*

Nematode infections are dominated by a TH2-type immune response, for which IL-4 is a key cytokine. Human filariases are characterized by TH2 type responses as well, particularly high levels of IgE and increased eosinophilia. Therefore, the relevance of IL-4 for the outcome of infection was investigated using a filariasis mouse model. *L. sigmodontis* is the only filaria known to undergo complete development in immunocompetent BALB/c mice. Mice with a targeted disruption of the IL-4 gene and the corresponding wild type mice were infected by either inoculation of third stage larvae or iv injection of microfilariae. After inoculation of third stage larvae IL-4 deficient mice exhibited a significantly higher and longer lasting microfilaremia than wild type mice. Only the wild type mice produced high levels of IgE and showed a strong local eosinophilia. Obviously IL-4 is involved in down-regulation of microfilaremia.

However, after injection of microfilariae IL-4 deficient mice cleared their microfilariae significantly faster than wildtype mice. Owing to this rapid elimination the underlying mechanism should be antibody-independent. Probably macrophages and neutrophils secreted highly reactive oxygen and/or nitrogen intermediates that caused the destruction of microfilariae. IFN- $\gamma$  is known to induce such effector mechanism. A strong innate TH1 response presumably eliminated the microfilariae in IL-4 deficient mice.

Some mice mounted a TH1 type response after inoculation of third stage larvae as well. Such animals, which never had microfilariae in their blood, secreted high levels of IFN- $\gamma$  – the key cytokine of the TH1 type response.

In the course of a patent infection, however, the premature and adult parasitic stages evoke a TH2 type response in order to protect the microfilariae from non-specific TH1-associated killing.

**Keywords** Filariae, *Litomosoides sigmodontis*, TH1/TH2-dichotomy, IL-4-deficient mice, cytokines.

**Danksagung** Unsere Arbeiten wurden vom INCO-DC-Programm (Vertrag-Nr. IC18-CT95-0026) der Kommission der Europäischen Union und dem FORTÜNE-Programm der Universität Tübingen unterstützt.

## Literatur

1. BANCROFT, A. J., GRENCIS, R. K., ELSE, K. J., DEVANEY, E. (1993):  
Cytokine production in BALB/c mice immunized with radiation attenuated third stage larvae of the filarial nematode, *Brugia pahangi*.  
*J. Imm.* 150, 1395-1402.
2. CAPRON, M., CAPRON, A. (1994):  
Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis.  
*Scienc* 264, 1876-1877.
3. CHANDRASHEKAR, R., RAO, U. R., RAJASEKARIAH, G. R., SUBRAHMANYAM, D. (1984):  
Separation of viable microfilariae free of blood cells on Percoll gradients.  
*J. Helminth.* 58, 69-70.
4. ELSON, L. H., CALVOPINA, M. H., PAREDES, W. Y., ARAUJO, E. M., BRADLEY, J. E., GUDERIAN, R. H., NUTMAN, T. B. (1995):  
Immunity to onchocerciasis: Putative immune persons produce a Th1-like response to *Onchocerca volvulus*.  
*J. Infect. Dis.* 171, 652-658.
5. FINKELMAN, F. D., KATONA, I. M., MOSMANN, T. R., COFFMAN, R. L. (1988):  
IFN- $\gamma$  regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses.  
*J. Immunol.* 140, 1022-1027.
6. FINKELMAN, F. D., GAUSE, W. C., URBAN, J. F. (1995):  
Cytokine control of protective immunity against nematode infections.  
In: Boothroyd, J. C., Komuniecki, R. (Edtrs.)  
*Molecular Approaches to Parasitology*, 467-476.  
Wiley-Liss Inc., New York.
7. HOGARTH, P. J., FOKARD, S. G., TAYLOR, M. J., BIANCO, A. E. (1995):  
Accelerated clearance of *Onchocerca microfilariae* and resistance to reinfection in interleukin-4 gene knockout mice.  
*Parasite Immunology* 17, 653-657.
8. JOINER, K. A. (1988):  
Molecular basis for interactions between parasites and the complement cascade.  
In: Englund, P. T., Sher, A. (Edtrs.)  
*The Biology of Parasitism*, 309-328.  
Wiley-Liss Inc., New York.
9. KOPF, M., LE GROS, G., BACHMANN, M., LAMERS, M. C., BLUETHMANN, H. (1993):  
Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses.  
*Nature* 362, 245-248.
10. LAWRENCE, R. A., ALLEN, J. E., OSBORNE, J., MAIZELS, R. M. (1994):  
Adult and microfilarial stages of the filarial parasite *Brugia malayi* Stimulate contrasting cytokine and Ig isotype responses in BALB/c mice.  
*J. Immunol.* 153(3), 1216-1224.
11. LAWRENCE, R. A., ALLEN, J. E., GREGORY, W. F., KOPF, M., MAIZELS, R. M. (1995):  
Infection of IL-4-deficient mice with the parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T Helper 2-dominated immune response.  
*J. Immunol.* 154, 5995-6001.
12. LIEW, F. Y., COX, F. E. G. (1991):  
Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide.  
In: Ash, C., Gallagher, R. B. (Edtrs.)  
*Immunoparasit. Today*, A17-A21.  
Elsevier, Cambridge.
13. MAIZELS, R. M., SARTONO, E., KURNIAWAN, A., PARTONO, F., SEKIRK, M. E., YAZDANBAKSHI, M. (1995):  
T-cell activation and the balance of antibody isotypes in human lymphatic filariasis.  
*Parasitol. Today* 8, 67-73.
14. MARECHAL, P., LE GOFF, L., PETIT, G., DIAGNE, M., TAYLOR, D. W., BAIN, O. (1995):  
The fate of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and naturally resistant mice.  
*Parasite* 3, 25-31.
13. MIKOVITS, J. A., MEYERS, A. M., ORTALDO, J. R., MINTY, A., CAPUT, D., ELRRARA, P., PUSCETTI, F. W. (1994):  
IL-4 and IL-13 induce LsK, a CsK-like tyrosine kinase in human monocytes.  
*J. Leukoc. Biol.* 56, 340-346.
16. MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A., COFFMAN, R. L. (1986):  
Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.  
*L. Immunol.* 136, 2348-2357.

17. MÖSSINGER, J., WENK, P. (1986):  
Fecundity of *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea) in vivo and in vitro.  
*Zeitschr. Parasitenkunde* 72, 121-131.
18. PEARLMAN, E., KROEZE, W. K., HAZLETT, F. E., CHEN, S. A., MAWHORTER, S. D., BOOM, W. H., KAZURA, J. W. (1993):  
*Brugia malayi*: Acquired resistance to microfilariae in BALB/c Mice correlates with local Th2 responses.  
*Exp. Parasit.* 76, 200-208.
19. SCHLEIMER, R. P., STERBINSKY, S. A., KAISER, J., BICKEL, C. A., KLUNK, D. A., TOMIOKA, K., NEWMAN, W., LUSCINSKAS, F. W., GIMBRONE, M. A., MCINTYRE, B. W., BOCHNER, B. S. (1992):  
IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium.  
*J. Immunol.* 148, 1086-1092.
20. SHER, A. (1995):  
Regulation of cell-mediated immunity by parasites: The ups and downs of an important host adaption.  
In: Boothroyd, J. C., Komuniecki, R. (Edtrs.)  
*Molecular Approaches to Parasitology*, 431-442.  
Wiley-Liss Inc., New York.
21. SOBOSLAY, P. T., DREWECK, C. M., HOFFMANN, W. H., LÜDER, C. G. K., HEUSCHKEL, C., GÖRGEN, H., BANLA, M., SCHULZ-KEY, H. (1992):  
Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia, cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment.  
*Clin. Exp. Immunol.* 89, 407-413.
22. STADNYK, A. W., GAULDIE, J. (1991):  
The acute phase protein response during parasitic infection.  
In: Ash, C., Gallagher, R. B. (Edtrs.)  
*Immunoparasit. Today*, A7-A12.  
Elsevier, Cambridge.
23. TILGNER, S., METZKE, H. (1964):  
Die Blutentnahme aus den Venen der Orbita.  
*Zeitschrift für Versuchstierkunde* 5, 59-77.
24. VOLLER, A., BIDWELL, D. E. (1976):  
Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice.  
*Bull. WHO* 53, 55-65.
25. WARDLAW, A. J. (1994):  
Eosinophils in the 1990s:  
New perspectives on their role in health and disease.  
*Postgrad. Med. J.* 70, 536-552.
26. WENK, P., KELLERMANN, E., SEEGER, V. (1993):  
Turnover of microfilariae in small mammals. 1. Disintegration of microfilariae (*Litomosoides sigmodontis*) (Filarioidea: Nematoda) after intravenous injection into *Sigmodon hispidus*, the cotton rat.  
*Trop. Med. Parasitol.* 44, 299-304.

**Korrespondenzadresse:** Wolfgang H. Hoffmann  
Institut für Tropenmedizin Tübingen  
Fax (49) 70 71/29 30 17  
Wilhelmstraße 27  
D-72074 Tübingen · Bundesrepublik Deutschland

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1996

Band/Volume: [18](#)

Autor(en)/Author(s): Haisch Karin, Schulz-Key Hartwig, Kopf M., Hoffmann Wolfgang H.

Artikel/Article: [Die Bedeutung von Interleukin-4 für den Verlauf einer Infektion mit der Filarie Litomosoides sigmodontis in Labormäusen. 151-160](#)