In vitro Kultur von *Brugia malayi*, einem Erreger der lymphatischen Filariose beim Menschen

Franco H. Falcone, Max Schlaak und Helmut Haas
Forschungsinstitut Borstel
Institut für Experimentelle Biologie und Medizin

Zusammenfassung

Die in vitro Kultur der Filarie Brugia malayi vom infektiösen zum jungen Adultstadium wird beschrieben. Es wurden zellfreie Kulturbedingungen und die Cokultur mit diversen menschlichen lymphatischen Zellinien miteinander verglichen. Durch Cokultivierung mit lymphatischen Zellinien konnte die Lebensdauer der Parasiten verlängert werden. Die besten Ergebnisse wurden durch Cokultivierung mit der humanen T-Zellinie Jurkat und humanen dermalen Fibroblasten als Feeder-Zellen in RPMI 1640-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem Humanserum erreicht. Dieses Kultursystem erlaubte die Kultivierung von B. malayi für mehr als 7 Wochen, mit einer durchschnittlichen Längenzunahme der Larven um den Faktor 6,4 (0,77±0,035 cm) und einem maximalen Wachstum um den Faktor 10 (1,2 cm). 100% der Parasiten hatten innerhalb von 14 Tagen das vierte Larvenstadium erreicht. Am 37. Tag hatten 17% der Würmer die letzte Häutung zum jungen Adultstadium vollzogen. Die Parasiten konnten bis zu 52 Tagen am Leben erhalten werden. In den ersten vier Kulturwochen verliefen sowohl das Längenwachstum als auch die Häutungen der Parasiten parallel zu der aus der Literatur bekannten Entwicklung im experimentellen Wirtstier. Das System ist relativ einfach in der Handhabung, hoch reproduzierbar und daher ein guter Ausgangspunkt für weitere Verbesserungen. Wir verstehen dieses Kultursystem als einen weiteren Schritt in Richtung des anzustrebenden vollständigen Ersatzes des Wirbeltieres durch in vitro Kultursysteme im Bereich der parasitologischen Forschung.

Keywords: filarial nematodes, in vitro cultivation, coculture, human T cells, human dermal fibroblasts, growth of larvae

Summary: In vitro cultivation of Brugia malayi, a parasitic nematode that causes human lymphatic filariasis.

The in vitro cultivation of the filarial nematode Brugia malayi from the infective stage to the fourth and the young adult stage is described. Different culture conditions including cell-free systems and coculture with different human lymphatic cell lines were compared. Cocultivation with each of the cell lines used enhanced the survival of the parasites. The best results were obtained employing the human T cell leukemia line Jurkat and human dermal fibroblasts as feeder cells in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated human serum. This culture system allowed the cultivation of B. malayi for more than 7 weeks with an average growth of the larvae by factor 6,4 (0,77±0,035 cm) and a maximum growth by factor 10 (1,2 cm). 100% of the parasites reached the fourth larval stage after 14 days. By day 37 of culture, 17% of the larvae had completed their final moult. Parasites remained alive up to 52 days. During the first four weeks of culture, both the length and the periods of moulting of the in vitro cultivated filariae closely resembled those observed with B. malayi in vivo in rodent hosts. This system provides a new approach for successful cultivation of B. malayi, that should help to overcome the difficulties of reproduction by other laboratories encountered with previous culture systems. It appeared highly reproducible in our hands and possibly further improvement can be obtained on its basis. This cultivation system represents a further step towards the complete replacement of the vertebrate host by means of in vitro culture systems in parasitological research.

Abkürzungsverzeichnis
B. malayi Brugia malayi, FKS Fötales Kälberserum, HS Humanes Serum, L3 Drittes (= infektiöses) Larvenstadium, L4 Viertes Larvenstadium, Mf Mikrofilarien, MNZ Mononukleäre Zellen, NI-Medium: Kulturmedium, zusammengesetzt aus IMDM und NCTC 135 (1:1)

1 Einleitung

Filariosen stellen für die Bevölkerung vieler tropischer Länder eine außerordentliche gesundheitliche und soziale Bedrohung dar. Eine besondere Form der Filariose ist die lymphatische Filariose, auch als „*Elephantiasis tropica*" bekannt. Diese Erkrankung wird durch *Wuchereria bancrofti, Brugia timori* und *Brugia malayi* (s. Abb. 1: Zyklus von *B. malayi*) verursacht. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, daß weltweit 72.8 Mio. Menschen mit *W. bancrofti* und 5.8 Mio. Menschen mit *Brugia* spp. infiziert sind (WHO, 1992).

Trotz intensiver Suche stehen zur Zeit noch keine Medikamente zur Verfügung, die ein vollständiges Abtöten der adulten, geschlechtsreifen Würmer ermöglichen (Makrofilaricide). Die bekannten Mittel Ivermectin und das seit mehr als 40 Jahren eingesetzte Diethylcarbamazin (DEC) wirken nur temporär gegen Mikrofilarien (Mikrofilaricide) und ermöglichen so keine definitive Heilung. Bei *B. malayi* selbst führen die genannten Medikamente nicht zum vollständigen Verschwinden der Mikrofilarien aus dem peripheren Blut (WHO, 1992). Daneben zeichnet sich DEC durch häufige, zum Teil bedrohliche Nebenwirkungen aus (Greene et al., 1985). Somit ergibt sich die Notwendigkeit der Suche nach einem weiteren, besser geeigneten Wirkstoff. Zusätzlich ist es sinnvoll, die Suche nach einem Impfstoff gegen lymphatische Filariosen voranzutreiben.

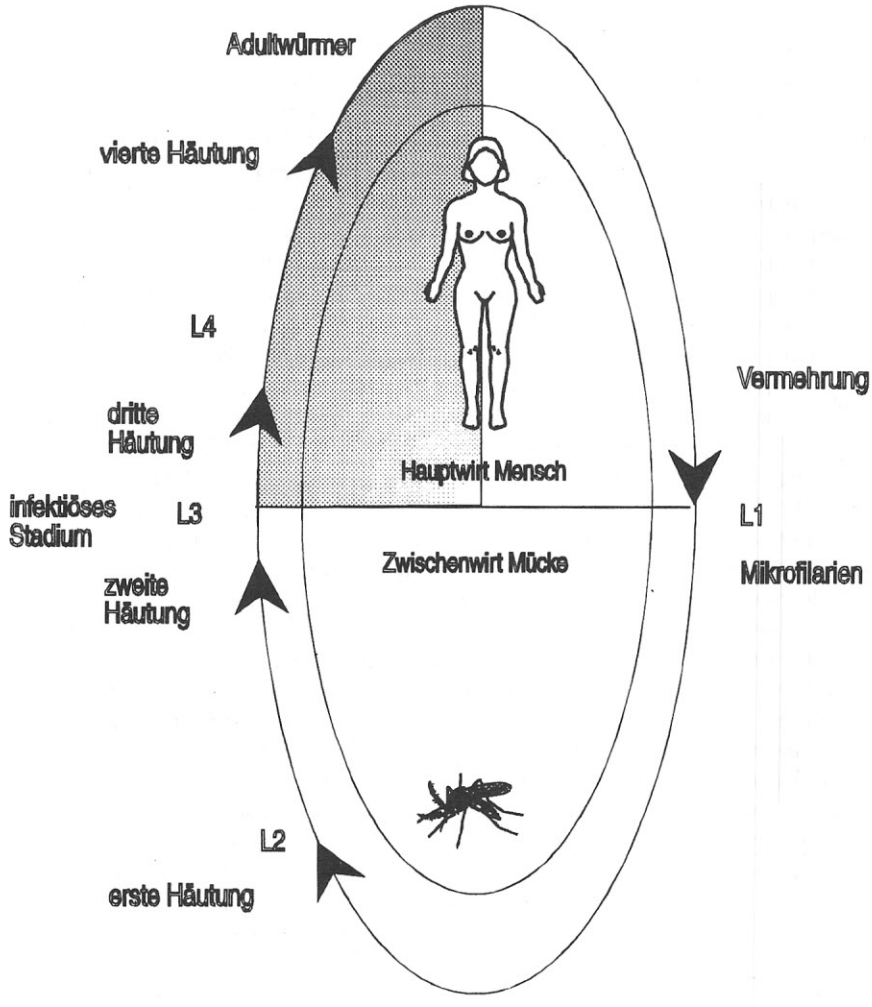

Abbildung 1: Zyklus von *Brugia malayi.*
Mit dem Stich infizierter Mücken (Vektoren) gelangen sogenannte L3-Larven (infektiöses Stadium) in den Menschen (Hauptwirt). Hier finden zwei Häutungen zum erwachsenen Adultwurm statt. Die in den Lymphknoten und Lymphgefäßen lebenden, geschlechtsreifen Adultwürmer (Makrofilarien) paaren sich. Die befruchteten Weibchen scheiden täglich mehrere tausend Mikrofilarien (L1) aus, die periodisch im Blut auftauchen und bei einem erneuten Stich von einer Mücke aufgenommen werden, um sich dort über zwei Häutungen zur L3 weiterzuentwickeln. Der Abschnitt der Entwicklung im Wirbeltierwirt, der durch unsere *in vitro* Kulturtechnik ersetzt werden kann, ist grau unterlegt.

Voraussetzung für die Entwicklung eines Impfstoffs oder eines Therapeutikums gegen Filarien ist es, diese im Labor in ausreichender Menge und in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien zur Verfügung zu haben. Hierzu gibt es einerseits die Möglichkeit, die Parasiten aus infizierten Individuen zu gewinnen, andererseits die Haltung eines vollständigen Entwicklungszyklus in Versuchstieren oder die Etablierung einer *in vitro* Kultur.

Die Beschaffung von Untersuchungsmaterial wird durch die ausgeprägte Wirtsspezifität und den Organotropismus von Filarien erschwert. Während bei *Onchocerca volvulus* (Erreger der Flußblindheit) die Gewinnung von Adultwürmern aus Hautknoten befallener Individuen aus endemischen Gebieten relativ einfach ist, scheidet diese Möglichkeit bei den im menschlichen lymphatischen System vorkommenden Filarien (*B. malayi, B. pahangi, W. bancrofti*) aus. Hinzu kommt, daß für alle oben genannten Filarien das infektiöse Stadium, dessen Verfügbarkeit besonders im Hinblick auf eine Impfstoffentwicklung wichtig ist, auf diesem Wege normalerweise nicht zugänglich ist.

Was die Züchtung der Parasiten in Labortieren angeht, so kann von den drei Erregern der humanen lymphatischen Filariose nur *B. malayi* in Nagern (*Meriones unguiculatus, Mastomys coucha*) gehalten werden. Daher wird in der Filarioseforschung

öfter auf sogenannte „Tiermodelle" mit nicht humanpathogenen Filarien zurückgegriffen (z.B. *Litomosoides carinii/Sigmodon hispidus* oder *Acanthocheilonema viteae/Meriones unguiculatus*, in beiden Fällen handelt es sich um Parasit/Wirt Paarungen, die auch in der Natur vorkommen). Hierbei wird das Versuchstier einerseits zur Aufrechterhaltung des Entwicklungszyklus der Parasiten genutzt, andererseits dient es gleichzeitig auch als „Modell"organismus für parasitäre Infektionen des Menschen. Die Erhaltung solcher Zyklen im Wirbeltierwirt ist mit z.T. erheblichen Belastungen für die Versuchstiere verbunden. Da bei den untersuchten Filarien immer blutsaugende Arthropoden als Zwischenwirte fungieren (s. z.B. Zyklus von *B. malayi*, Abb.1), kann schon durch Verwendung von künstlichen Blutfütterungsvorrichtungen für die Arthropoden eine erste Verbesserung der Bedingungen für die Versuchstiere erzielt werden (Issmer et al., 1994).

Die komplette Entwicklung des Parasiten *in vitro* stellt eine anzustrebende Alternative zu den bisher für experimentelle Untersuchungen noch verbreiteten „Tiermodellen" dar. Obwohl bei einigen parasitären Helminthen eine *in vitro* Züchtung vom infektiösen Larvenstadium bis zum adulten, geschlechtsreifen Wurm, inklusive der Ablage fertiler oder unfertiler Eier, gelungen ist (Douvres und Malakatis, 1977; Basch, 1981a, b; Smyth, 1992), ist dieses Problem bei Filarien noch nicht gelöst. Von den drei Erregern der lymphatischen Filariose beim Menschen hat die *in vitro* Kultur von *Brugia* spp. zu den besten Ergebnissen geführt. Aber auch hier steht ein überall reproduzierbares, sicheres Kultursystem noch nicht zur Verfügung. Zwar ist für *B. malayi* ein Kultursystem beschrieben worden, das eine Entwicklung vom dritten Larvenstadium über zwei Häutungen zum Adultstadium mit Mikrofilarienbildung ermöglicht (Riberu et al., 1990). Die so erzielten Ergebnisse konnten jedoch in anderen Laboratorien bisher nicht reproduziert werden (Smillie et al., 1994; unsere eigenen Ergebnisse), während andere Systeme nur gelegentlich zu einzelnen, in ihrer Entwicklung teilweise zurückgebliebenen, in jedem Fall aber zu nicht fertilen Adultwürmern (Mak et al., 1983) führen. Die wichtigsten in der Literatur seit 1979 erschienenen Kultursysteme sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefaßt.

Für die *in vitro* Kultur parasitärer Helminthen wurden sowohl zellfreie Kultursysteme als auch solche, in denen Feeder-Zellen eingesetzt werden, beschrieben. Feeder-Zellen dienen als Produzenten von meist nicht näher definierten, unter Umständen kurzlebigen Wachstums- und Entwicklungsfaktoren, die an das umgebende Kulturmedium abgegeben werden. Da die nutritiven und metabolischen Erfordernisse für die Entwicklung parasitärer Filarien nicht ausreichend bekannt sind, ist es bisher nicht möglich, ein Kultursystem aus definierten Einzelkomponenten zusammenzustellen. Man greift daher auf komplexe Nährstoffgemische zurück. Hier ist vor allem der (z.B. für *B. malayi*) bisher obligatorische Zusatz von Serum zur Kultur zu nennen, in denen die für die Wirksamkeit maßgeblichen Schlüsselfaktoren noch nicht identifiziert sind. Die Zusammensetzung des Serums unterliegt individuellen Schwankungen. Das kann gegebenenfalls die Reproduzierbarkeit der Kulturergebnisse beeinträchtigen. Kultursysteme mit definierten Komponenten (kein Zusatz von Serum) haben bei der *in vitro* Züchtung von Filarien bisher nur zu Teilerfolgen geführt (Abraham et al., 1987).

Die von uns verfolgte Strategie zur *in vitro* Kultur von *B. malayi* bestand darin, die Parasiten *in vitro* mit Zellarten zu cokultivieren, mit denen sie im Wirtsorganismus unmittelbar direkten Kontakt haben. Da sich *B. malayi* Adultwürmer beim Menschen vorwiegend im Lymphsystem aufhalten, lag es nahe, der Kultur lymphatische Zellen zuzusetzen. Wir

Tabelle 1: Vergleich bisher publizierter *in vitro* Kultursysteme für *B. malayi* und *B. pahangi*.

Kultursystem/ Publikation	Feeder-Zellen	zell-frei	Medium	L3	L4	adult	Mf
Chen and Howells 1979 (*B. pahangi*)	DS§	–	Med. 199* 10% NCS**	X	–	–	–
Wong et al. 1982 (*B. pahangi*)	BEK$ DSM†	–	MEM*** 10% FKS	X	X	–	–
Mak et al. 1983 (*B. malayi*)	LCC-MK2‡	–	RPMI 1640 10% HS	X	X	(X)	–
Huijun et al. 1984 (*B. malayi*)	BJT£	–	RPMI 1640 10% FKS?	X	X	–	–
Riberu et al. 1990 (*B. malayi*)	–	X	NI-Med. 10% HS	X	X	X	X
Hong and Wong 1991 (*B. pahangi*)	–	X	RPMI 1640 10% HS	X	X	–	–
Wisnewsky and Weinstein 1993 (*B. pahangi*)	LCC-MK2‡	–	NI-Med. 10% FeCS+	X	X	–	–
Smillie et al. 1994 (*B. malayi*)	–	X	NI-Med. 10% HS	X	X	(X)	–

Symbole: § Dog sarcoma cell line; $ Bovine embryonic kidney cell line; † Dog skeletal muscle cell line; ‡ Rhesus monkey continuous kidney cell line; £ Baby jird testes cell line; * Medium 199; ** Newborn calf serum; *** Minimum Essential Medium; + Iron supplemented calf serum

haben daher den wachstumfördernden Effekt verschiedener lymphatischer Zellinien und peripherer Blutleukozyten (MNZ) untersucht. Dabei wurden nur Humanserum und humane Zellen oder Zellinien eingesetzt. Wir konnten ein Kultursystem etablieren, mit dem wir dem Ziel einen Schritt näher kommen, *B. malayi in vitro* vom infektiösen Larvenstadium bis zum geschlechtsreifen Adultwurm zu kultivieren, um damit den Wirbeltierabschnitt des Parasiten durch ein geeignetes *in vitro* System ersetzen zu können.

2 Tiere, Material und Methoden

Gewinnung der infektiösen B. malayi Larven.
L3-Larven von *B. malayi* erhalten wir aus infizierten Mücken der Art *Aëdes aegypti* nach Kälteschock- und Etherbetäubung durch Quetschen und Bärmannfiltertechnik. Nach mehrfachem Waschen durch Sedimentation in einem Spitzröhrchen werden die Larven unter mikroskopischer Kontrolle einzeln in das jeweilige Kulturmedium transferiert. Die Inkubation der Kultur findet in einem befeuchteten Zellkulturbrutschrank mit 6% CO_2/Luft bei 37 C statt. Nur morphologisch intakte, bewegliche Larven werden eingesetzt.

Kultur in einem zellfreien System.
In den ersten Versuchen benutzten wir eine 1:1 Mischung aus NCTC 135 (GIBCO) und IMDM (GIBCO), 10% hitze-inaktiviertem, gepooltem Humanserum, 100 U/ml Penicillin G Na-Salz (GIBCO) und 100 µg/ml Streptomycin (GIBCO). Dieses von Franke und Weinstein (1983) erstmals beschriebene Medium wird im folgenden als NI-Medium bezeichnet. Vor Gebrauch wird das komplette Medium sterilfiltriert (0,22 µm Membran, Sartorius). Das humane Serum wird von drei gesunden Spendern ohne Berücksichtigung der Blutgruppe gewonnen. Nach der Zentrifugation wird das Serum aliquotiert und bei –20°C bis zum Gebrauch gelagert. Die Inkubation der Parasiten findet in 24-Loch Zellkulturplatten (Greiner) oder in 15 ml Röhrchen (Falcon) statt. Die Röhrchen werden in einem flachen Winkel im Brutschrank gehalten. Die 24-Loch Platte enthält 20–50 Parasiten in 2 ml Medium, die Röhrchen 20–30 Parasiten in 2 ml Medium. Jeden zweiten Tag wird das Medium gewechselt. In einer zweiten Versuchsreihe wurden 110 verschiedene Humanseren (freundlicherweise von W. Gräßmann, DRK, Lütjensee zur Verfügung gestellt) anstelle des gepoolten Serums eingesetzt. Hierbei wurden 96-Loch Flachboden-Zellkulturplatten (Nunc) mit 10–20 Parasiten in 250 µl Medium eingesetzt.

Cokultur mit Feeder-Zellen.
Als Medium benutzen wir RPMI 1640 (25 mM Hepes-gepuffert) mit Zusatz von Penicillin/Streptomycin und 10% inaktiviertem Humanserum. Als Feeder-Zellen benutzen wir die menschliche T-Zellinie Jurkat und humane dermale Fibroblasten (freundlicherweise von H. Loppnow, Borstel, zur Verfügung gestellt; Loppnow et al., 1989). Da die Jurkat-Zellen sehr rasch proliferieren, teilen wir die Kultur alle 2–3 Tage und halten dadurch die Zellkonzentration zwischen ca. 10^5 und 10^6/ml. Bei einer anfänglichen Dichte von nur 30.000 Zellen/ml wird gewährleistet, daß die exponentielle Wachstumsphase der Jurkat-Zellinie erst nach ca. 8 Tagen, also zum Zeitpunkt des Auftretens der dritten Häutung, erreicht wird. Durch den Einsatz nur geringer Zelldichten in der Anfangsphase der Kultur soll eine Überstimulation des larvalen Wachstums vermieden werden, da sich eine solche in anderen Kultursystemen als nachteilig erwiesen hat (*in vitro* Kultur von *Acanthocheilonema viteae*, R. Lucius, 1993). Nach erfolgter dritter Häutung wird in unserem System eine höhere Zelldichte (bis zu 10^6 Zellen/ml) eingesetzt. Die Dichte der humanen dermalen Fibroblasten beträgt anfangs 1000 Zellen/cm^2.

Die Parasiten werden in den ersten zwei Wochen mit den humanen dermalen Fibroblasten und der Jurkat Zellinie cokultiviert. Nach dieser Zeit beginnt sich die Fibroblastenschicht vom Boden der Kulturplatten abzulösen und zusammenzurollen. Da dies häufig zu einem mechanischen Einschluß der Larven und einem Verlust derselben führt, werden nach zwei Wochen die Kulturen in einer frischen Platte ohne Fibroblastenbeschichtung weitergeführt. Die schnell proliferierenden Zellen werden alle 2–3 Tage durch Sedimentation in einem Spitzröhrchen von den Parasiten abgetrennt und auf eine Zelldichte von ca. 10^5/Loch eingestellt.

In einigen Versuchsreihen wurden die folgenden Zellinien (freundlicherweise von W.-M. Becker, Borstel, zur Verfügung gestellt), einzeln oder in Kombination, in ihrer exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt: Daudi, Jok-1, Jurkat, KU-812, Molt-4, Ramos, Reh und U266. Alternativ wurden die Parasiten auch in Anwesenheit von frisch isolierten humanen mononukleären Zellen (MNZ) aus peripherem Blut kultiviert. Die MNZ wurden aus Heparin-Blut über Ficoll-Hypaque Dichtegradienten-Zentrifugation (Kanof und Smith, 1991) isoliert. Die MNZ wurden einmal wöchentlich durch frische Zellen ersetzt.

Bestimmung der Häutungsraten.
Die Häutungsrate erhalten wir durch Teilen der Anzahl vollständig abgestreifter Häute durch die Gesamtzahl eingesetzter Parasiten.

Messung der Parasiten.
Um die Länge der Parasiten ohne vorherige Fixierung zu messen, werden hochauflösende Video-Standbilder mit einer geeichten Meßskala verglichen.

Fixierung und Färbung der Parasiten.
Für morphologische Untersuchungen werden die Parasiten mindestens 24 h in AFA (Alkohol/Formalin/Eisessig 8:1:1 v/v/v) fixiert und für mindestens 48 h in 50% gefärbter Glycerinlösung (5 ml 50% Glycerin, 5

Tropfen 1% Methylgrün, 1 Tropfen ges. wäßrige Pikrinsäurelösung) bei Raumtemperatur gehalten (McClung Jones, 1966).

Statistische Auswertung.
Der Students t-Test wurde zur Signifikanzprüfung der mittleren Längenzunahme der Parasiten eingesetzt.

3 Ergebnisse

Kultur der Larven im zellfreien System.
In den Kulturen ohne Feeder-Zellen mit 10% gepooltem Humanserum als Mediumzusatz trat die Häutung (dritte Häutung im Entwicklungszyklus) vom dritten zum vierten Stadium nach 8 Tagen ein; 70% der Larven hatten ihre Häutung innerhalb von 14 Tagen abgeschlossen, während die restlichen 30% vor oder während der Häutung starben. Diese Larven zeichneten sich lichtmikroskopisch durch eine ausgeprägte Granulation mit einer nur teilweise abgestreiften *Cuticula* aus. 95% der Larven, die ihre Häutung erfolgreich abgeschlossen hatten, zeigten eine stark verminderte Beweglichkeit und eine aberrante „korkenzieherartige" Morphologie, die sich über Teile oder über die gesamte Länge des Parasiten erstreckte. Nach 24 Tagen waren alle Larven tot.

Analoge Ergebnisse erhielten wir in den Versuchen, in denen 110 verschiedene Seren einzeln der Kultur zugesetzt wurden. Obwohl geringfügige Unterschiede in der wachstumsfördernden Eigenschaft der Seren gesehen werden konnten, gab es keine signifikante Beeinflussung der Kulturergebnisse durch einzelne Seren. Auch hier waren nach 24 Tagen alle Larven tot. Es konnten auch keine Unterschiede zwischen der Kultur in Zellkulturplatten und den Röhrchen festgestellt werden.

Cokultur der Larven mit Fibroblasten.
In diesem System traten die ersten Häutungen nach 8 Tagen auf, nach 14 Tagen hatten sich 86% der Larven erfolgreich gehäutet. 20% der L4 behielten ihre volle Beweglichkeit nach der Häutung, und das Erscheinen der „korkenzieher-artigen" Morphologie wurde auf 1–10% der kultivierten Larven reduziert.

Cokultur der Larven mit Fibroblasten und verschiedenen lymphatischen Zellinien oder MNZ.
Da *B. malayi* beim Menschen eine besondere Adaptation an das lymphatische System zeigt, haben wir im folgenden Schritt dem Kultursystem neben den Fibroblasten eine oder zwei der folgenden Zellinien zugesetzt: Die T-Zellinien Molt-4 und Jurkat, die B-Zellinien Daudi, Jok-1, Ramos, U266, die non-T-non-B-Zellinie Rch, die Basophilen-Zellinie KU812 oder frisch isolierte MNZ. Einige Zellinien hatten eine wesentlich geringere Wachstumsrate als die schnell proliferierenden Zellinien Jurkat und Jok-1. Mit allen Zellinien waren die Entwicklung und das Wachstum der Larven in Kultur besser als im zellfreien System oder im System mit Fibroblasten als einzigen Feeder-Zellen. Nur die Verwendung von MNZ zeigte im Vergleich zu den Kulturen mit Fibroblasten alleine keine relevanten Verbesserungen. Eine drastische Verbesserung der Wachstumsförderung, sichtbar an einer bemerkenswerten Längenzunahme und einer Verlängerung der Lebensdauer, wurde durch den Einsatz der Jurkat-Zellinie erreicht. Die besten Ergebnisse zeigte die Cokulti-

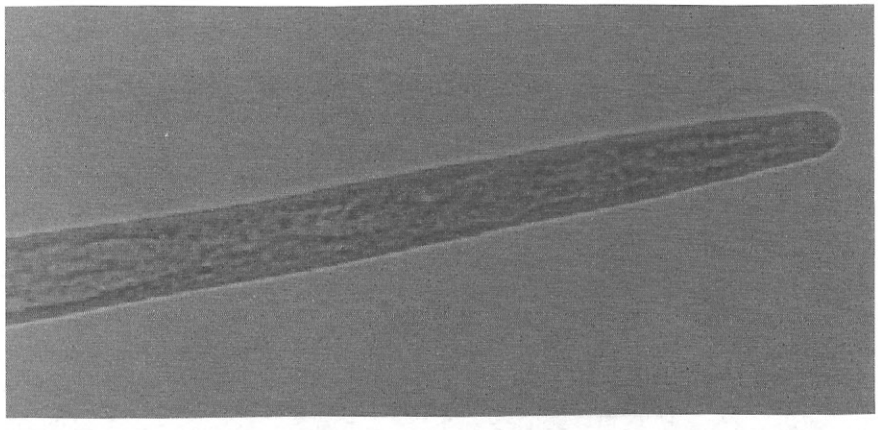

Abbildung 2: Vorderende einer frisch aus dem Vektor präparierten *B. malayi*-L3. Es ist die charakteristische, spitz zulaufende Form erkennbar (×200).

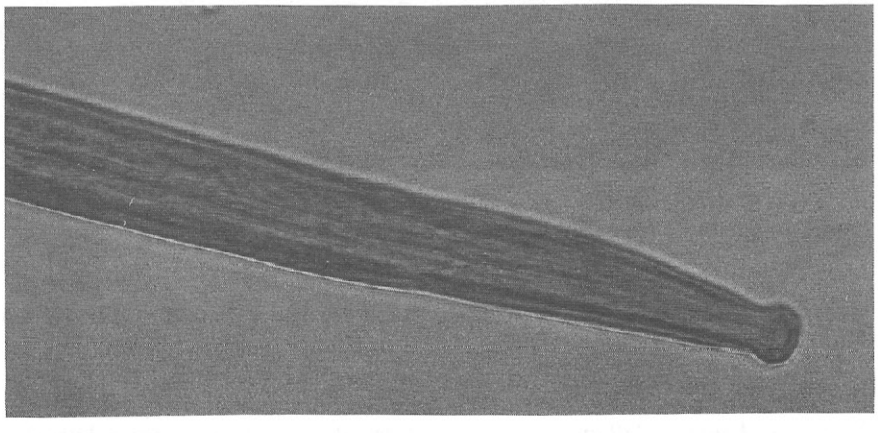

Abbildung 3: Vorderende einer *B. malayi*-L4 nach 21 Tagen *in vitro* Kultur. Es ist die für das vierte Larven- und das Adultstadium charakteristische globuläre Form erkennbar (×200).

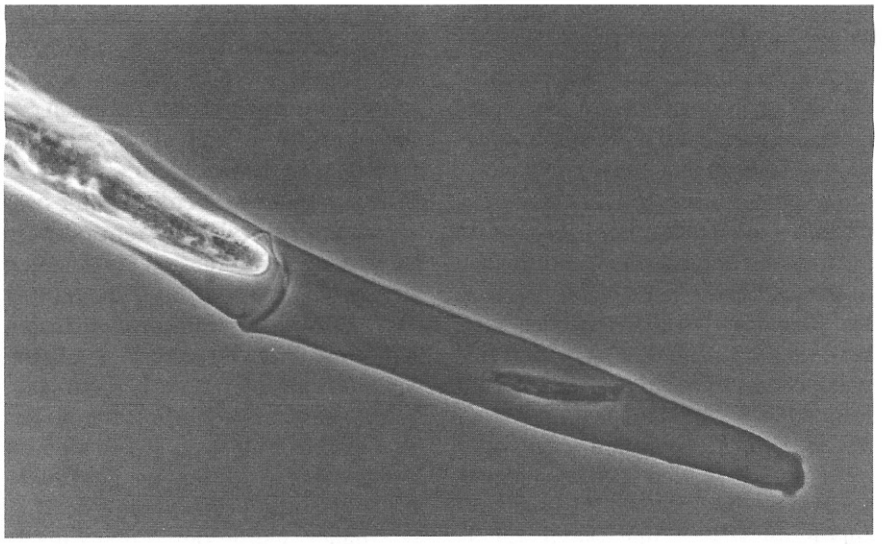

Abbildung 4: Hinterende einer *in vitro* kultivierten infektiösen Larve von *B. malayi* während der Häutung von L3 L4.
In der teilweise schon abgestreiften *Cuticula* der L3, auf der noch die caudalen Papillen zu sehen sind, ist das Hinterende der L4 erkennbar (×200).

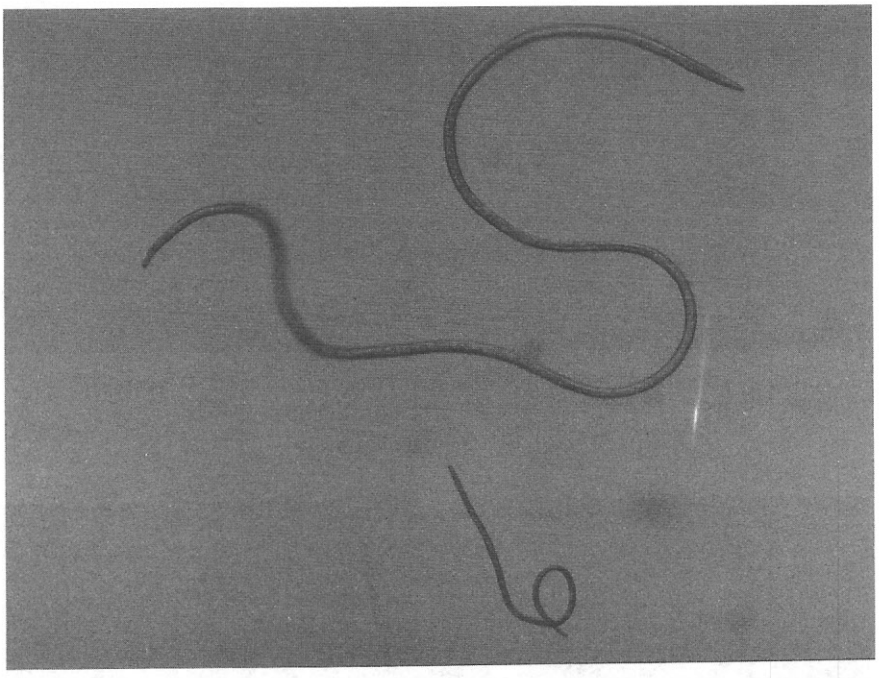

Abbildung 5: Größenvergleich einer *in vitro* kultivierten, mittelgroßen L4 von *B. malayi* (oben) mit einer frisch aus dem Vektor präparierten L3 (×25).

vierung der Larven mit dermalen Fibroblasten und der Jurkat-Zellinie.

Cokultur der Larven mit Fibroblasten und Jurkat-Zellen.
In diesem System traten die ersten Häutungen nach 8–10 Tagen auf; nach 14 Tagen hatten 100% der L3 ihre Häutung abgeschlossen. Die L4 waren alle hoch beweglich und zeigten die erwarteten morphologischen Veränderungen, die normalerweise die erfolgreiche Häutung von *B. malayi* begleiten (Mak et al., 1983). Hierzu gehören die Veränderung des Vorderendes von einer schmal zulaufenden zu einer breiteren, knopfartigen Form (s. Abb. 2 und 3) und der Verlust der caudalen Papillen am Hinterende (s. Abb. 4).

Die vor allem im zellfreien System auftretenden morphologischen Aberrationen („korkenzieherartige" Morphologie, Granulationen) lagen hier je nach Versuch bei nur 0–6% der eingesetzten Larven. Die durchschnittliche Längenzunahme der Larven betrug das 6,4fache, das längste Exemplar zeigte eine Größe von 1,2 cm (10fache Längenzunahme, s. Tab. 2). Abbildung 5 zeigt den Längenvergleich einer mittelgroßen *in vitro* kultivierten, 21 Tage alten L4 mit einer frisch aus dem Vektor geschlüpften L3 von *B. malayi*.

Die vierte Häutung von der L4 zum jungen Adultstadium fand zwischen den Tagen 26 und 37 der Kultur statt. Nach 37 Tagen hatten 17% der Larven ihre letzte Häutung abgeschlossen. Danach nahmen die Wachstumsrate ab und die Mortalitätsrate zu. Einige präadulte Würmer konnten bis zu 52 Tage am Leben erhalten werden.

Eine vergleichende Zusammenfassung der Ergebnisse mit den verschiedenen Kultursystemen zeigt die Tabelle 3.

4 Diskussion

Wir haben ein *in vitro* Kultursystem für die Entwicklung von *B. malayi* vom infektiösen zum präadulten Stadium etabliert. Die Technik besteht in der Cokultivierung der Parasiten mit humanen dermalen Fibroblasten und der humanen T-Zellinie Jurkat in RPMI 1640-Medium mit 10% Humanserum als Supplement. Durch dieses Kultursystem sind drei der vier im Menschen vorkommenden Entwicklungsstadien von *B. malayi* für immunologische oder biochemische Untersuchungen, etwa zum Zwecke der stadienspezifischen Antigengewinnung (Impfstoffentwicklung) oder für ein *in vitro* Screening von Pharmaka (Entwicklung und

Tabelle 2: Ergebnisse der Cokultur von *B. malayi*-Larven mit humanen dermalen Fibroblasten und der Jurkat-Zellinie als Feeder-Zellen.

Tag	Anzahl gemessener Larven	mittlere Länge (cm) +/– s.f.*	mittl. Zuwachs-Faktor	t-test
0	10	0,121 +/– 0,0053**	0	–
5	10	0,170 +/– 0,0053**	× 1,4	p < 0,001
14	12	0,211 +/– 0,0109**	× 1,7	p < 0,001
17	10	0,286 +/– 0,0277**	× 2,4	p < 0,05
24	6	0,720 +/– 0,0422**	× 5,9	p < 0,001
28	7	0,770 +/– 0,0348**	× 6,4	p < 0,05

* Die mittleren Werte unterscheiden sich signifikant von der vorangegangenen Messung (Students t test); ** s.f.: Standardfehler des Mittelwertes

Tabelle 3: Vergleich der Ergebnisse in den verschiedenen Kultursystemen mit und ohne Feeder-Zellen. Erst durch die Verwendung der schnell proliferierenden Jurkat-Zellinie als Feeder-Zelle werden eine Längenzunahme um das 6,4fache und die Häutung zum jungen Adultstadium erreicht.

System	Häutung L3 L4 (Tage)	Häutung L4 ad. (Tage)	morph. Aberr. % (L4)	mittl. Zuwachs-Faktor	L3	L4	ad.**
Zellfrei; NI-Medium, 10% HS (24-Loch Platten)	70% (8–14)	–	95%	< 1,5	X	(X)*	–
Zellfrei; NI-Medium, 10% HS (Röhrchen)	70% (8–14)	–	95%	< 1,5	X	(X)*	–
Fibroblasten RPMI, 10% HS	86% (8–14)	–	1–10%	< 2,0	X	(X)*	–
Fibroblasten/Jurkat RPMI, 10% HS	100% (8–14)	17% (26–37)	0–6%	6,4	X	X	X

* Nach Häutung Verlust der Beweglichkeit und Auftreten von morphologischen Aberrationen; Einzelheiten im Text. ; ** ad. = jung-adultes Stadium

Austestung von Makrofilariciden) zugänglich. Die Vorteile eines solchen Kultursystems sind neben der Einsparung von Versuchstieren auch eine Kostensenkung, die Verfügbarkeit definierter Entwicklungsstadien und die Möglichkeit der direkten Beobachtung der Effekte der untersuchten Pharmaka auf den Stoffwechsel oder die Beweglichkeit der Parasiten. Zusammen mit neueren Techniken der Membranfütterung (Issmer et al., 1994) und der Cryokonservierung von Parasitenstadien (Lucius, 1993; Rapp et al., 1994) kann so eine drastische Reduzierung des Versuchstierverbrauchs erreicht werden.

Mit dem zellfreien Kultursystem von Riberu et al. (1990) haben wir keine befriedigenden Ergebnisse erreicht. Erst durch den Einsatz von Feeder-Zellen, ähnlich wie Mak et al. (1983), konnte eine wesentliche Verbesserung der Kulturergebnisse erzielt werden. In unserem zellfreien System entwickelten sich die infektiösen Larven nicht über das vierte Stadium hinaus, und nach 24 Tagen waren alle Larven tot. Wir konnten auch keine wesentliche Beeinflussung durch die Art oder Quelle des verwendeten Serums beobachten: Wir fanden zwar, daß die Anwesenheit von Serum unerläßlich für das Überleben und die Weiterentwicklung der Larven ist, jedoch gab es keine signifikante Beeinflussung der Kulturergebnisse durch einzelne Seren. Auch hier waren nach 24 Tagen alle Larven tot. Im weiteren konnten wir in mehreren Versuchsreihen keine Unterschiede zwischen der Kultur in 24-Loch-Zellkulturplatten und den in einem flachen Winkel gehaltenen Kulturröhrchen feststellen. Die Bedeutung des letzteren technischen Details für den Erfolg des Kultursystems wird von Riberu et al. besonders hervorgehoben (J. K. Baird, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß im zellfreien Kultursystem, unabhängig von technischen Einzelheiten, die Wahl eines geeigneten Serums vermutlich nicht den Schlüsselfaktor für den Erfolg der Kultur darstellt, sondern dieser vielmehr von der Anwesenheit weiterer, bisher noch unbekannter Faktoren abhängt. Da diese mutmaßlichen Faktoren in der natürlichen Umgebung des Wirtes (für *B. malayi* das Lymphsystem infizierter Menschen) vorhanden sein müssen, haben wir versucht, *in vitro* einige der Zellarten einzusetzen, mit denen die Parasiten auch *in vivo* Kontakt haben. Wir untersuchten daher den wachstumfördernden Effekt verschiedener lymphatischer Zellinien (T-, B-, non-T-non-B-, Basophilen-Zellinien und frisch isolierte mononukleäre Zellen aus peripherem Blut), zum Teil in Kombination miteinander, alle in Anwesenheit von humanen dermalen Fibroblasten. In der Annahme, daß *B. malayi* ein vorwiegend an den Menschen adaptierter Parasit ist, benutzten wir ausschließlich menschliche Zellen und Seren. Obwohl mit allen Zellinien die Entwicklung und das Wachstum der Larven in Kultur besser als im zellfreien System waren, konnte eine drastische Verbesserung des Wachstums, sichtbar an der bemerkenswerten Längenzunahme und einer maximalen Verlängerung der Lebensdauer, erst durch den Ein-

satz der Jurkat-Zellinie erreicht werden. Die besten Ergebnisse zeigte die Cokultivierung der Larven mit dermalen Fibroblasten und der Jurkat-Zellinie. In diesem System traten die ersten Häutungen nach 8–10 Tagen auf; nach 14 Tagen hatten 100% der Larven ihre Häutung abgeschlossen, am 37. Tag hatten 17% der Würmer die letzte Häutung zum jungen Adultstadium vollzogen. Die Parasiten konnten bis zu 52 Tagen am Leben erhalten werden. In den ersten vier Kulturwochen verliefen sowohl das Längenwachstum als auch die Häutungen der Parasiten parallel zu der aus der Literatur bekannten Entwicklung im experimentellen Wirtstier (Ash and Riley, 1970).

Der experimentelle Befund, daß erst durch die Cokultivierung der Parasiten mit Fibroblasten und der Jurkat-Zellinie eine Entwicklung zum jungen Adultstadium gelingt, könnte bedeuten, daß diese Zellen spezifische, essentielle wachstumfördernde Faktoren bereitstellen. Die Identifikation dieser Faktoren sollte weiteren Aufschluß über die physiologischen Bedürfnisse der Filarien liefern.

Das hier vorgestellte Kultursystem stellt einen neuen Ansatz dar, der es ermöglicht, die bisher schwierige Reproduzierbarkeit der *in vitro* Kultur von *B. malayi* entscheidend zu verbessern. Das System ist einfach in der Handhabung, hoch reproduzierbar und daher ein guter Ausgangspunkt für weitere Verbesserungen. Wir verstehen dieses Kultursystem als einen Beitrag in Richtung des anzustrebenden vollständigen Ersatzes des Wirbeltieres durch *in vitro* Kultursysteme im Bereich der parasitologischen Forschung.

Literatur

Abraham, D., Mok, M., Mika-Grieve, M. und Grieve R. B. (1987). In vitro culture of Dirofilaria immitis third and fourth stage larvae under defined conditions. *Journal of Parasitology 73*, 377–383.

Ash, L. R. und Riley, J. M. (1970). Development of subperiodic Brugia malayi in the jird, Meriones unguiculatus, with notes on infections in other rodents. *Journal of Parasitology 56*, 969–973.

Basch, P. F. (1981a). Cultivation of Schistosoma mansoni in vitro. I: Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *Journal of Parasitology 67*, 179–185.

Basch, P. F. (1981b). Cultivation of Schistosoma mansoni in vitro. II: Production of infertile eggs by worm pairs cultured from cercariae. *Journal of Parasitology 67*, 186–190.

Chen, S. N. und Howells, R. E. (1979). The in vitro cultivation of the infective larvae and the early mammalian stages of the filarial worm, Brugia pahangi. *Ann. Trop. Med. Parasit. 73*, 473–486.

Douvres, F. W. und Malakatis, G. M. (1977). In vitro cultivation of Ostertagia ostertagi, the medium stomach worm of cattle. I. Development from infective worm to egg-laying adults. *Journal of Parasitology 63*, 520–527.

Franke, E. D. und Weinstein, P. P. (1983). Dipetalonema viteae: (Nematoda: Filarioidea): culture of third-stage larvae to young adults in vitro. *Science 221*, 161–163.

Greene, B. M., Taylor, H. R., Cupp, E. W., Murphy, R. P., White, A. T., Aziz, M. A., Schulz-Key, H., D'Anna, S. A., Newland, H. S., Goldschmidt, L. P., Auer, C., Hanson, A. P., Freeman, S. V., Reber, E. W. und Williams, P. N. (1985). Comparison of ivermectin and diethylcarbamazine in the treatment of onchocerciasis. *New England Journal of Medicine 313*, 33-138.

Hong, X. und Wong, M. M. (1991). A cell-free culture system for development of large numbers of Brugia pahangi larvae. *International Journal for Parasitology 21*, 963–964.

Issmer, A. E., Schilling, T. H., Vollmer, A. und Grunewald, J. (1994). Replacement of laboratory animals in the management of blood-sucking arthropods. In C. A. Reinhardt (Hrsg.), *Alternatives to animal testing. New ways in the biomedical sciences, trends and progress* (125–129). Weinheim: Verlag Chemie.

Kanof, M. E. und Smith, P. D. 1991. Immunologic studies in humans. In J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach und W. Strober (Hrsg.), *Current Protocols in Immunology* (7.1.1–7.1.5). Current Protocols.

Loppnow, H., Flad, H.-D., Dürrbaum, I., Musehold, J., Fetting, R., Ulmer, A. J., Herzbeck, H. und Brandt, E. (1989). Detection of Interleukin 1 with human dermal fibroblasts. *Immunobiology 179*, 283–291.

Lucius, R. (1993). Einsparung von Versuchstieren bei der Untersuchung von Filarieninfektionen. In W. Hardegg, I. Livaditis und M. Vogt (Hrsg.), *Tierschutz durch Alternativen* (103–112). Berlin: Verlag Gesundheit.

Mak, J. W., Lim, P. K. C., Sim, B. K. L. und Liew, L. M. (1983). Brugia malayi and B. pahangi: Cultivation in vitro of infective larvae to the fourth and fifth stages. *Experimental Parasitology 55*, 243-248.

McClung Jones, R. (1966). *Basic microscopic technics.* Chicago & London: The University of Chicago Press.

Rapp, J., Hoffmann, W. H., Keller, L., Welzel, A. und Schulz-Key, H. (1994). Maintenance of filarial cycles in the laboratory: approaches to replacing the vertebrate host. In C. A. Reinhardt (Hrsg.), *Alternatives to animal testing. New ways in the biomedical sciences, trends and progress* (131–139). Weinheim: Verlag Chemie.

Riberu, W. A., Soeroto Atmosoedjono, Purnomo, Tirtokusumo, S., Bangs, M. J. und Baird, J. K. (1990). Cultivation of sexually mature Brugia malayi in vitro. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 43*, 3-5.

Smillie, C. L., Vickery, A. C., Kwa, B. H., Nayar, J. K. und Rao, U. R. (1994). Evaluation of different medium supplements for in vitro cultivation of Brugia malayi third-stage larvae. *Journal of Parasitology 80*, 380–383.

Smyth, J. D. (1990). Cultivating parasitic helminths in vitro: advantages and problems. In J. D. Smyth (Hrsg.), In vitro cultivation of parasitic helminths (1–5). Boston: CRC

Press, Boca Raton, Ann Arbor.

WHO Expert Committee on Filariasis (1992). Lymphatic filariasis: the disease and its control. In WHO *Technical Report Series Nr. 821* (1–71). Geneva: WHO.

Wisnewsky, N. und Weinstein, P. P. (1993). Growth and development of Brugia pahangi larvae under various in vitro conditions. *Journal of Parasitology 79*, 390–398.

Wong, M. M., Knighton, R., Fidel J. und Wada, M. (1982). In vitro cultures of infective-stage larvae of Dirofilaria immitis and Brugia pahangi. *Ann. Trop. Med. Parasit. 76*, 239–241.

Danksagung

Wir bedanken uns bei Prof. Dr. H. Zahner (Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) für die Versorgung mit dem infektiösen Stadium von *B. malayi* und die ständige Kooperation, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Wir bedanken uns auch bei B. Hoffmann (Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen), G. Brinkmann und G. Tillmann (beide Forschungsinstitut Borstel) für die ausgezeichnete technische Unterstützung, bei Dr. H. Loppnow (Forschungsinstitut Borstel) für die humanen dermalen Fibroblasten, Dr. W.-M. Becker (Forschungsinstitut Borstel) für die lymphatischen Zellinien und Dr. W. Gräßmann (Deutsches Rotes Kreuz Lütjensee) für die Humanseren.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Ha 1590/2-1) gefördert.

Korrespondenzadresse
Franco H. Falcone
Forschungsinstitut Borstel
Parkallee 22
D-23845 Borstel