

Aus dem Institut für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekularer Nachweis von *Wolbachia* in  
*Mansonella perstans* in Gabun, Zentralafrika

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Christian Gehringer  
aus Bad Säckingen

Datum der Promotion: 11.12.2015

## INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	3
Abstract .....	5
Eidesstattliche Versicherung.....	7
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation .....	8
Auszug aus der Journal Summary List.....	9
Publikation: J Infect Dis. (2014) 210 (10): 1633-1638 .....	10
Supplementary tables.....	16
Lebenslauf.....	21
Publikationsliste .....	22
Danksagung/Acknowledgments/Remerciements.....	23

## ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Präsenz intrazellulärer *Wolbachia* in Mikrofilarien von *Mansonella perstans* in Gabun.

Die in vielen humanpathogenen Filarien lebenden Bakterien der Art *Wolbachia* (*W. pipentis*, Alpha 2 Proteobakterien, Ordnung der Rickettsiales) stellen durch den obligaten Charakter ihrer Wirt-Gast-Beziehung einen geeigneten Angriffspunkt für eine Behandlung von Filariosen dar. Ein spezifischer Therapieansatz, etwa mit intrazellulär wirkenden Antibiotika, ist besonders wünschenswert, da die medikamentöse Behandlung mit klassischen Anthelminthika wie Diethylcarbamazin oder Ivermectin insbesondere bei Infektion durch die hier untersuchte Art *M. perstans* kaum Wirkung zeigt. Trotz der äußerst milden Symptomatik der Infektion durch *M. perstans* ist in diesem Zusammenhang hervorzuheben, dass das Verbreitungsgebiet in Afrika und in Süd- und Mittelamerika geschätzt mehr als 100 Millionen Infizierte umfasst.

In *M. perstans* aus Westafrika wurde im Rahmen früherer Studien die Präsenz von *Wolbachia* beschrieben und als Konsequenz diese Filariose in Mali bereits erfolgreich mit Tetracyklinen behandelt. Bei Untersuchungen in Zentralafrika wurden hingegen keine *Wolbachia* in *M. perstans* gefunden. Folglich stellte sich die Frage, ob die neue antibiotische Therapiemöglichkeit auf endemische Gebiete außerhalb Westafrikas ausgeweitet werden kann.

Durch molekularbiologische Methoden konnten in der vorliegenden Arbeit nun erstmalig auch in *M. perstans* aus Zentralafrika (Gabun) intrazelluläre *Wolbachia* nachgewiesen werden. Vergleichende phylogenetische Analysen der gewonnenen bakteriellen DNS-Sequenzen ermöglichten eine gleiche Gruppenzuordnung innerhalb der *Wolbachia* („Supergroup F“) wie zuvor auch für *Wolbachia* aus anderen *M. perstans* beschrieben.

Je nach verwendetem PCR-Primer gelang der Positiv-Nachweis zu 50 % (in 7 von 14 Fällen für 16S rDNS) bzw. zu etwa 35 % (in 5 von 14 Fällen für *ftsZ*). Die Korrelation des negativen Nachweises von *Wolbachia* mit Proben niedriger Mikrofilariämie legt als mögliche Ursache ein Sensitivitätsproblem nahe. Dies könnte sowohl eine Erklärung für die zuvor beschriebenen negativen Funde in diesem Gebiet als auch ein Hinweis auf eine generell niedrige Dichte an *Wolbachia* in *M. perstans* sein. Jedoch lässt sich durch unsere Daten nicht ausschließen, dass *M. perstans* teilweise oder in gewissen Entwicklungsstufen keine *Wolbachia* besitzt. In der

ebenfalls in Gabun vorkommenden humanpathogenen Nematode *Loa loa* konnten in den vorliegenden Experimenten und in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur keine *Wolbachia* nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht exemplarisch die Möglichkeit eines *Wolbachia*-unabhängigen Wachstums von Filarien.

Eine Antibiotikatherapie der Infektion mit *M. perstans* erscheint aus der Perspektive dieser Arbeit auch in Zentralafrika erfolgsversprechend, doch sind weitere, idealerweise quantitative Charakterisierungen der *Wolbachia*-*M. perstans*-Interaktion sowie klinische Studien wünschenswert, bevor die Antibiotikabehandlung generell empfohlen werden kann.

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to clarify whether intracellular *Wolbachia* exist in microfilaria of *Mansonella perstans* in Gabon.

Many filaria pathogenic to humans host bacteria of the genus of *Wolbachia* (*W. pipentis*, alpha 2 proteobacteria, order of Rickettsiales). The obligatory character of the host-guest interaction makes the bacteria a suitable target for the treatment of filariasis, e.g. with antibiotics that effectively penetrate cell membranes. Such a specific therapy is highly desirable since classical antihelminthic drugs like diethylcarbamazine and ivermectin have been associated with little efficacy, especially in treating *M. perstans*, the species this study focusses on. Despite the mild symptoms of this filariasis, the estimated number of over 100 million infected people in endemic areas in Africa and tropical regions of Latin America draws attention to this disease.

*Wolbachia* have been described to be present in *M. perstans* of West Africa, and as a consequence, this filariasis has been successfully treated with tetracyclines in Mali. However, previous studies in Central Africa did not find any *Wolbachia* in *M. perstans*. These conflicting findings lead to the question of whether the new treatment option with antibiotics can be extended to other endemic areas outside of West Africa.

This study used molecular methods to show first-time evidence of the presence of intracellular *Wolbachia* in *M. perstans* in Central Africa (Gabon). Comparative phylogenetic analyses of the obtained DNA sequences allowed the allocation to the same group of *Wolbachia* (supergroup F) as it has been previously described for other *Wolbachia* of *M. perstans*.

Depending on the used primer sets, DNA of *Wolbachia* could only be detected in 50 % (in 7 out of 14 cases for 16S rDNA) and in about 35 % (in 5 out of 14 cases for *ftsZ*), respectively. The correlation of negative results with samples of low microfilaremia indicates a possible limit of detection of the molecular tools used. This could also have been the reason for the previously reported negative findings in this area and points to a generally low number of *Wolbachia* in *M. perstans*. Our data, however, does not exclude the possibility that *M. perstans* without *Wolbachia* exist. Our experiments confirm the results of the present literature that the nematode *Loa loa*, pathogenic to humans and also occurring in Gabon, does not harbor *Wolbachia* and thereby exemplifies the possibility of *Wolbachia*-independent growth of filaria.

Antibiotic treatment regimens for *M. perstans* infections in Central Africa are likely to be successful based on the results of this study. Further research, ideally quantitative analyses of the interactions between *Wolbachia* and *M. perstans*, as well as clinical studies seem desirable before treatment with antibiotics can be generally recommended.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Christian Gehringer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Molekularer Nachweis von *Wolbachia* in *Mansonella perstans* in Gabun, Zentralafrika“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§ 156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

## AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION

Autoren Christian Gehringer, Andrea Kreidenweiss, Arnaud Flamen, Justin S. Antony, Martin P. Grobusch und Sabine B elard

Titel Molecular Evidence of *Wolbachia* Endosymbiosis in *Mansonella perstans* in Gabon, Central Africa

Erschienen als Major Article in *The Journal of Infectious Diseases*, 2014

### Beitrag im Einzelnen

- 1) Planung der Experimente
- 2) Einwerben von F ordermitteln (Reisestipendium PROMOS/DAAD)
- 3) Probengewinnung in den Provinzen Moyen Ogoou e und Ngouni e, Gabun
- 4) Mikroskopische und molekulare Aufarbeitung der Proben
- 5) Untersuchung der Proben mittels PCR und anschließende Sequenzierung
- 6) Auswertung und Dokumentation der Experimente
- 7) Erstellen des Manuskripts und Mitarbeit am gesamten Publikationsprozess

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---



# AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>

Journal Citation Reports®

WELCOME HELP

2013 JCR Science Edition

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories INFECTIOUS DISEASES** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 72)

Navigation icons: Home, Previous, 1, 2, 3, 4, Next, End

Page 1 of 4

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data <sup>(j)</sup>						Eigenfactor <sup>®</sup> Metrics <sup>(j)</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">LANCET INFECT DIS</a>	1473-3099	11710	19.446	18.279	6.845	84	4.9	0.04021	7.097
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">CLIN INFECT DIS</a>	1058-4838	49629	9.416	9.177	2.905	431	6.6	0.12859	3.315
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">EMERG INFECT DIS</a>	1080-6040	24364	7.327	6.855	1.695	311	5.9	0.06390	2.234
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">AIDS</a>	0269-9370	22630	6.557	6.102	1.236	347	6.7	0.05746	2.174
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">J INFECT DIS</a>	0022-1899	44428	5.778	6.020	2.019	480	8.4	0.09746	2.250
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">J ANTIMICROB CHEMOTH</a>	0305-7453	22414	5.439	4.946	1.492	423	6.0	0.05549	1.548
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">CLIN MICROBIOL INFEC</a>	1198-743X	10150	5.197	4.724	1.304	250	4.1	0.03641	1.557
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">CURR OPIN INFECT DIS</a>	0951-7375	3336	5.034	4.813	0.768	82	5.0	0.01138	1.635
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">EUROSURVEILLANCE</a>	1560-7917	5861	4.659		2.443	201	3.6	0.02325	
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">JAIDS-J ACQ IMM DEF</a>	1525-4135	13595	4.394	4.539	1.049	325	6.0	0.03852	1.636
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">CURR OPIN HIV AIDS</a>	1746-630X	1619	4.392	3.685	1.500	72	3.1	0.00874	1.344
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">INT J ANTIMICROB AG</a>	0924-8579	7852	4.259	4.141	0.746	193	5.2	0.02118	1.211
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">J INT AIDS SOC</a>	1758-2652	979	4.207		0.447	76	2.9	0.00563	
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">INFECT IMMUN</a>	0019-9567	50046	4.156	4.096	0.900	458	>10.0	0.05987	1.327

<http://isiknowledge.com/jcr>, abgerufen am 2. November 2014

PUBLIKATION: J INFECT DIS. (2014) 210 (10): 1633-1638

<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu320>

SUPPLEMENTARY TABLES

<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu320>

## LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## PUBLIKATIONSLISTE

Gehring, C., et al. (2014). "Molecular Evidence of *Wolbachia* Endosymbiosis in *Mansonella perstans* in Gabon, Central Africa." *The Journal of Infectious Diseases* **210**(10): 1633-1638.

## DANKSAGUNG/ACKNOWLEDGMENTS/REMERCIEMENTS

Ich möchte mich herzlich bei Frau Prof. Gundel Harms für die freundliche Unterstützung dieser Dissertation bedanken. Diese wäre nicht entstanden ohne ihr frühes Mitwirken bereits in der Planungsphase (Stipendiums Antrag), ihre Mitarbeit und die inspirierenden Vorlesungen und Seminare des Instituts für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit der Medizinischen Fakultät Charité.

Von Anfang an haben mich die Begeisterung und die aufbauende Motivation von Herrn Prof. Martin Grobusch durch das gesamte Projekt getragen. Weil es ohne seine Förderung nicht denkbar gewesen wäre, gilt ihm deshalb mein ganz besonderer Dank. Seine große Erfahrung durch eigene Untersuchungen auch, aber nicht nur auf dem Gebiet dieser Promotion, und insbesondere die kritische Begleitung aller Experimente mit guten Ideen und weiterführenden Überlegungen haben in hohem Maße zu den fruchtbaren Ergebnissen dieses Projekts beigetragen.

Mein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Peter Kremsner insbesondere für die zuvorkommende Unterstützung dieses Projekts. Erst seine freundliche Bereitstellung der einzigartigen Infrastruktur in Lambaréné und Tübingen mit dem dort stets vorhandenen bereichernden wissenschaftlichen Austausch haben dieses Projekt ermöglicht.

Frau Dr. Sabine Bélar, Forscherin und Initiatorin dieses Projekts danke ich dafür, dass sie mir die Mitarbeit an diesem unglaublich spannenden und vielseitigen Vorhaben ermöglichte. Für das entgegengebrachte Vertrauen, die ununterbrochene gemeinsame Arbeit, für die vielen unbezahlbaren Erfahrungen, die ich persönlich und wissenschaftlich in dieser Zeit machen durfte, und für die beispiellose Betreuung bin ich ihr sehr dankbar.

Auch möchte ich Frau Dr. Andrea Kreidenweiß für die Unterstützung bei den ergänzenden Experimenten in Tübingen danken. Erst der gemeinsame Austausch und die kritische Analyse gepaart mit dem freundlichen Arbeitsklima schufen die Voraussetzungen für die Erreichung dieses Ziels. Ebenso danke ich allen Mitarbeitern in Tübingen, insbesondere auch den bereits in der Publikation erwähnten.

Meinen Freunden möchte ich in diesem Zusammenhang insbesondere für die erfolgreiche filarienferne Inspiration danken, dabei namentlich Thomas Derungs, der mich mit vielen guten Einfällen vertrauensvoll unterstützte.

Many thanks to all people supporting this project in Gabon and Germany.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à cette étude. Merci aussi à Arnaud Flamen, pour être un compagnon fiable au cours de ce projet et particulièrement en route pour les prélèvements.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder Daniel und Daniela.