

**Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung eines Cysteinproteasen-
Inhibitors der humanpathogenen Filarie Onchocerca volvulus**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Annett Schönemeyer
17.08.1970 in Teterow

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Hans Meyer

Dekan der Fakultät
Prof. Dr. B. Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. Richard Lucius
2. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
3. Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt

eingereicht am: 27.07.2000
Datum der Promotion: 12.12.2000

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Arbeit unterstützt haben und die dazu beigetragen haben, daß ich mich mit viel Freude an die Zeit am Institut für Molekulare Parasitologie erinnern werde.

Susanne danke ich für die liebe und tolerante Betreuung und fortwährende Unterstützung der Arbeit, für die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen und für ihren unermüdlichen Ansporn.

Herrn Prof. Lucius danke ich für den Zuspruch und für die freundliche Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Hiepe danke ich für sein stetiges Interesse an meiner Arbeit und seine vielen hilfreichen Ratschläge.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts und insbesondere meinen fleißigen Blutspendern Bettina, Karin, Grit, Rainer, Nicole, Chris, Xenia, Jenny, Bernd, Antje, Christiane, Jakobus, Oliver, Peter, Herrn Bleiß und Frau Marko.

Robert aus der Charité danke ich für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit, für die vielen hilfreichen Anregungen und für die unendliche Geduld, Fragen zu beantworten.

Herrn Dr. Norbert Brattig vom Bernhard-Nocht Institut Hamburg danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und für die Bereitstellung von *O. volvulus* Untersuchungsmaterial.

Herrn Dr. Schilling vom Universitätsklinikum Jena danke ich für die geduldige Hilfe bei der Durchführung der enzymkinetischen Messungen.

Herrn Dr. Wolfgang Kössler vom Institut für Informatik danke ich für die freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ich danke meiner lieben Familie und meinen Freunden.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ZUSAMMENFASSUNG.....	III
1	EINLEITUNG..... 1
1.1	Einführung..... 1
1.2	<i>O. volvulus</i> und die Onchozerkose..... 2
1.2.1	Lebenszyklus..... 2
1.2.2	Klinische Manifestation einer <i>O. volvulus</i> -Infektion..... 3
1.2.3	Charakterisierung des Immunstatus infizierter Personen..... 5
1.3	Charakterisierung humaner Cysteinproteasen..... 6
1.4	Charakterisierung der Superfamilie der Cysteinproteasen-Inhibitoren (Cystatine)..... 8
1.4.1	Klassifizierung..... 8
1.4.2	Inhibitionsmodell einer papainähnlichen Cysteinprotease durch einen Typ 2-Inhibitor..... 9
1.5	Charakterisierung von Onchocystatin..... 9
1.6	Immunmodulation durch Helminthenproteine und -produkte..... 11
2	ZIELE DER ARBEIT..... 13
3	ERGEBNISSE..... 14
3.1	Herstellung und funktionelle Charakterisierung von rekombinanten <i>O. volvulus</i> Proteinen..... 14
3.1.1	Klonierung und prokaryotische Expression rekombinanter <i>O. volvulus</i> Proteine..... 14
3.1.1.1	Klonierung und Expression eines „full length“ <i>O. volvulus</i> Cystatins (rOv17)..... 14
3.1.1.2	Klonierung und Expression eines verkürzten <i>O. volvulus</i> Cystatins (trOv17)..... 15
3.1.1.3	Klonierung und Expression eines <i>O. volvulus</i> Kontrollproteins (rOv33)..... 16
3.1.2	Sequenzanalyse von rOv17 und trOv17..... 18
3.1.2.1	Sequenzierung der klonierten DNA von rOv17 und trOv17..... 18
3.1.2.2	Aminosäuresequenzvergleich von rOv17, trOv17 und Onchocystatin..... 19
3.1.3	Funktionelle Charakterisierung von rOv17 und trOv17..... 20
3.1.3.1	Charakterisierung des inhibitorischen Potentials von rOv17 und trOv17..... 20
3.1.3.1.1	Titration der aktiven Zentren von humanem Cathepsin B, L und S..... 20
3.1.3.1.2	Sekundärtitration von rOv17 mit humanem Cathepsin L..... 21
3.1.3.1.3	Bestimmung der K_M -Werte von Cathepsin L und B..... 21
3.1.3.1.4	Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i 22
3.1.4	Quantifizierung des LPS-Gehaltes der rekombinant hergestellten <i>O. volvulus</i> Proteine..... 29
3.2	Bestimmung der Konzentration von Onchocystatin im Kulturüberstand von <i>O. volvulus</i> Weibchen.... 29
3.3	Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung der rekombinanten <i>O. volvulus</i> Cystatine..... 30
3.3.1	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die antigenspezifische Proliferation..... 30
3.3.1.1	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die PPD-stimulierte Proliferation humaner PBMC..... 30
3.3.1.2	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die <i>O. volvulus</i> -antigenspezifische Proliferation von Milzzellen immunisierter BALB/c Mäuse..... 31
3.3.2	Einfluß von EwC und E64 auf die PPD-stimulierte Proliferation humaner PBMC..... 32

3.3.3	Einfluß der rekombinanten <i>O. volvulus</i> Cystatine auf die polyklonal-stimulierte Proliferation von humanen PBMC	33
3.3.3.1	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die PHA-stimulierte Proliferation von humanen PBMC.....	33
3.3.3.2	Proliferation von PHA-stimulierten PBMC in Anwesenheit von rOv17 und einem anti-rOv17 Kaninchenserum	35
3.3.3.3	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die anti-CD3 Ak-stimulierte Proliferation humaner PBMC.....	36
3.3.4	Bestimmung der Zielzelle(n) von rOv17	37
3.3.4.1	Charakterisierung der Bindung und Aufnahme von rOv17 und trOv17 durch Immunzellen.....	37
3.3.4.2	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die PHA-stimulierte Proliferation humaner, Monozyten-depletierter PBMC.....	39
3.3.5	Zytokinproduktion von humanen PBMC in Anwesenheit der rekombinanten <i>O. volvulus</i> Cystatine....	41
3.3.5.1	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Zytokinproduktion unstimulierter humaner PBMC	41
3.3.5.2	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Zytokinproduktion von stimulierten humanen PBMC	43
3.3.6	Einfluß der rekombinanten <i>O. volvulus</i> Cystatine auf die Expression von Oberflächenmolekülen humaner Monozyten	45
3.3.6.1	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die HLA-DR-Expression	45
3.3.6.2	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Expression kostimulatorischer Moleküle.....	46
3.3.7	Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung der durch rOv17 und trOv17 induzierten verstärkten IL-10 Produktion durch Neutralisations-studien mit anti-IL-10 Ak.....	48
3.3.7.1	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die HLA-DR-Expression humaner Monozyten nach Neutralisation von IL-10.....	48
3.3.7.2	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Expression kostimulatorischer Moleküle humaner Monozyten nach Neutralisation von IL-10	50
3.3.7.3	Zytokinproduktion von stimulierten humanen PBMC in Anwesenheit von rOv17, trOv17 und neutralisierenden anti-IL-10 Ak.....	54
3.3.7.4	Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die polyklonal-stimulierte Proliferation in Anwesenheit neutralisierender anti-IL-10 Ak	55
4	DISKUSSION	56
4.1	Immunmodulierende Eigenschaften der rekombinanten <i>O. volvulus</i> Cystatine	56
4.1.1	Inhibition der antigenspezifischen Proliferation durch rOv17 und trOv17.....	56
4.1.2	Bindung und Aufnahme von rOv17 und trOv17 durch Monozyten.....	57
4.1.3	Inhibition der Aktivität von humanem Cathepsin L und S durch rOv17 und trOv17	58
4.1.4	Einfluß von EwC und E64 auf die antigenspezifische Proliferation.....	62
4.1.5	Inhibition der HLA-DR-Expression von humanen Monozyten durch rOv17 und trOv17	64
4.1.6	Polyklonal-stimulierte Proliferation von humanen PBMC und von Monozyten-depletierten PBMC....	66
4.1.7	Modulation der Zytokinproduktion durch rOv17 und trOv17	67
4.1.8	Inhibition der CD40- und CD86-Expression humaner PBMC durch rOv17 und trOv17	69
4.1.9	Neutralisationsstudien mit anti-IL-10 Ak	71
4.2	Charakterisierung des Kontrollproteins rOv33	80
4.3	Vergleichende Untersuchungen von rOv17, trOv17 und LPS	80
5	SCHLUßFOLGERUNG	83

6	MATERIAL UND METHODEN.....	84
6.1	Material	84
6.1.1	Laborgeräte.....	84
6.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	84
6.1.3	Reagenzien	85
6.1.4	Enzyme.....	85
6.1.5	Kommerzielle Kits	86
6.1.6	Primer	86
6.1.7	Agarosegel-Elektrophorese-Puffer.....	86
6.1.8	Puffer für Kleine Plasmidpräparation.....	86
6.1.9	Plasmide, cDNA und <i>E. coli</i> -Stämme	87
6.1.10	Bakterien-Kulturmedien.....	87
6.1.11	Antibiotika.....	87
6.1.12	Puffer für Löslichkeitstest.....	88
6.1.13	Puffer für die affinitätschromatographische Aufreinigung von rOv17, trOv17 und rOv33....	88
6.1.14	SDS-PAGE-Pufferlösungen.....	89
6.1.15	Puffer für Transfer und Western-Blot	90
6.1.16	Puffer für ELISA	90
6.1.17	Antikörper und Konjugate	90
6.1.18	Puffer und Lösungen für kinetische Messungen mit rOv17 und trOv17	91
6.1.19	Zellkultur-Medien.....	92
6.1.20	Adjuvans	92
6.1.21	Puffer für Durchflußzytometrie.....	92
6.1.22	Tiermaterial	92
6.2	Methoden.....	93
6.2.1.	Gewinnung von Parasitenmaterial	93
6.2.1.1	Herstellung von <i>O. volvulus</i> -Antigenextrakt.....	93
6.2.1.2	Gewinnung von Kulturüberstand weiblicher <i>O. volvulus</i> Würmer	93
6.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	94
6.2.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	94
6.2.2.2	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA.....	95
6.2.2.2.1	Isolation von DNA-Fragmenten.....	95
6.2.2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA.....	95
6.2.2.2.3	DNA Konzentrierung mittels Ethanolpräzipitation.....	96
6.2.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	96
6.2.2.4	Restriktionsverdau von Vektoren und DNA-Fragmenten	97
6.2.2.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	97
6.2.2.6	Ligation von DNA	98
6.2.2.7	Agarosegel-Elektrophorese.....	98
6.2.2.8	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	98
6.2.2.9	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien mit Plasmid-DNA.....	99
6.2.2.10	Identifizierung positiver Transformanten	99
6.2.2.10.1	Blau-Weiß-Screening	99
6.2.2.10.2	Plasmidpräparation und Restriktionsverdau	100

6.2.2.11	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	100
6.2.2.12	Langzeitlagerung von Bakterienstocks.....	100
6.2.2.13	Untersuchung des Löslichkeitsverhaltens von rOv17, trOv17 und rOv33.....	101
6.2.2.14	Affinitätschromatographische Aufreinigung von rOv17, trOv17 und rOv33.....	101
6.2.3	Biochemische Methoden.....	103
6.2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test.....	103
6.2.3.2	Präzipitation von Proteinen.....	103
6.2.3.2.1.	Acetonfällung.....	103
6.2.3.2.2	TCA-Fällung.....	103
6.2.3.3.	Funktionelle Charakterisierung von rOv17 und trOv17.....	104
6.2.3.3.1	Titration der aktiven Zentren von Papain und humanem Cathepsin B, L und S.....	104
6.2.3.3.2	Titration der wirksamen rOv17 Konzentration.....	104
6.2.3.3.3	Bestimmung der K_M -Werte für Cathepsin L und B.....	105
6.2.3.3.4	Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i von rOv17 und trOv17 für Papain und Cathepsin B, L und S.....	106
6.2.3.4	Fluoreszein-Markierung von rOv17, trOv17 und rOv33.....	106
6.2.4	Immunologische Methoden.....	107
6.2.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	107
6.2.4.2	Western Blot.....	107
6.2.4.3	Immunisierung von BALB/c Mäusen.....	108
6.2.4.4	ELISA.....	108
6.2.4.4.1	Zytokin-ELISA.....	108
6.2.4.4.2	ELISA zur Quantifizierung der Onchocystatin Ausscheidung durch <i>O. volvulus</i> Weibchen.....	109
6.2.4.5	FACS-Analyse zur Bestimmung der Zielzelle(n) von rOv17.....	109
6.2.4.6	Bestimmung der Expression von HLA-DR, CD40, CD80 und CD86 auf humanen Monozyten in Anwesenheit von rOv17 und trOv17.....	110
6.2.4.7	Präparation von Mausmilzzellen.....	111
6.2.4.8	Präparation von humanen PBMC.....	111
6.2.4.9	Depletion von CD14+-Zellen.....	111
6.2.4.10	PHA-Stimulation von humanen PBMC.....	112
6.2.4.11	Anti-CD3 Ak-Stimulation von humanen PBMC.....	113
6.2.4.12	Antigenspezifische Stimulation von humanen PBMC.....	113
6.2.4.13	Stimulation von CD14+-depletierten, humanen PBMC mit anti-CD3 Ak / anti-CD28 Ak und PHA..	114
6.2.4.14	Antigenspezifische Stimulation von Mausmilzzellen.....	114
6.2.4.15	Gewinnung von Zellkulturüberständen.....	114
6.2.4.16	Ernten ^3H -Thymidin markierter Zellen und Szintillationsmessung.....	114
6.2.4.17	LPS-Konzentrationsbestimmung.....	115
6.2.5	Statistische Auswertung.....	115
7	LITERATUR.....	116
	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	132
	LEBENS LAUF.....	134

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMC	Aminomethylcoumarin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
BCA	<i>2,2' Bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Dedeseoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	<i>Ethylenediamino-tetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene Glycol-bis-Tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E/S-Produkt	Exkretions-/Sekretionsprodukt
EtBr	Ethidiumbromid
EwC	Eiweißcystatin
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorter</i>
FCS	fetal calf serum
FE	Fluoreszenzeinheiten
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluos	5 (6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxy-succinimidester
³ H	Tritium
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
ICOS	<i>inducible co-stimulator</i>
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-Galaktopyranosid
Kb	Kilo-Basen
kD	Kilo-Dalton
Ki	Dissoziationskonstante
Km	Michaelis-Menten-Konstante
L1	Larve 1
L2	Larve 2
L3	Larve 3
LB	<i>Luria-Bertoni-Broth Medium</i>
li	<i>invariant chain</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
Mf	Mikrofilarien
MHC	<i>Major Histokompatibilitätskomplex</i>
MW	<i>molecular weight</i>
n.d.	nicht durchgeführt
NZ	Nitrozellulose
OD	optische Dichte

OvAg	<i>Onchocerca volvulus</i> -Antigen-Extrakt
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PE-Cy5	R-Phycoerythrincyanin 5
PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Penylmethylsulphonylfluorid
Pox	Peroxidase
r	<i>recombinant</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	trichloroacetic acid
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
tr	<i>truncated recombinant</i>
U	<i>unit</i>
VLE	<i>very low endotoxin</i>
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -Galaktosid

ZUSAMMENFASSUNG

Filarien persistieren bis zu 15 Jahren in ihren Wirten. Als eine Ursache dieser Persistenz diskutiert man die Fähigkeit der Filarien, die Immunantwort des Wirtes gezielt zu modulieren und eine zelluläre Hyporeaktivität zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein sezernierter Cysteinproteasen-Inhibitor (Onchocystatin) der humanpathogenen Filarie *Onchocerca volvulus* immunmodulierende Eigenschaften besitzt und an der Herausbildung eines hyporeaktiven Immunstatus des Wirtes beteiligt ist. Für die Untersuchungen wurde Onchocystatin als *full length* Molekül (rOv17) und als verkürztes Molekül (trOv17) rekombinant hergestellt. Das verkürzte trOv17 besitzt aufgrund des Fehlens des N-terminalen Bereiches eine verminderte proteaseinhibitorische Aktivität. Die *in vitro* Studien mit den rekombinant hergestellten *O. volvulus* Cystatinen verdeutlichen, daß rOv17 und auch trOv17 potente Immunmodulatoren sind, die sowohl die antigenspezifische als auch die polyklonal-stimulierte Proliferation von humanen PBMC inhibieren. Die zelluläre Hyporeaktivität ist dabei auf die Modulation von Monozytenfunktionen zurückzuführen. rOv17 und trOv17 modulieren die Antigenpräsentation, die Zytokinproduktion und die Expression kostimulatorischer Signale von humanen Monozyten. So konnte gezeigt werden, daß rOv17 und trOv17 die Aktivität von humanem Cathepsin L und S inhibieren und die Expression von HLA-DR, CD40 und CD86 vermindern. Die Modulation der Zytokinproduktion durch rOv17 und trOv17 ist durch eine verstärkte TNF- α und IL-10 Produktion und durch eine verminderte IL-12 Produktion charakterisiert. Desweiteren konnte in Neutralisationsstudien mit anti-IL-10 Ak gezeigt werden, daß die verminderte Expression von HLA-DR, CD40 und CD86 Folge der durch rOv17 und trOv17 induzierten verstärkten IL-10 Produktion ist. Im Gegensatz dazu bleibt die verminderte IL-12 Produktion und die verminderte polyklonal-stimulierte Proliferation humaner PBMC auch nach der Neutralisation von IL-10 bestehen. Die Studien mit den rekombinant hergestellten *O. volvulus* Cystatinen zeigen, daß rOv17 und trOv17 ihr immunologisches Umfeld auf vielfältige Art und Weise modulieren. Dabei spielt vermutlich die Inhibition der Aktivität einer Wirtscysteinprotease, aber auch ein von der Funktion als Cysteinproteasen-Inhibitor unabhängiger Mechanismus eine Rolle. Der Cysteinproteasen-Inhibitor der Filarie *O. volvulus* besitzt somit die Eigenschaft, die Immunantwort des Wirtes zu modifizieren, und ist vermutlich eine wesentliche Komponente, die dem Parasiten eine lange Persistenz im Wirt ermöglicht.

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Die humanpathogene Filarie *O. volvulus* ist der Erreger der Flußblindheit und in tropischen Gebieten Afrikas, Lateinamerikas und Südostasiens endemisch. Nach Schätzungen der WHO (1995) sind ca. 20 Millionen Menschen infiziert. Die Filarie lebt in der Unterhaut des Menschen und führt zu chronisch entzündlichen Veränderungen der Haut und bei 2% der Infizierten zur Erblindung. Die Folgen der Infektion sind somit nicht nur mit einer starken Einschränkung des Wohlbefindens verbunden, sondern stellen im Falle einer Erblindung auch ein ernstes soziales Problem für die Betroffenen dar. Die Strategien zur Bekämpfung der Onchozerkose haben zum einen die Unterbrechung des Infektionszyklus und zum anderen den Schutz exponierter Personen durch Impfungen zum Ziel. Umgesetzt wurden und werden diese Ziele durch eine großflächige Bekämpfung des Zwischenwirtes und Überträgers, der Kriebelmücke, und durch eine umfangreiche Chemotherapie infizierter Personen mit Ivermectin, einem Chemotherapeutikum, daß nur gegen das erste Larvenstadium nicht aber gegen adulte Filarien wirksam ist. Die Entwicklung von Impfstoffen war bislang, trotz intensiver Suche nach Parasitenproteinen als potentielle Impfstoffkandidaten, erfolglos.

Eine neue Strategie, die im Zusammenhang mit der chemotherapeutischen Kontrolle der Infektion verfolgt wird, ist eine antibiotische Therapie, die darauf abzielt, endosymbiontisch lebende Bakterien (Wolbachien) zu eliminieren, wodurch eine Sterilität der Filarien induziert wird (Hoerauf et al. 2000). Desweiteren erhofft man aus Studien, die das Phänomen der langen Persistenz des Parasiten im immunkompetenten Wirt untersuchen, neue Strategien für die Bekämpfung der Onchozerkose abzuleiten. Um in einem immunkompetenten Wirt zu überleben, müssen Filarien Mechanismen entwickelt haben, die es ihnen ermöglichen, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen oder diese zu modifizieren. Um in diesem Zusammenhang die Bedeutung eines sezernierten Cysteinproteasen-Inhibitors der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit das immunmodulierende Potential des rekombinant hergestellten Cysteinproteasen-Inhibitor untersucht. Neben der Charakterisierung der immunmodulierenden Eigenschaften des

Inhibitors, sollten die Studien darüber hinaus zeigen, ob die Inhibition der Aktivität einer Wirtscysteinprotease an diesem Prozeß beteiligt ist.

Der Cysteinproteasen-Inhibitor der humanpathogenen Filarie wurde erstmals von Lustigman et al. (1991, 1992) beschrieben und als Onchocystatin bezeichnet. Die Autoren postulieren eine regulierende Funktion des Onchocystatins bei der Häutung der Larven (Lustigman et al. 1996). Aufgrund folgender Untersuchungen und Überlegungen vermuteten wir, daß Onchocystatin neben physiologischen Funktionen im Stoffwechsel des Parasiten, auch immunmodulierende Eigenschaften besitzt: 1) Onchocystatin ist Bestandteil des Exkretions-/Sekretionsproduktes (E/S-Produkt), welches immunmodulatorisch wirksam ist. 2) Für die Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae* ist gezeigt worden, daß alle Parasitenstadien, also nicht nur sich häutende Stadien, den Inhibitor ausscheiden (Hartmann et al. 1997). 3) Für den Cysteinproteasen-Inhibitor der Nagetierfilarie *A. viteae* wurde eine immunmodulierende Wirkung gezeigt (Hartmann et al. 1997). 4) Klager et al. (1999) konnten für Onchocystatin eine immunmodulierende Wirkung im Zwischenwirt zeigen. 5) Katunuma et al. (1994), Vidard et al. (1991) und Maekawa et al. (1998) haben in ihren Studien immunmodulierende Eigenschaften von Cysteinproteasen-Inhibitoren charakterisiert.

1.2 *O. volvulus* und die Onchozerkose

1.2.1 Lebenszyklus

O. volvulus besitzt einen zweiwirtigen Entwicklungszyklus, wobei der Mensch der Endwirt und die Kriebelmücke (Familie Simuliidae) der Zwischenwirt ist (Abb. 1). Die Kriebelmücken übertragen bei der Blutmahlzeit die infektiösen Drittlarven (L3) auf den Menschen. In der Unterhaut des Menschen häuten sich die L3 zu L4, die sich im Laufe von 12 bis 24 Monaten zu adulten Filarien entwickeln. Die adulten Filarien leben v.a. in der Unterhaut, aber auch im muskulären Bindegewebe. Adulte Weibchen können 20 bis 70 cm und Männchen 3 bis 12 cm lang werden. Adulte Weibchen leben aufgeknäult in bindegewebigen Unterhautknoten, den Onchozerkomen. Männchen sind in der Unterhaut frei beweglich und können zur Kopulation die Weibchen in den Knoten aufsuchen. Weibchen scheiden pro Tag bis zu 1500 Mikrofilarien (Mf, Larve 1) aus, die in der Unterhaut frei

umherwandern und bei einer Blutmahlzeit von den Kriebelmücken aufgenommen werden. Im Zwischenwirt wandert die L1 in die Brustmuskulatur ein und entwickelt sich über zwei Häutungsstadien zur infektiösen L3. Die L3 wandern in die Mundwerkzeuge der Kriebelmücke ein und werden von hier beim Saugakt auf den Menschen übertragen. Kriebelmücken sind aufgrund ihrer Brutverhaltens an fließende Gewässer gebunden. Deshalb sind v.a. Bewohner von tropischen Flußlandschaften von der Onchozerkose betroffen.

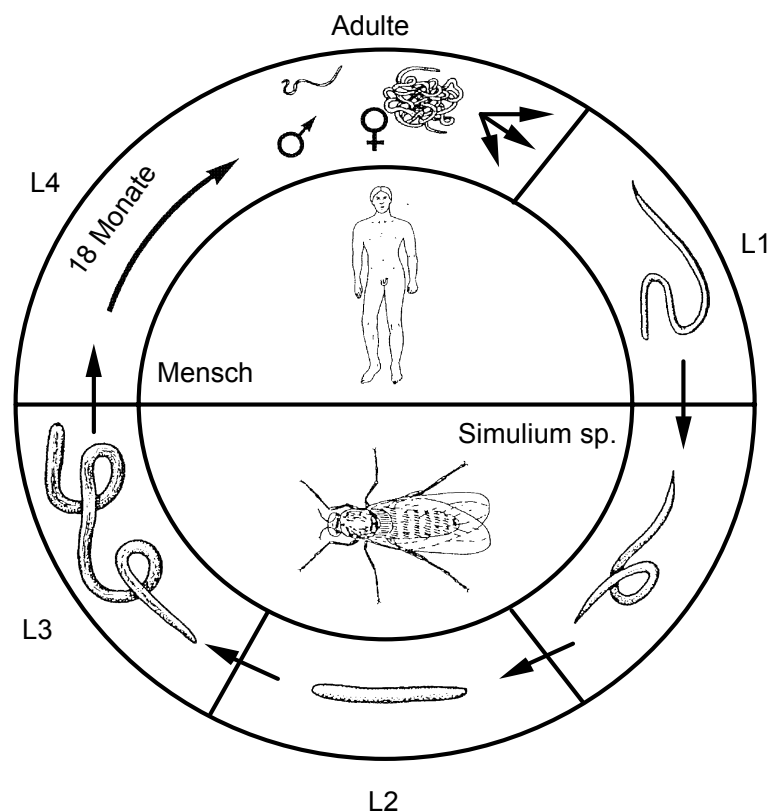


Abb. 1: Entwicklungszyklus der Filarie *O. volvulus*. (Quelle: Archiv des Lehrstuhls für Molekulare Parasitologie, Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin.)

1.2.2 Klinische Manifestation einer *O. volvulus*-Infektion

Eine Infektion mit *O. volvulus* führt zur Bildung von Onchozerkomen, sowie zu krankhaften Veränderungen der Haut und der Augen, wobei der Ausprägungsgrad dieser Veränderungen sehr vielfältig sein kann. Beobachtet werden milde Verläufe der Infektion ohne klinische Symptome, aber auch Infektionen mit klinischer Manifestation, die durch chronische Dermatitis und/oder Entzündungen der Augen gekennzeichnet sind. Kommt es zu einer klinischen Manifestation der Infektion, so können die krankhaften Veränderungen der Haut

generalisiert oder örtlich begrenzt auftreten. Charakteristisch für die generalisierte Form der Onchozerkose sind chronische, geringgradig entzündliche Veränderungen der Haut. Sie sind durch Atrophie, Elastizitätsverlust und durch Hyper- und Hypopigmentation gekennzeichnet. Bei längerem Infektionsverlauf kommt es häufig zur Hyperkeratose, Akanthose, Parakeratose und Pigmentschwund. Lymphknoten und Lymphgefäße der betroffenen Regionen sind durch chronische Lymphadenitiden verändert. Die selten vorkommende lokalisierte Form der Onchozerkose (Sowda, arabisch für schwarze Haut) ist durch örtlich begrenzte, starke entzündliche Veränderungen der Haut gekennzeichnet, die mit Pachydermie und Hyperpigmentation einhergeht (hyperreaktive Form). Die drainierenden Lymphknoten der betroffenen Körperregionen sind in der Regel vergrößert. Mit den Hautveränderungen beider Formen der Onchozerkose ist ein starker Juckreiz verbunden. 20-30 % der infizierten Personen zeigen entzündliche Veränderungen der Augen (u.a. sklerotisierende Keratitis). Die Folge dieser Veränderungen ist eine starke Beeinträchtigung des Sehvermögens bzw. die vollständige Erblindung der Betroffenen.

Die krankhaften Veränderungen infolge einer Infektion mit *O. volvulus* sind vor allem auf Abwehrreaktionen des Wirtes gegen absterbende Mikrofilarien (Mf, Larve 1) zurückzuführen (Mackenzie et al. 1985). Untersuchungen haben gezeigt, daß lebende Mf und Würmer durch Abwehrmechanismen des Wirtes nicht attackiert werden. Erst mit dem Absterben der Mf oder der Würmer werden die Parasiten von Immunzellen angegriffen. In infizierten Personen sterben täglich 10 000-20 000 Mf, in stark Infizierten bis zu 500 000 Mf (Duke 1993). Die dadurch ausgelösten Entzündungsreaktionen können zur klinischen Manifestation der Onchozerkose führen (Sowda bzw. papulöse Dermatitis der generalisierten Form).

Eine Infektion mit *O. volvulus* muß nicht in jedem Falle zu einer Manifestation der Infektion führen. In endemischen Gebieten gibt es Personen, die bei vergleichbarer Parasitenexposition keine Anzeichen einer parasitologischen und klinischen Manifestation zeigen (Gallin et al. 1988, Ward et al. 1988, Elson et al. 1994). Diese Personen werden als „vermeintlich immun“ bezeichnet.

1.2.3 Charakterisierung des Immunstatus infizierter Personen

Die Immunreaktion auf eine Infektion mit *O. volvulus* ist sowohl durch humorale als auch durch zelluläre Abwehrmechanismen charakterisiert. Die Stärke und Dominanz dieser Immunantworten ist jedoch unterschiedlich ausgeprägt. Der Immunstatus von Personen mit generalisierter Onchozerkose ist durch eine Typ 2- und Typ 3 Immunantwort gekennzeichnet (Doetze et al. 2000). Die immunologische Reaktionslage dieser Personen ist im Vergleich zu vermeintlich Immunen durch eine antigenspezifische zelluläre Hyporeaktivität, die u. a. durch die Wirkung von IL-10 und TGF- β vermittelt wird, charakterisiert (Doetze et al. 2000). Weiterhin ist sie durch eine verminderte IL-2 und IFN- γ Produktion und eine erhöhte Produktion von IL-13 gekennzeichnet. Auch die Bildung von IL-5 ist nachweisbar (Steel et al. 1993, McCarthy et al. 1994, Elson et al. 1995, Ottesen et al. 1995, Luder et al. 1996, Doetze et al. 2000). Die humorale Immunantwort zeichnet sich durch hohe Titer von antigenspezifischen IgG1, IgG4 und IgE aus. Bei der generalisierten Form der Onchozerkose wird die hohe Mf-Last der Infizierten mit der zellulären Hyporeaktivität in Zusammenhang gebracht.

Der Immunstatus von Personen mit einer lokalisierten, hyperreaktiven Onchozerkose ist im Vergleich zur generalisierten Form der Onchozerkose durch eine stärkere zelluläre Reaktivität, eine erhöhte Produktion von IL-2 und IL-5 und durch hohe Antikörperspiegel von IgG1, IgG3, IgG4 und IgE gekennzeichnet (Brattig et al. 1994). Die stark ausgeprägte Immunreaktion korreliert mit der niedrigen Mf-Last dieser Personen.

Im Vergleich zu infizierten Personen weisen vermeintlich Immune eine ausgeprägte zelluläre Reaktivität mit ausgeprägter IL-2, IL-5 und IFN- γ Produktion auf (Ward et al. 1988, Steel et al. 1993, Doetze et al. 2000). Die ursprüngliche Annahme, daß diese Gruppe durch eine Typ 1-Immunantwort gekennzeichnet ist, ist heute umstritten, da jüngste Studien vermuten lassen, daß IL-5 an der Ausbildung einer Immunität beteiligt ist (Steel et al. 1993, Elson et al. 1995, Brattig et al. 1997, Doetze et al. 1997, 2000). Vermeintlich Immune haben nur wenig parasitenantigenspezifische Antikörper (Dafa'alla et al. 1992, Brattig et al. 1994, Elson et al. 1994).

1.3 Charakterisierung humaner Cysteinproteasen

Cysteinproteasen sind proteolytische Enzyme, die aufgrund struktureller Unterschiede in mehr als 40 Familien (C1-C47) unterteilt werden (Rawlings und Barrett 1994). Die Cysteinproteasen des menschlichen Organismus können vier verschiedenen Cysteinproteasen-Familien zugeordnet werden, den Papainen (C1), den Calpainen (C2), den Legumainen (C13) und den Caspasen (C14).

Humane Cysteinproteasen, die der Papain-Superfamilie angehören, sind die in den Lysosomen lokalisierten Cathepsine. Zu ihnen gehören Cathepsin B, L, H, S, C, O, K, W, L2, F und X/Z. Sie sind wichtige Enzyme, die in den Zellen den Abbau und Umsatz von Proteinen katalysieren (Kirschke und Barrett 1987). Eine spezifische Funktion übernehmen lysosomale Cathepsine bei der Immunabwehr, indem sie in antigenpräsentierenden Zellen (APZ) die Generierung von Peptid-MHC-II-Komplexen vermitteln. Die Regulation der proteolytischen Aktivität der Cathepsine erfolgt über verschiedenen Mechanismen. So werden Cathepsine zunächst als inaktive Zymogene gebildet, die eine Proregion besitzen, die als Inhibitor fungiert und die Aktivität der Cathepsine bis zum Erreichen des Zielkompartiments (Lysosomen) kontrolliert (Cygler und Mort 1997). Erst nach Erreichen des Zielkompartiments erfolgt eine Abspaltung der Proregion und dadurch die Aktivierung der Protease (Rozmann et al. 1999). Nach Aktivierung der Cathepsine wird deren Aktivität im weiteren über den pH, über posttranslationale Modifikationen und über Proteolyse reguliert (Kirschke et al. 1995, Turk et al. 1993). Eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der Aktivität der Cathepsine besitzen zudem endogene Cysteinproteasen-Inhibitoren der Cystatin-Superfamilie (Abrahamson et al. 1994).

Calpaine sind Ca^{2+} -abhängige Cysteinproteasen, die im Zytosol der Zellen lokalisiert sind. Die Vertreter der Calpain-Superfamilie werden in die Klasse der typischen und die Klasse der atypischen Calpaine unterteilt (Suzuki und Sorimachi 1998). Die Vertreter, die zur Klasse der typischen Calpaine gehören, sind im menschlichen Organismus ubiquitär verbreitet. Atypische Calpaine werden hingegen gewebsspezifisch exprimiert (Sorimachi et al. 1997, Carafoli und Molinari 1998). Eine Besonderheit der Calpaine besteht darin, daß ihre Aktivierung und Aktivität streng Ca^{2+} -abhängig ist. Desweiteren induzieren Calpaine nur eine begrenzte Proteolyse, so daß vermutet wird, daß Calpaine Biomodulatoren sind, deren Funktion eine

Modifizierung des entsprechenden Substrates und nicht deren vollständige Proteolyse ist. Substrate, die von Calpainen modifiziert werden, sind a) Proenzyme, wie Kinasen, Phosphatasen und Proteinasen; b) Zytoskelettproteine; c) Membranproteine; d) Transkriptionsfaktoren; e) Zytokine und f) Komponenten der extrazellulären Matrix (Menard und El-Amine 1996). Die Aktivität der Calpaine wird durch einen endogenen Inhibitor, Calpastatin, reguliert. Calpastatin ist ein spezifischer Inhibitor, der keine strukturellen Gemeinsamkeiten mit den Cysteinproteasen-Inhibitoren der Superfamilie der Cystatine besitzt (Emori et al. 1987).

Legumaine sind Cysteinproteasen, die wie Cathepsine lysosomal lokalisiert sind (Chen et al. 1997, 1998). Legumaine sind Asparaginy-Endopeptidasen, die spezifisch die C-terminal vom Asparagin befindliche Peptidbindung hydrolysieren und dadurch nur eine begrenzte Proteolyse von Proteinen bewirken (Dando et al. 1999). Erste Untersuchungen zur Funktion von Legumain haben gezeigt, daß Legumain an der Prozessierung von Antigen beteiligt ist (Manoury et al. 1998). Die Regulation der Aktivität der Legumaine erfolgt ebenfalls durch endogene Inhibitoren. So konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der Legumaine durch Cystatin C, F und E/M (Typ 2-Inhibitoren der Cystatin-Superfamilie) inhibiert wird (Alvarez-Fernandez et al. 1999).

Caspasen sind Aspartat-spezifische Cysteinproteasen, die im Zytosol der Zellen lokalisiert sind. Caspasen werden als Proenzyme synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Bislang sind 11 verschiedene humane Caspasen beschrieben worden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen biologischen Funktion in drei Gruppen unterteilt werden können. So sind Caspasen 1) entscheidend an der Induktion und Vermittlung des programmierten Zelltods (Apoptose) beteiligt, 2) vermitteln Caspasen die Aktivierung von Zytokinen und 3) sind Caspasen an der T-Zell-Aktivierung beteiligt (Denis et al. 1998, Alam et al. 1999, Elkon 1999). Die Aktivität der Caspasen wird durch endogene Inhibitoren, wie XIAP, c-IAP1, c-IAP2 und Survivin reguliert (Deveraux et al. 1997, 1999; Roy et al. 1997, Tamm et al. 1998).

1.4 Charakterisierung der Superfamilie der Cysteinproteasen-Inhibitoren (Cystatine)

1.4.1 Klassifizierung

Die Superfamilie der Cysteinproteasen-Inhibitoren besteht aus evolutionär verwandten Proteinen. Die Vertreter dieser Cystatin-Superfamilie sind fest-, aber reversibel-bindende Inhibitoren von Cysteinproteasen der Papain-Superfamilie (Nicklin und Barrett 1984). Aufgrund von Strukturunterschieden werden die Vertreter der Cystatin-Superfamilie in 3 Klassen unterteilt, in die Stefine, Cystatine und Kininogene (Barrett et al. 1986). In der ersten Klasse, den Stefinen, werden alle Inhibitoren zusammengefaßt, die ca. 11 kD groß sind, keine Signalsequenz besitzen, keine Disulfidbrücken ausbilden und nicht glykosiliert sind. Zu dieser Gruppe gehören u. a. die humanen Cystatine A und B. Typ 1-Inhibitoren sind v.a. intrazellulär lokalisiert. Die Cysteinproteasen-Inhibitoren der zweiten Klasse, die Cystatine, sind 13-14 kD groß, besitzen eine Signalsequenz und bilden am C-Terminus 2 intramolekulare Disulfidbrückenbindungen aus. Vertreter sind das Eiweißcystatin, humanes Cystatin C, D, S, SN, SA, sowie Cystatine anderer Spezies. Zu dieser Klasse gehören auch humanes Cystatin E/M und F, die einige Besonderheiten aufweisen. Die Cystatine E/M und F sind glykosiliert und Cystatin F besitzt am N-Terminus eine weitere Disulfidbrücke (Ni et al. 1997, 1998, Sotiropoulou et al. 1997, Halfon et al. 1998). Typ 2-Inhibitoren sind v.a. extrazellulär lokalisiert. In der dritten Klasse, den Kininogenen, sind Cysteinproteasen-Inhibitoren zusammengefaßt, deren Aminosäuresequenz aus drei Kopien der Typ 2-Cystatine besteht. Das C-terminale Ende wird durch eine kurze, bradikininähnliche Sequenz gebildet. Die Typ 3-Inhibitoren sind glykolisiert. Vertreter dieser Klasse sind die nieder- und höhermolekularen humanen Kininogene (68 kD, 114 kD). Kininogene werden in der Leber gebildet und sind in der Synovia und im Blutplasma enthalten.

1.4.2 Inhibitionsmodell einer papainähnlichen Cysteinprotease durch einen Typ 2-Inhibitor

Cystatine binden Cysteinproteasen fest, aber reversibel (Nicklin und Barrett 1984). Bei der Interaktion von Inhibitor und Protease sind insbesondere 3 Bereiche des Cystatins beteiligt, die hoch konserviert sind und die aktiven Domänen des Inhibitors darstellen. Der N-terminale aktive Bereich um die konservierte AS $-G^{11}-$ bildet mit den beiden C-terminalen, konservierten Bereichen $-^{55}QXVXG^{59}-$ und $-^{105}PW^{106}-$ (Die Numerierung entspricht der des humanen Cystatin C.) eine keilförmige Struktur, die die „V“-förmige Substrattasche der Protease blockiert (Hall et al. 1995). Die N-terminale aktive Domäne interagiert dabei direkt mit den Substratbindungstaschen S3, S2 und S1 der Protease und ist die wesentliche inhibitorische Komponente des Cystatins (Machleidt et al. 1989, Abrahamson et al. 1991, Lindahl et al. 1992, Hall et al. 1993, Bjork et al. 1995). Aber auch die zweite und dritte aktive Domäne beeinflussen die Affinität des Inhibitors zur Protease. In welchem Ausmaß dies erfolgt, ist von der jeweiligen Protease abhängig (Auerswald et al. 1995, Hall et al. 1995, Bjork et al. 1996).

1.5 Charakterisierung von Onhocystatin

Onhocystatin gehört aufgrund struktureller und funktioneller Gemeinsamkeiten zur zweiten Klasse der Überfamilie der Cysteinproteasen-Inhibitoren, den Cystatinen (Lustigman et al. 1992). Der offene Leserahmen von Onhocystatin kodiert für 162 AS, wobei die ersten 21 AS die Signalsequenz bilden. Das reife Protein umfaßt 141 AS und ist 15,5 kD groß. Ein Aminosäureabgleich mit humanen Typ 2-Cystatinen (Abb. 2) zeigt, daß die Sequenzen zu 17-22% identisch sind. Onhocystatin hat die wichtigsten strukturellen Merkmale mit den Cystatinen gemeinsam. Wie alle Typ 2-Cystatine hat Onhocystatin eine Signalsequenz, die für die Sekretion des Proteins verantwortlich ist. Onhocystatin besitzt auch die 3 charakteristischen aktiven Bereiche, die die hochkonservierten AS $-XXG^{53}-$, $-^{98}QXVXG^{102}-$ und $-^{153}PW^{154}-$ enthalten. Onhocystatin weist aber auch einige Besonderheiten auf. Besitzen die Typ 2-Cystatine 4 Cysteine in der Sequenz und bilden 2 Disulfidbrücken, so hat Onhocystatin nur 2 der 4 Cysteine in der Sequenz, und bildet nur 1 Disulfidbrücke aus. Eine

weitere Besonderheit in der Sequenz von Onchocystatin im Vergleich zu anderen Cystatinen ist der lange N-Terminus mit 29 AS vor der N-terminalen aktiven Domäne, der auch das größere MW von rOv17 bedingt (Abb. 2).

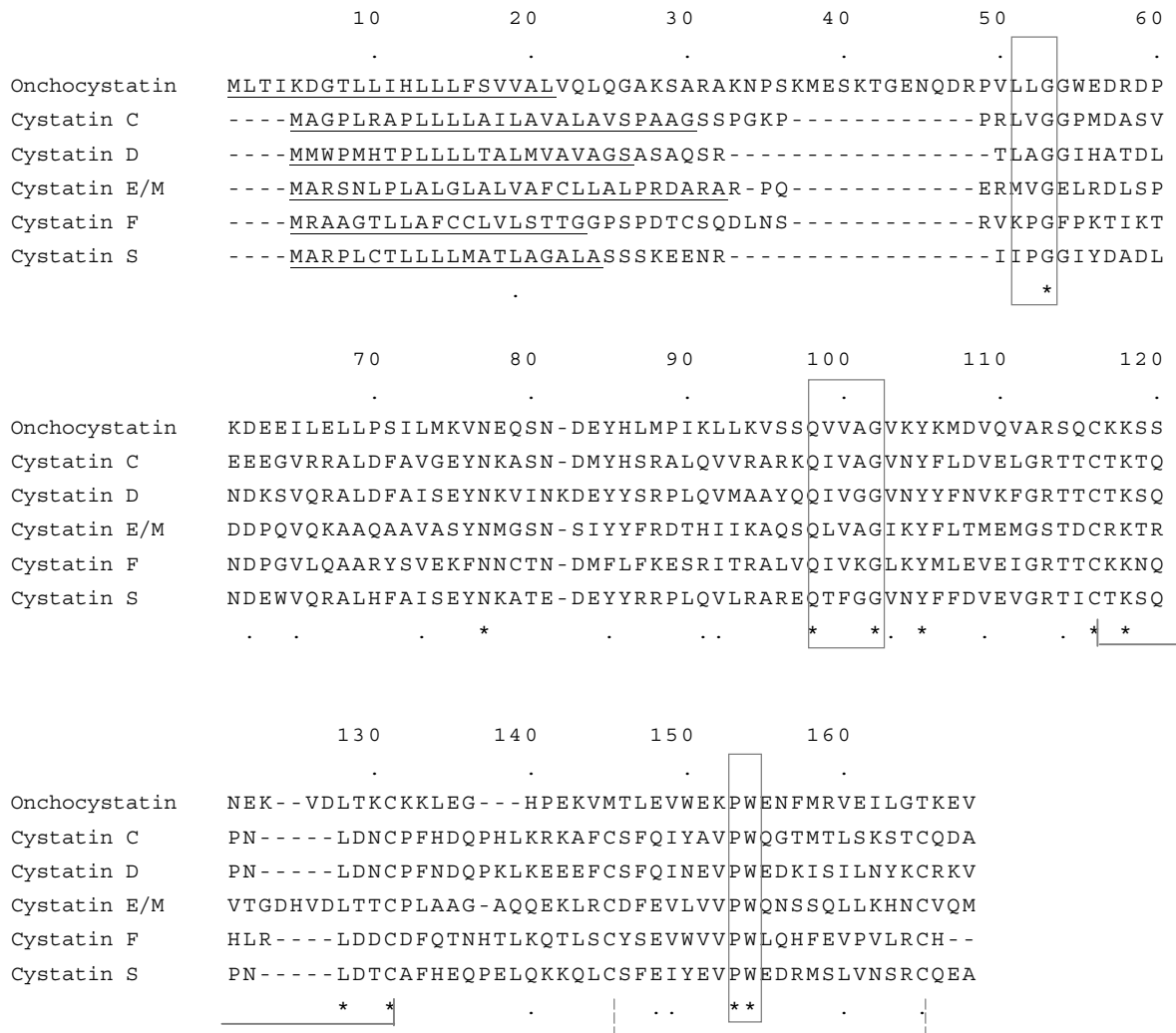


Abb. 2: Aminosäuresequenzvergleich von Onchocystatin und humanem Cystatin C, D, E/M, F und S. Die Numerierung bezieht sich auf die Sequenz von Onchocystatin. Übereinstimmung von Onchocystatin mit Cystatin C 18%, Cystatin D 22%, Cystatin E/M 18%, Cystatin F 17% und Cystatin S 21%. Bindestriche (-) stellen eingefügte Lücken dar, die einen optimalen Sequenzabgleich ermöglichen. Sterne (*) kennzeichnen identische AS. Punkte (.) markieren ähnliche AS. Kästchen markieren die aktiven, konservierten Bereiche. Unterstreichungen () kennzeichnen die Signalsequenzen. Die durch Linien verbundenen Cysteine stellen Disulfidbrücken dar. Die Cysteine, die durch eine durchgehende Linie verbunden sind, bilden eine Disulfidbrücke, die von allen dargestellten Cystatinen ausgebildet wird. Die gestrichelte Linie stellt eine Disulfidbrücke dar, die typischerweise von Typ 2-Cystatinen, nicht aber von Onchocystatin gebildet wird.

1.6 Immunmodulation durch Helminthenproteine und -produkte

Die gezielte Manipulation der Immunantwort des Wirtes durch Parasitenproteine oder -produkte ist ein bedeutender Immunevasionsmechanismus von Parasiten. Für Filarien und andere Helminthen sind in diesem Zusammenhang folgende Mechanismen beschrieben worden.

Filarien können zum einen die Immunantwort ihrer Wirte beeinflussen, indem sie Proteine ausscheiden, die Homologien zu humanen Zytokinen aufweisen und somit deren Funktion imitieren. Zum anderen exponieren Parasiten Proteine oder Parasitenprodukte, die direkt die Zytokinbildung und / oder Expression von Membranproteinen von Wirtszellen modulieren. Zu dieser Gruppe immunmodulierender Parasitenproteine oder -produkte gehören u. a. auch funktionelle Proteine, wie z. B. Proteaseinhibitoren, die vermutlich durch die Beeinflussung von enzymatischen Reaktionen in ihren Wirten eine immunmodulierende Wirkung vermitteln. Die Sekretion eines Zytokinhomologs, welches Homologien zum humanem migrationsinhibierenden Faktor (MIF) besitzt, ist für die Filarien *Brugia malayi*, *Wucheria bancrofti* und *O. volvulus* gezeigt worden (Pastrana et al. 1998). Das von den Filarien sezernierte MIF-Homolog wirkt sowohl migrationsinhibitorisch als auch chemotaktisch auf humane Monozyten, und moduliert so deren Migrationsverhalten.

Die tierpathogene Filarie *Dirofilaria immitis* sezerniert ein Protein, welches die CD23-Expression (*low affinity* IgE Fc-Rezeptor) auf T- und B-Zellen induziert, eine verstärkte IgE Synthese provoziert und T-Zellen zur Produktion von IL-3, IL-4, IL-5 und IL-6 stimuliert (Yamaoka et al. 1994). Die Nagetierfilarie *A. viteae* sezerniert ein 62 kD großes, Phosphorylcholin-assoziiertes Glykoprotein (ES-62), welches die B- und T-Zell-Aktivierung beeinflusst (Deehan et al. 1997, 1998). Dabei aktiviert ES-62 verschiedene Kinasen und Faktoren des Signaltransduktionsweges dieser Zellen, und induziert eine Desensibilisierung, so daß eine anschließende Aktivierung nicht mehr möglich ist. Die Autoren konnten zeigen, daß die eigentlich aktive Komponente von ES-62 das assoziierte Phosphorylcholin ist (Harnett et al. 1999). Auch die humanpathogene Filarie *B. malayi* induziert durch Phosphorylcholin-assoziierte Proteine eine Immunmodulation, die durch die Suppression der Mitogen-stimulierten Proliferation der PBMC infizierter und nichtinfizierter Personen charakterisiert ist (Lal et al. 1990).

Ein Serinproteasen-Inhibitor (Taeniastatin) des Bandwurms *Taenia taeniaeformis* inhibiert die antigenspezifische und Mitogen-stimulierte Proliferation von Ratten-Milzzellen und supprimiert deren IL-2 Produktion (Leid et al. 1986). *Ascaris suum*, der Schweinespulwurm, sezerniert einen Aspartylproteasen-Inhibitor (PI-3), der die Aktivität von Cathepsin E inhibiert, einer Protease, die an der Prozessierung von Antigen beteiligt ist (Bennett et al. 1992). Für die Nagetierfilarie *A. viteae* haben Hartmann et al. (1997) gezeigt, daß ein Cysteinproteasen-Inhibitor (Av17) die antigenspezifische und polyklonale Proliferation von Mausmilzzellen supprimiert und eine verstärkte IL-10 Produktion induziert.

Die angeführten Beispiele verdeutlichen, daß Helminthen durch verschiedene Strategien die komplexen Reaktionsabläufe einer Immunantwort beeinflussen können.

2 ZIELE DER ARBEIT

Filarieninfektionen sind durch die lange Persistenz der Erreger in ihren Wirten charakterisiert. Die Immunantwort von infizierten Personen ist dabei im allgemeinen durch eine zelluläre Hyporeaktivität und durch eine Typ 2- und Typ 3 Immunantwort gekennzeichnet. Dies bedeutet, daß Filarien über Mechanismen verfügen, die diese hyporeaktive immunologische Reaktionslage des Wirtes hervorrufen. Studien von Elkalifa et al. (1991) und Allen et al. (1998) haben gezeigt, daß E/S-Produkte der Filarien an der Entwicklung einer zellulären Hyporeaktivität beteiligt sind. Bislang sind jedoch einzelne Komponenten der E/S-Produkte nur wenig charakterisiert und auch Mechanismen sind weitgehend unbekannt. Studien mit einem sezernierten Cysteinproteasen-Inhibitor der Nagetierfilarie *A. viteae*, haben gezeigt, daß dieser die Proliferation von Mausmilzzellen inhibiert und die IL-10 Produktion hochreguliert (Hartmann et al. 1997).

Ziel dieser Arbeit war es, vergleichend zum Tiermodell, das immunmodulierende Potential eines Cysteinproteasen-Inhibitors der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* zu untersuchen. Neben der Charakterisierung der immunmodulierenden Eigenschaften des Inhibitors, sollten die Studien darüber hinaus zeigen, ob die Inhibition der Aktivität einer Wirtscysteinprotease an diesem Prozeß beteiligt ist.

3 ERGEBNISSE

3.1 Herstellung und funktionelle Charakterisierung von rekombinanten *O. volvulus* Proteinen

3.1.1 Klonierung und prokaryotische Expression rekombinanter *O. volvulus* Proteine

3.1.1.1 Klonierung und Expression eines „full length“ *O. volvulus* Cystatins (rOv17)

Die DNA des *O. volvulus* Cystatins wurde mittels PCR und spezifischer Primer aus einer *O. volvulus* L3 cDNA Bank (Dr. S. Williams, Northhampton, USA) amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt des *O. volvulus* Cystatins, welches ohne Signalsequenz amplifiziert wurde, umfaßt 423 bp. Zur Schaffung von EcoRI-Schnittstellen wurde das PCR-Produkt in einen T-Überhangsvektor (pGEM T Easy vector) subkloniert. Durch die Klonierung des EcoRI-geschnittenen Inserts in das Expressionsplasmid pET28b wurde ein rekombinantes *O. volvulus* Cystatin (rOv17) mit 6 His am N-Terminus exprimiert. Die Expression von rOv17 erfolgte in BL21(DE3) pLysS-*E. coli*. Das rekombinante *O. volvulus* Cystatin wird von 177 Aminosäuren (141 Aminosäuren *O. volvulus* Cystatin + 26 Aminosäuren des pET Vektors) kodiert und hat ein theoretisches MW von 19,5 kD. Nach Induktion durch IPTG wurde im SDS-PAGE eine Expressionsbande mit einem MW von 21 kD identifiziert (Abb. 3), die im anschließenden Western Blot von einem anti-*A. viteae* Cystatin Kaninchenserum erkannt wurde. rOv17 wurde mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie nativ aufgereinigt, mehrmals gegen PBS dialysiert und sterilfiltriert (Abb. 3).

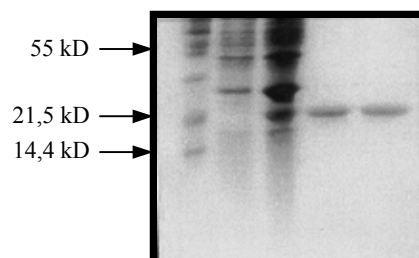


Abb. 3: Expression und Aufreinigung von rOv17. Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2: Bakterienkultur ohne Induktion, Spur 3: Bakterienkultur nach 3 h Induktion mit IPTG, Spur 4: eluierte rOv17 Fraktion, Spur 5: dialysierte und sterilfiltrierte rOv17 Fraktion.

3.1.1.2 Klonierung und Expression eines verkürzten *O. volvulus* Cystatins (trOv17)

Ein verkürztes *O. volvulus* Cystatin (trOv17), welches um den N-Terminus einschließlich des N-terminalen aktiven Bereich –LLG- verkürzt ist, wurde kloniert und in *E. coli* exprimiert, um ein *O. volvulus* Cystatin zu generieren, welches nicht oder nur noch begrenzt als Cysteinproteasen-Inhibitor aktiv ist. Die DNA des verkürzten *O. volvulus* Cystatin (kloniert in pMal) wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. J. Bradley (Salford University, Manchester, GB) zur Verfügung gestellt. Das Insert, welches für das verkürzte *O. volvulus* Cystatin kodiert, wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI aus dem pMal-Vektor isoliert und in den Sequenzierungsvektor pBlueskript umkloniert. Die Sequenzierung der rekombinanten Plasmide bestätigte, daß das verkürzte *O. volvulus* Cystatin unmittelbar hinter dem N-terminalen konservierten, aktiven Bereich mit der Aminosäure 55 (Trp) beginnt. Das EcoRI verdaute Insert wurde in das 6His-Expressionsplasmid pET28a kloniert. Das verkürzte rekombinante *O. volvulus* Cystatin wird von 145 Aminosäuren (109 AS *O. volvulus* Cystatin + 36 AS vom pET-Vektor) kodiert und hat ein theoretisches MW von 15,5 kD. Die Expression von trOv17 erfolgte in BL21(DE3)-*E. coli*. Nach Induktion der Expression durch IPTG wurde im SDS-PAGE eine Induktionsbande mit einem MW von 16 kD identifiziert (Abb. 4), die im Western Blot von einem anti-*A.viteae* Cystatin Kaninchenserum erkannt wurde. Das verkürzte *O. volvulus* Cystatin wurde unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt, gegen PBS dialysiert und sterilfiltriert.

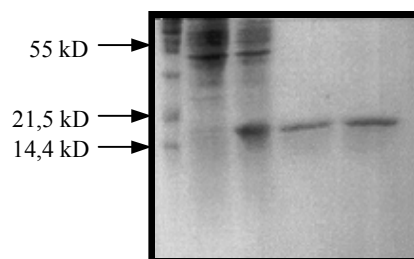


Abb. 4: Expression und Aufreinigung von trOv17. Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2: Bakterienkultur ohne Induktion, Spur 3: Bakterienkultur nach 3 h Induktion mit IPTG, Spur 4: eluierte trOv17 Fraktion, Spur 5: dialysierte und sterilfiltrierte trOv17 Fraktion.

3.1.1.3 Klonierung und Expression eines *O. volvulus* Kontrollproteins (rOv33)

Als Negativkontrolle für alle weiteren Untersuchungen wurde ein *O. volvulus* Protein (Ov33) kloniert und exprimiert, welches Ähnlichkeit mit der Familie der Aspartylproteasen-Inhibitoren aufweist (Lucius et al. 1988, Willenbacher et al. 1993). Die Ov33-cDNA wurde mittels PCR und spezifischen Primern aus dem rekombinanten Ov33-pGEX Plasmid amplifiziert. Die Primer waren so konstruiert, daß die Amplifikate eine SacI Restriktionsschnittstelle am 5'-Terminus und eine Sall-Restriktionsschnittstelle am 3'-Terminus erhielten. Das PCR-Produkt umfaßt 666 Basenpaare und kodiert für Ov33 ohne Signalsequenz. Das SacI und Sall verdaute PCR-Produkt wurde in das 6His-Expressionsplasmid pET28b kloniert. Das rekombinante Ov33 (rOv33) wird von 271 Aminosäuren (222 AS rOv33 + 49 AS pET-Vektor) kodiert und hat ein theoretisches MW von 30 kD. Die Expression von rOv33 erfolgte in BL21(DE3)-*E. coli* (Abb. 5). Nach Induktion wurde im SDS-PAGE eine Expressionsbande mit einem MW von 30 kD identifiziert, die im Western Blot durch den anti-rOv33 monoklonalen Maus-Antikörper IVA7 erkannt wurde. rOv33 wurde unter denaturierenden Bedingungen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb. 5). Die Dialyse erfolgte gegen Puffer mit absteigender Harnstoffkonzentration und abschließend mehrmals gegen PBS. Die gewonnenen rOv33 Fraktionen wurden sterilfiltriert.

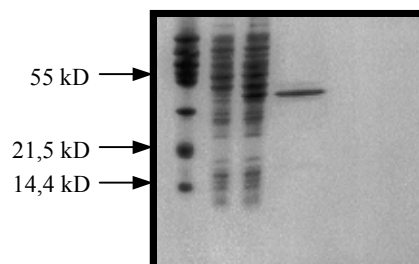


Abb. 5: Expression und Aufreinigung von rOv33. Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2: Bakterienkultur ohne Induktion, Spur 3: Bakterienkultur nach 3 h Induktion mit IPTG, Spur 4: dialysierte und sterilfiltrierte rOv33 Fraktion.

In Tab. 1 sind die wichtigsten Klonierungsdaten und Eigenschaften der 3 rekombinant hergestellten Proteine abschließend noch einmal zusammengefaßt.

Tab. 1: Übersicht über die Klonierungs- und Expressionsdaten von rOv17, trOv17 und rOv33

	rOv17	trOv17	rOv33
Template DNA	<i>O. volvulus</i> L3 cDNA Bank	trOv17-pMal	rOv33-pGex
Größe der DNA-Inserts	423 bp	ca. 600 bp (poly-T am 3'-Ende)	666 bp
Expressionsplasmid	pET28b	pET28a	pET28b
Transformierte <i>E. coli</i>	BL21(DE3)pLysS	BL21(DE3)	BL21(DE3)
Theoretisches MW	19,5 kD	15,5 kD	30 kD
Tatsächliches MW	21 kD	16 kD	33 kD

3.1.2 Sequenzanalyse von rOv17 und trOv17

3.1.2.1 Sequenzierung der klonierten DNA von rOv17 und trOv17

Zur Überprüfung der Nukleotidsequenz wurde die amplifizierte DNA von rOv17 und trOv17 nach der Methode von Sanger et al. (1977) von der Firma AGOWA (Berlin) sequenziert. Hierfür wurde die DNA über die EcoRI-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pBlueskript kloniert. Die Nukleotidsequenz ist in Abb. 6 dargestellt. Die Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des HUSAR 5.0-Programms basierend auf dem GCG-Programm (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) abgeleitet.

```

1  GTT CAG TTG CAA GGA GCC AAG TCT GCA AGA GCC AAA AAT CCG TCA AAA ATG GAG
1  Val Gln Leu Gln Gly Ala Lys Ser Ala Arg Ala Lys Asn Pro Ser Lys Met Glu

55 TCC AAA ACA GGC GAA AAT CAA GAT CGT CCC GTT TTA TTG GGA GGT TGG GAA GAT
19 Ser Lys Thr Gly Glu Asn Gln Asp Arg Pro Val Leu Leu Gly Gly Trp Glu Asp

109 CGC GAT CCA AAG GAT GAA GAA ATC CTG GAA CTA TTG CCA AGC ATA TTG ATG AAA
37 Arg Asp Pro Lys Asp Glu Glu Ile Leu Glu Leu Leu Pro Ser Ile Leu Met Lys

163 GTA AAT GAA CAA TCA AAC GAT GAA TAT CAT TTG ATG CCG ATC AAA TTA CTG AAG
55 Val Asn Glu Gln Ser Asn Asp Glu Tyr His Leu Met Pro Ile Lys Leu Leu Lys

217 GTT TCA TCT CAA GTT GTC GCT GGT GTG AAA TAC AAG ATG GAT GTG CAG GTT GCT
73 Val Ser Ser Gln Val Val Ala Gly Val Lys Tyr Lys Met Asp Val Gln Val Ala

271 CGA TCG CAA TGT AAA AAA AGT TCG AAT GAA AAA GTT GAT CTA ACA AAG TGC AAA
91 Arg Ser Gln Cys Lys Lys Ser Ser Asn Glu Lys Val Asp Leu Thr Lys Cys Lys

325 AAA TTA GAA GGA CAT CCT GAA AAG GTT ATG ACT TTG GAA GTT TGG GAG AAA CCA
109 Lys Leu Glu Gly His Pro Glu Lys Val Met Thr Leu Glu Val Trp Glu Lys Pro

379 TGG GAG AAT TTT ATG CGC GTC GAA ATT CTG GGA ACA AAA GAA GTA
127 Trp Glu Asn Phe Met Arg Val Glu Ile Leu Gly Thr Lys Glu Val

```

Abb. 6: Nukleotidsequenz und Aminosäuresequenz von rOv17 und trOv17. Die Numerierung beginnt mit dem ersten Nukleotid bzw. mit der ersten Aminosäure von rOv17 ohne Signalsequenz. Der Pfeil markiert den Beginn von trOv17. Eingekästelt dargestellt ist in der Sequenz von rOv17 die AS Leucin, an deren Stelle sich in der Sequenz von trOv17 ein Serin befindet.

3.1.2.2 Aminosäuresequenzvergleich von rOv17, trOv17 und Onchocystatin

Mit Hilfe des HUSAR 5.0-Programms wurden die Aminosäuresequenzen von rOv17 und trOv17 mit der Sequenz des von S. Lustigman beschriebenen Onchocystatins (Lustigman et al. 1991, 1992) verglichen. Der Aminosäureabgleich ist in Abb. 7 dargestellt. Die Aminosäuresequenz von rOv17 (ohne Signalsequenz) stimmt in allen AS mit der Sequenz des Onchocystatins überein. Die Sequenz des verkürzten trOv17 unterscheidet sich in einer AS von der Sequenz des Onchocystatins bzw. von rOv17. An Position 91 (Onchocystatin Numerierung) bzw. 70 (rOv17 Numerierung) befindet sich in der Sequenz von Onchocystatin bzw. von rOv17 ein Leucin, in der Sequenz von trOv17 ein Serin. Die Sequenzierung und der Aminosäuresequenzvergleich bestätigen, daß es sich bei dem klonierten und exprimierten rOv17 und trOv17 um das von S. Lustigman (1991, 1992) beschriebene Onchocystatin der Filarie *O. volvulus* handelt.

	10	20	30	40	50	60
Onchocystatin	MLTIKDG	TLLIHL	LLFSV	VALVQL	QGAKS	SARAKN
rOv17	-----	-----	-----	-----	-----	-----
trOv17	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	70	80	90	100	110	120
Onchocystatin	KDEEILE	LELLPS	ILMKV	NEQSN	DEYHLM	PIKLLK
rOv17	KDEEILE	LELLPS	ILMKV	NEQSN	DEYHLM	PIKLLK
trOv17	KDEEILE	LELLPS	ILMKV	NEQSN	DEYHLM	PIKSLK
	130	140	150	160		
Onchocystatin	EKVDLTK	CCKLEG	HPEKVM	TLEVWE	KPWENF	MRVEIL
rOv17	EKVDLTK	CCKLEG	HPEKVM	TLEVWE	KPWENF	MRVEIL
trOv17	EKVDLTK	CCKLEG	HPEKVM	TLEVWE	KPWENF	MRVEIL

Abb. 7: Aminosäuresequenzvergleich von Onchocystatin, rOv17 und trOv17. Die Numerierung bezieht sich auf die Sequenz von Onchocystatin. Sterne (*) markieren identische AS. Eingekästelt dargestellt sind die konservierten, aktiven Bereiche, die an der Inhibition papainähnlicher Cysteinproteasen beteiligt sind. Grau unterlegt ist die AS, in der sich trOv17 von Onchocystatin und rOv17 unterscheidet. Anstelle des Leucins an Position 91 von Onchocystatin bzw. 70 von rOv17 befindet sich in der Sequenz von trOv17 ein Serin.

3.1.3 Funktionelle Charakterisierung von rOv17 und trOv17

3.1.3.1 Charakterisierung des inhibitorischen Potentials von rOv17 und trOv17

3.1.3.1.1 Titration der aktiven Zentren von humanem Cathepsin B, L und S

Die Titration der aktiven Zentren wurde durchgeführt, um die wirksame Enzymkonzentration der Cysteinproteasen, die im Test eingesetzt werden sollten, zu bestimmen. Die Titration der Cysteinproteasen erfolgte mit einem E64- Standard und mit Eiweißcystatin (EwC). E64 und EwC binden die Proteasen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. E64 bindet dabei kovalent an den Cysteinrest im aktiven Zentrum der Protease. Die Titration mit E64 gibt daher Auskunft über die katalytische Wirksamkeit der Proteasen. Die Titration mit EwC, einem Inhibitor, der sich nichtkovalent in die Substratbindungstasche der Proteasen bindet, gibt Auskunft über die Konzentration an nativen Proteasemolekülen. Die Ergebnisse der Titration sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Titrierte Konzentrationen von Papain und Cathepsin B, L und S mit E64 und EwC.

	E64-titrierte Konzentration	EwC-titrierte Konzentration	Verhältnis von E64 zu EwC
Papain	0,88 μM	1,5 μM	53,3%
Cathepsin B	0,12 μM	n.d.	—
Cathepsin L	0,46 μM	0,85 μM	54,1%
Cathepsin S	0,42 μM	0,67 μM	61,5%

Die Ergebnisse der Titration zeigen, daß der Prozentsatz an wirksamer Enzymkonzentration bezogen auf die EwC-titrierte Gesamtkonzentration bei 50-60% liegt. Mit 50-60% ist für weitere Untersuchungen eine ausreichend große Anzahl an Proteasemolekülen katalytisch aktiv.

Aufgrund der Zugehörigkeit von rOv17 zu den Cystatinen, wird im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch mit den EwC-titrierten Cathepsin-Konzentrationen gearbeitet.

3.1.3.1.2 Sekundärtitration von rOv17 mit humanem Cathepsin L

Unter Verwendung der titrierten Cathepsin L-Charge wurde der Anteil an inhibitorisch wirksamen rOv17 bestimmt. Die Auswertung ergab, daß der Anteil aktiven Inhibitors der verwendeten rOv17-Fraktion 34,5% betrug. Die titrierte wirksame Inhibitorkonzentration von rOv17 wurde als Grundlage für die Berechnung der K_i -Werte verwendet. Für die übrigen Tests im weiteren Verlauf der Arbeit, wurde die im BCA-Test ermittelte Proteinkonzentration beibehalten.

3.1.3.1.3 Bestimmung der K_M -Werte von Cathepsin L und B

Da Cystatine fest, aber trotzdem reversibel die Substratbindungsstellen der Protease besetzen, also kompetitive Inhibitoren sind, war die Bestimmung der K_M -Werte Voraussetzung für die Berechnung der Dissoziationskonstanten K_i . Für die Bestimmung der K_M -Werte wurde die Aktivität der Cysteinproteasen bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Die Geschwindigkeit der Reaktion wurde durch die Messung der Fluoreszenzänderung durch die Freisetzung des fluorogenen AMC-Produktes (P) in Abhängigkeit von der Zeit (t) ermittelt. Die für die K_M -Berechnung notwendige Extrapolation der Reaktionsgeschwindigkeit auf den Startzeitpunkt (V_0) erfolgte durch die nichtlineare Regression nach der Gleichung 1. Die K_M -Werte (Tab. 3) wurden anschließend durch die nichtlineare Regression der Anfangsgeschwindigkeiten nach der Gleichung 2 berechnet.

Gleichung 1:

$$P = V_0 t E^{Bt} + C$$

- P - Produktkonzentration
- V_0 - Anfangsgeschwindigkeit
- E - Enzymkonzentration
- B - Maß für die Krümmung der Kurve
- C - Korrekturwert für Abweichungen vom Startzeitpunkt
- t - Zeit

Gleichung 2:

$$V_0 = V_{\max} S_0 / (S_0 + K_M)$$

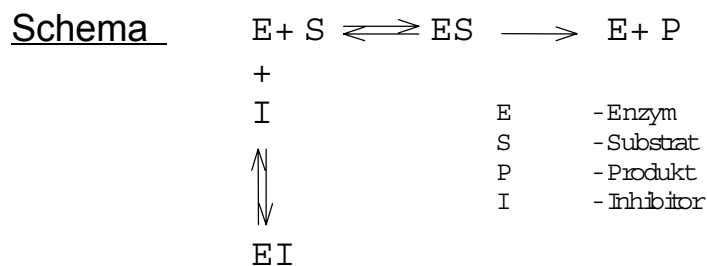
- V_{\max} - Maximalgeschwindigkeit
- S_0 - Anfangskonzentration des Substrates
- K_M - Michaelis Menten Konstante

Tab. 3: K_M -Werte für Papain und Cathepsin B, L, und S. Für die Bestimmung der K_M -Werte wurde die Aktivität der Proteasen bei verschiedenen Substratkonzentration bestimmt. Die K_M -Werte wurden durch Doppelbestimmungen ermittelt.

	Substrat	K_M -Wert
Papain	Z-Phe-Arg-AMC	650 μ M
Cathepsin B	Z-Arg-Arg-AMC	82,92 \pm 6,42 μ M
Cathepsin L	Z-Phe-Arg-AMC	1,23 \pm 0,13 μ M
Cathepsin S	Z-Val-Val-Arg-AMC	13,13 \pm 1,73 μ M

3.1.3.1.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i

Wie bereits beschrieben, binden Cystatine Cysteinproteasen fest, aber reversibel und konkurrieren dabei mit dem Substrat um das Enzym (Schema 1).



Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i wurde die Änderung der Enzymaktivität nach Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen an rOv17 und trOv17 als Funktion der Zeit (t) gemessen (Abb. 9A, 10A, 11A). Durch die nichtlineare Regression nach der Gleichung 3 lassen sich aus den Meßwerten die Sekundärdaten V_i , V_0 , und k_{obs} ermitteln.

Gleichung 3:
$$P = V_i t + [(V_0 V_i) / k_{obs} (1 - E^{k_{obs} t})]$$

V_i - Geschwindigkeit der gehemmten Reaktion
 k_{obs} - Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung

Damit hat man die Möglichkeit, die K_i -Werte sowohl für die *pre-steady-state* Phase [$K_i=f(k_{\text{obs}})$, Gleichung 4, Abb. 9B, 10B, 11B], als auch für die *steady-state* Phase [$K_i=f(V_i)$, Gleichung 5, Abb. 8, 9B, 10B, 11B, 12] zu berechnen.

Gleichung 4:
$$k_{\text{obs}}=K_{\text{off}} (1+I K_M / K_i (K_M+S_0))$$

K_{off} - Geschwindigkeitskonstante für der Zerfall von EI

Gleichung 5:
$$V_i=V_{\text{max}} S_0 / (K_M(1+I/K_i)+S_0)$$

In Tab. 4 sind jeweils die K_i -Werte der nichtlinearen Regression der *steady state* Phase mit dem vom Programm GraphPad Prism angegebenen Standardfehlern aufgeführt.

Tab. 4: K_i -Werte von rOv17 und trOv17 für Papain und Cathepsin B, L und S. Die Bestimmung der K_i -Werte erfolgte durch die Messung der Änderung der Proteasenaktivität in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33. Für die Bestimmung der K_i -Werte wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

	rOv17	trOv17	rOv33
Papain	0,038±0,005 nM	14,5±0,4 nM	673±1,1 nM
Cathepsin B	494,7±154,9 nM	n.d.	n.d.
Cathepsin L	0,038±0,004 nM	11,5±1,3 nM	n. d.
Cathepsin S	0,033±0,003 nM	29,6±3,6 nM	n. d.

Die Bestimmung der K_i -Werte verdeutlicht, daß rOv17 die Fähigkeit besitzt, die Aktivität von Cysteinproteasen der Papain-Superfamilie zu inhibieren. Die Stärke der Inhibition unterscheidet sich dabei in Abhängigkeit von der jeweiligen Cysteinprotease. Auch das verkürzte trOv17 inhibiert die Aktivität der Cysteinproteasen. Im Vergleich zum rOv17, bedingt das Fehlen des N-Terminus' von trOv17 in Abhängigkeit von der Protease eine um das 300-900 fache verminderte Affinität zu den Cysteinproteasen.

Im Vergleich zu rOv17 und trOv17 beeinflusst rOv33 die Aktivität papainähnlicher Cysteinproteasen nicht, was beispielhaft für die Cysteinprotease Papain gezeigt wurde (Abb.8).

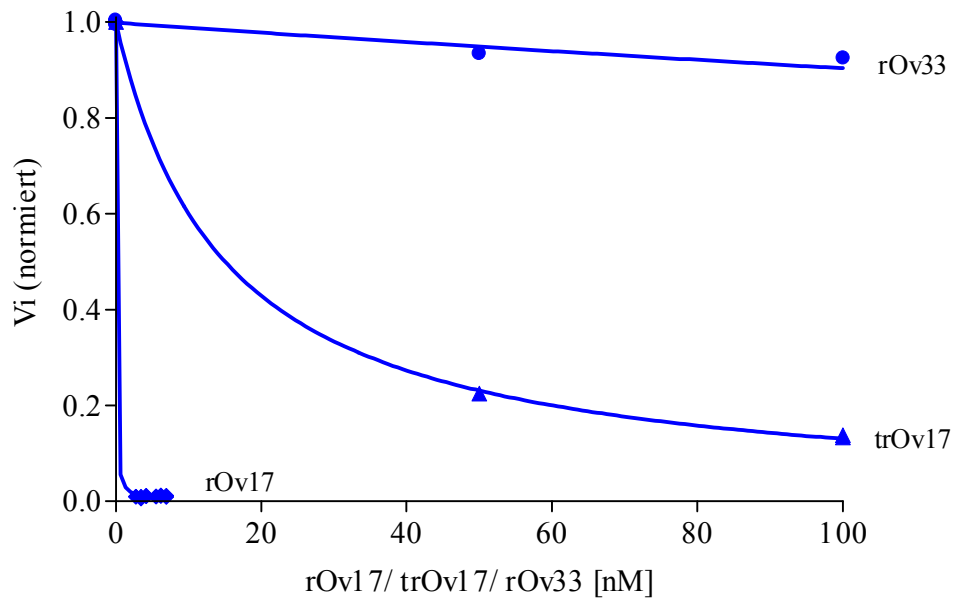
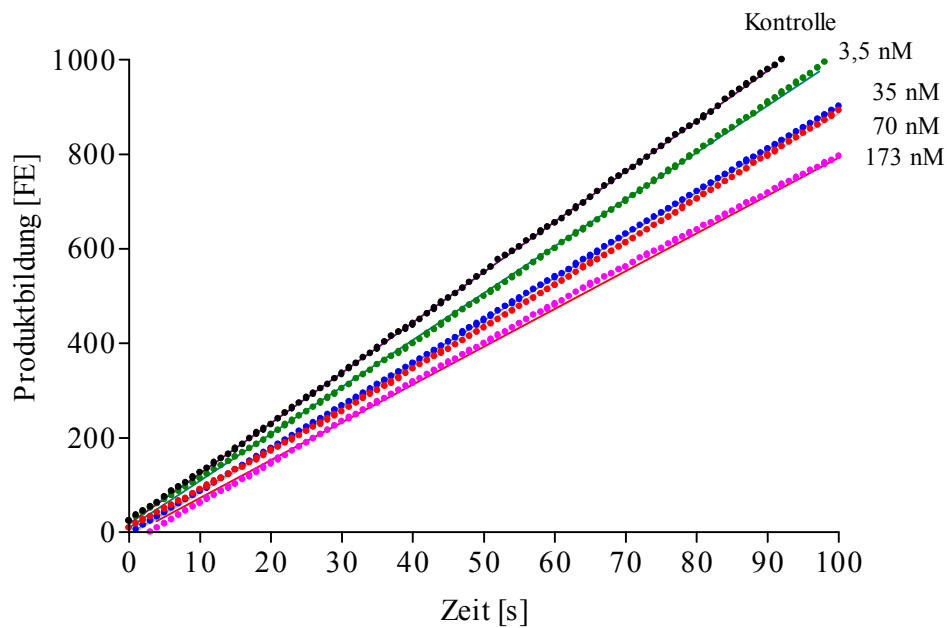


Abb. 8: Vergleich der inhibitorischen Wirksamkeit von rOv17, trOv17 und rOv33 gegenüber Papain. Die Messungen erfolgten bei 37°C. Als fluorogenes Substrat wurden Z-Phe-Arg-AMC in einer Konzentration von 25 μM eingesetzt. Dargestellt ist die normierte Geschwindigkeit der Produktbildung im *steady state*, die aus der nichtlinearen Regression der Sekundärdaten ermittelt wurde (Gleichung 5), als Funktion der Konzentration von rOv17, trOv17 und rOv33. Zur Normierung dienten entweder die Anfangsgeschwindigkeiten V_0 (rOv17) oder die Kontrollmessungen ohne rekombinantes Protein (trOv17, rOv33).

A



B

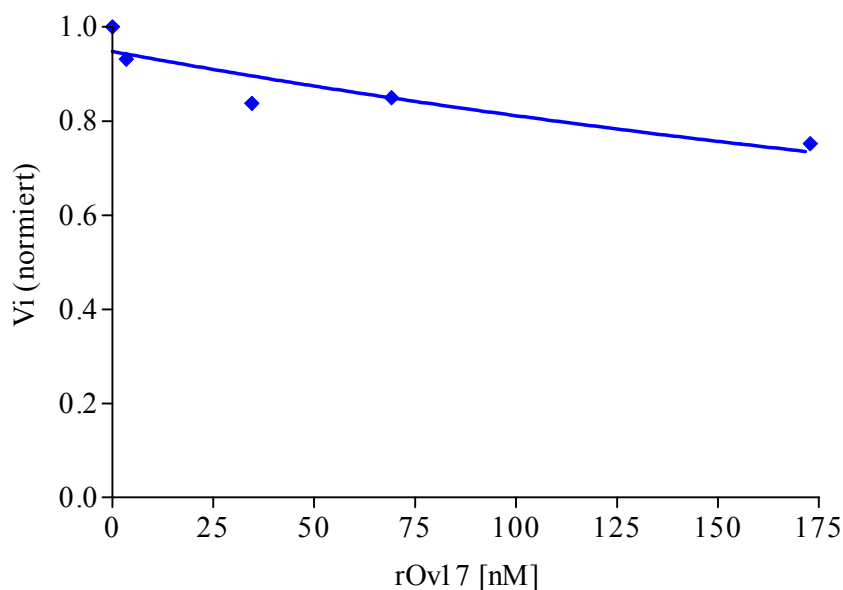
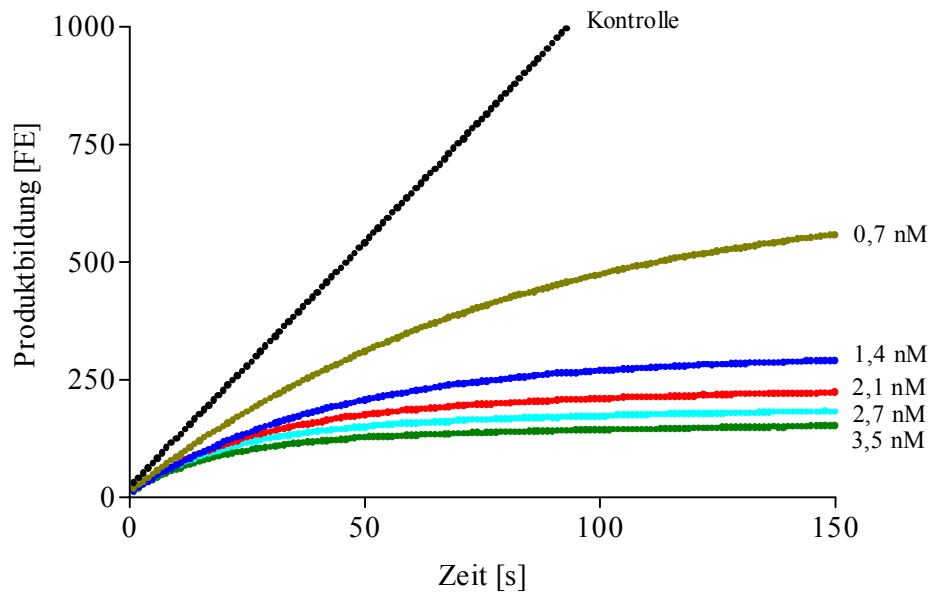


Abb. 9: Inhibition von Cathepsin B durch rOv17. A: Primärplot: Die Aktivität von Cathepsin B wurde fluorimetrisch in Anwesenheit verschiedener rOv17 Konzentrationen bestimmt. Die Messungen erfolgten bei 37°C. Als fluorogenes Substrat wurden Z-Arg-Arg-AMC in einer Konzentration von 40 μM eingesetzt. Dargestellt ist die gemessene Produktbildung in Fluoreszenzeinheiten [FE] in Abhängigkeit von der Zeit, zusammen mit den jeweils durch nichtlineare Regression ermittelten Kurvenverläufen nach Gleichung 3 zur Bestimmung der Sekundärdaten V_i , V_0 und K_{obs} . B: Sekundärplot. Dargestellt ist die normierte *steady state* Geschwindigkeit der Produktbildung, die aus der nichtlinearen Regression der Sekundärdaten ermittelt wurde (Gleichung 5), in Abhängigkeit von der rOv17 Konzentration. Zur Normierung der Geschwindigkeit diente die Geschwindigkeit der Kontrollmessungen ohne Inhibitor.

A



B

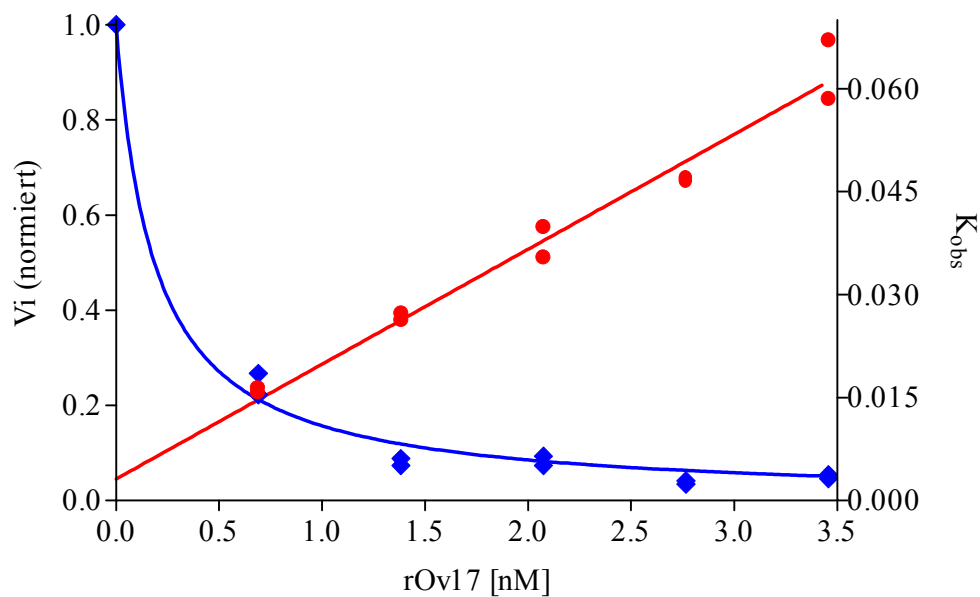
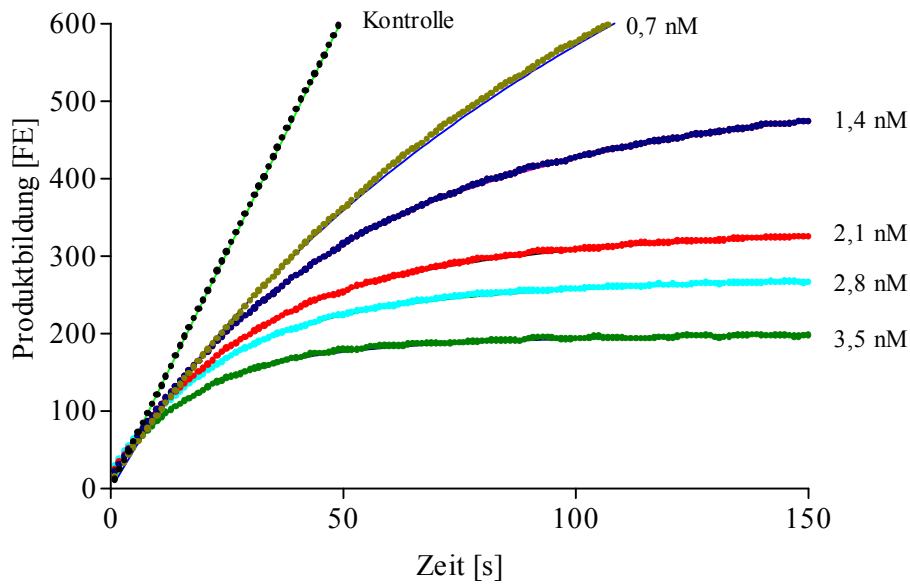


Abb. 10: Inhibition von humanem Cathepsin L durch rOv17. A: Primärplot. Die Aktivität von Cathepsin L wurde fluorimetrisch in Anwesenheit verschiedener rOv17 Konzentrationen (wie angegeben) bestimmt. Die Messungen erfolgten bei 37°C. Als fluorogenes Substrat wurden Z-Phe-Arg-AMC in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt. Dargestellt ist die gemessene Produktbildung in Fluoreszenzeinheiten [FE] in Abhängigkeit von der Zeit, zusammen mit den jeweils durch nichtlineare Regression ermittelten Kurvenverläufen nach Gleichung 3 zur Bestimmung der Sekundärdaten V_i , V_0 und K_{obs} . B: Sekundärplot. Dargestellt ist das Ergebnis der linearen und nichtlinearen Regression der Sekundärdaten zur Ermittlung des K_i -Wertes. Y1 (blau): Normierte *steady state* Geschwindigkeit der Produktbildung in Abhängigkeit von der rOv17-Konzentration (Gleichung 5). Zur Normierung diente die Anfangsgeschwindigkeit V_0 . Y2 (rot): *pre steady state* Geschwindigkeitskonstante (K_{obs}) in Abhängigkeit von der rOv17-Konzentration (Gleichung 4).

A



B

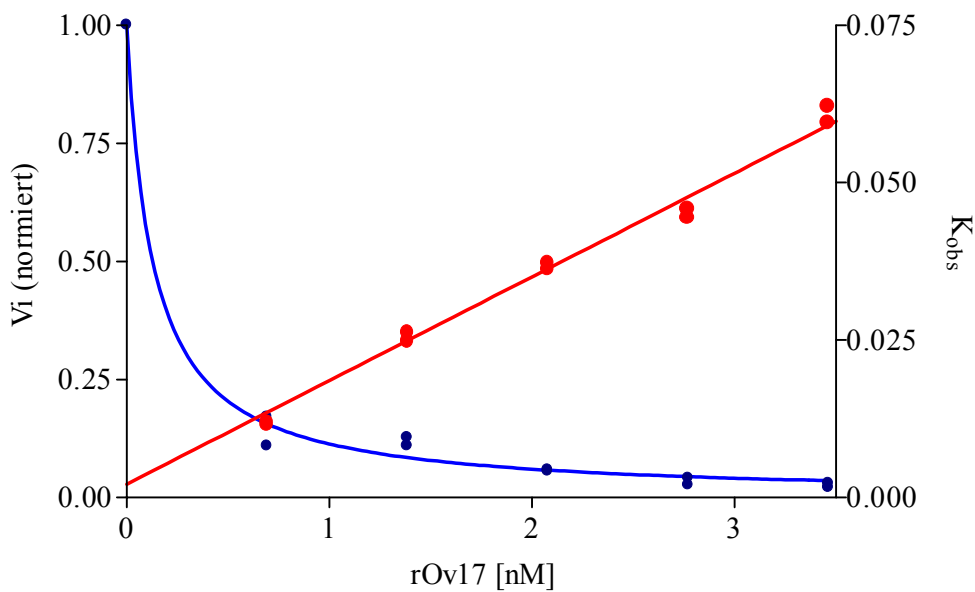


Abb. 11: Inhibition von humanem Cathepsin S durch rOv17. A: Primärplot. Die Aktivität von Cathepsin S wurde fluorimetrisch in Anwesenheit verschiedener rOv17 Konzentrationen (wie angegeben) bestimmt. Die Messungen erfolgten bei 37°C. Als fluorogenes Substrat wurden Z-Val-Val-Arg-AMC in einer Konzentration von 40 μM eingesetzt. Dargestellt ist die gemessene Produktbildung in Fluoreszenzeinheiten [FE] in Abhängigkeit von der Zeit, zusammen mit den jeweils durch nichtlineare Regression ermittelten Kurvenverläufen nach Gleichung 3 zur Bestimmung der Sekundärdaten V_i , V_0 und K_{obs} . B: Sekundärplot. Dargestellt ist das Ergebnis der linearen und nichtlinearen Regression der Sekundärdaten zur Ermittlung des K_i -Wertes. Y1 (blau): Normierte *steady state* Geschwindigkeit der Produktbildung in Abhängigkeit von der rOv17-Konzentration (Gleichung 5). Zur Normierung diente die Anfangsgeschwindigkeit V_0 . Y2 (rot): *pre steady state* Geschwindigkeitskonstante (K_{obs}) in Abhängigkeit von der rOv17-Konzentration (Gleichung 4).

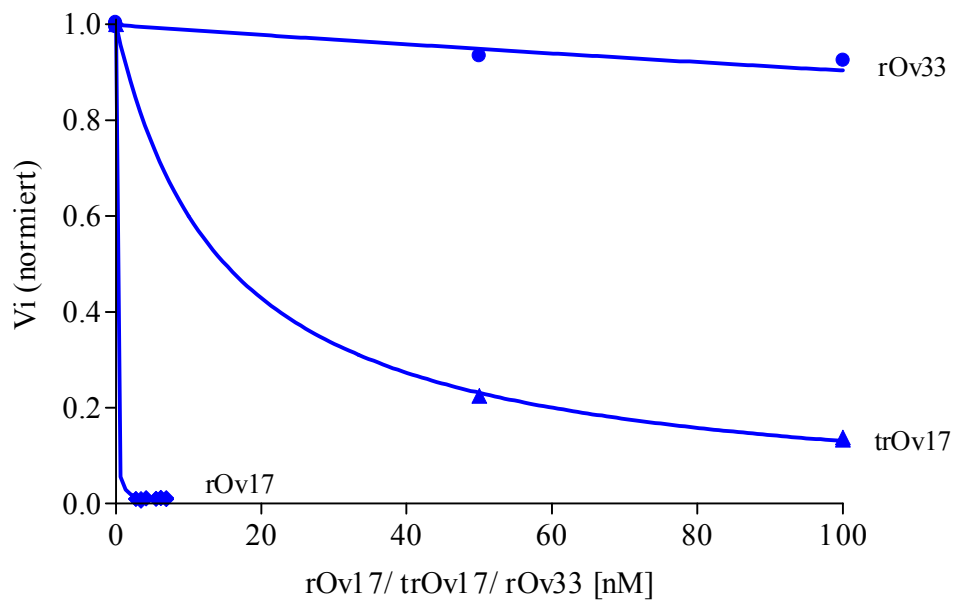


Abb. 12: Vergleich der inhibitorischen Wirksamkeit von rOv17, trOv17 und rOv33 gegenüber Papain. Die Messungen erfolgten bei 37°C. Als fluorogenes Substrat wurden Z-Phe-Arg-AMC in einer Konzentration von 25 μM eingesetzt. Dargestellt ist die normierte Geschwindigkeit der Produktbildung im *steady state*, die aus der nichtlinearen Regression der Sekundärdaten ermittelt wurde (Gleichung 5) als Funktion der Konzentration von rOv17, trOv17 und rOv33. Zur Normierung dienten entweder die Anfangsgeschwindigkeiten V_0 (rOv17) oder die Kontrollmessungen ohne rekombinantes Protein (trOv17, rOv33).

3.1.4 Quantifizierung des LPS-Gehaltes der rekombinant hergestellten *O. volvulus* Proteine

LPS ist Grundbaustein der Bakterienzellwand gramnegativer Bakterien und wirkt bereits im pg-Bereich immunmodulatorisch. Aufgrund der prokaryotischen Expression der Proteine enthalten die aufgereinigten Fraktionen LPS. Um einen möglichen Einfluß von LPS in den durchzuführenden Test quantifizieren zu können, wurde der LPS-Gehalt der Proteinfractionen von rOv17, trOv17 und rOv33 mittels eines Limulus Amoebocytenlysate-Tests bestimmt (Tab. 5). Zusätzlich wurde nach Einsatz verschiedener Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33 im Zelltest, die dadurch verursachte LPS-Kontamination durch die Messung der LPS-Konzentration in den entsprechenden Zellkulturüberständen bestimmt (Tab. 5).

Tab. 5: LPS-Gehalt der aufgereinigten Proteinfractionen und LPS-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Einsatz verschiedener Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33.

	rOv17	trOv17	rOv33
Proteinfraction	0,05 – 0,1 ng/ml	3 - 4 ng/ml	1 – 2 ng/ml
LPS-Konzentration im Kulturüberstand mit 0,01 µM rOv17, trOv17, rOv33	0,04 – 0,13 pg/ml	3 – 4 pg/ml	1,5 – 3 pg/ml
LPS-Konzentration im Kulturüberstand mit 0,5 µM rOv17, trOv17, rOv33	2,0 – 6,5 pg/ml	150 – 200 pg/ml	75 – 150 pg/ml

3.2 Bestimmung der Konzentration von Onchocystatin im Kulturüberstand von *O. volvulus* Weibchen

Die Konzentration von Onchocystatin im Kulturüberstand weiblicher Würmer wurde bestimmt, um die Ausscheidung von Onchocystatin *in vivo* beurteilen zu können. Der 24 h Kulturüberstand von 5 weiblichen *O. volvulus* Würmern wurde uns freundlicherweise von Dr. N. Brattig (Bernhard-Nocht Institut Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Konzentration von Onchocystatin wurde mittels ELISA bestimmt. In den 24 h-Kulturüberständen wurde pro Weibchen eine Konzentration von 20-40 ng Onchocystatin bestimmt.

3.3 Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung der rekombinanten *O. volvulus* Cystatine

3.3.1 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die antigenspezifische Proliferation

3.3.1.1 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die PPD-stimulierte Proliferation humaner PBMC

Mit Hilfe der PPD-stimulierten Proliferation sollte untersucht werden, ob rOv17, ein rekombinant hergestellter, aktiver Cysteinproteasen-Inhibitor der humanpathogenen Filarie *O. volvulus*, die Fähigkeit besitzt, den Verlauf einer antigenspezifischen Immunantwort zu beeinflussen. Um zu untersuchen, ob die Eigenschaft als Cysteinproteasen-Inhibitor in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist, wurde vergleichend zum rOv17 der Einfluß einer verkürzten und dadurch inhibitorisch weniger aktiven, rekombinant hergestellten Variante des Cysteinproteasen-Inhibitors (trOv17) auf die PPD-spezifische Proliferation charakterisiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abb. 13 dargestellt. rOv17 und trOv17 inhibieren die PPD-stimulierte Proliferation von humanen T-Zellen gleichermaßen um durchschnittlich 45%. Im Vergleich dazu hat das Kontrollprotein rOv33 keinen Einfluß auf die PPD-stimulierte Proliferation.

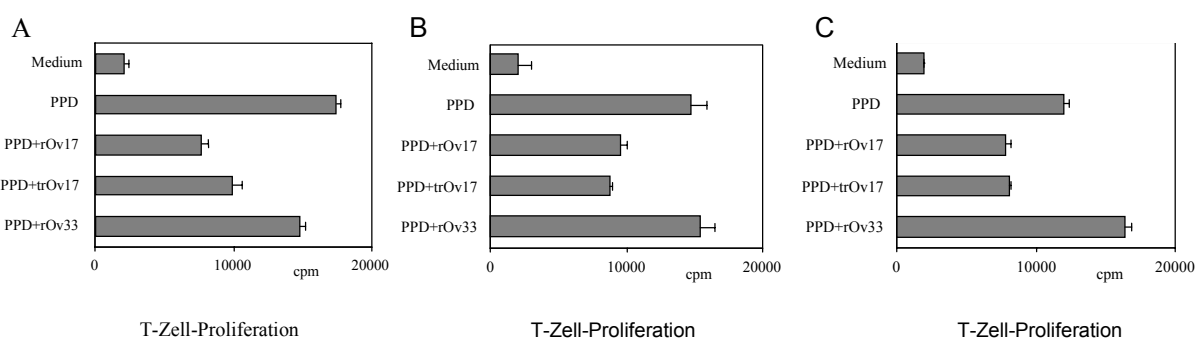


Abb. 13: Inhibition der PPD-spezifischen T-Zell-Proliferation durch rOv17 und trOv17. PBMC von 3 Spendern wurden mit 10 IE/ml PPD stimuliert und jeweils in Dreieransätzen mit 0,5 μ M rOv17, trOv17 und rOv33 für 90 h inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch den Einbau von ³H-Thymidin in die DNA während der letzten 20 h der Inkubation quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proliferation [cpm] \pm Standardabweichung von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Tests (A-C) mit 3 Spendern.

3.3.1.2 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die *O. volvulus*-antigenspezifische Proliferation von Milzzellen immunisierter BALB/c Mäuse

Der Einfluß von rOv17 und trOv17 wurde auch auf den Verlauf der filarienantigenspezifischen Immunantwort charakterisiert. Hierfür wurden BALB/c Mäuse mit *O. volvulus*-Antigensgesamtextrakt (OvAg) immunisiert und der Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Milzzellenproliferation nach Restimulation mit OvAg untersucht (Abb. 14). Die Proliferation OvAg-stimulierter Milzzellen wird durch rOv17 im Durchschnitt um 90% und durch trOv17 um 28% gehemmt. Das Kontrollprotein rOv33 supprimiert die Proliferation mit durchschnittlich 5% nur gering.

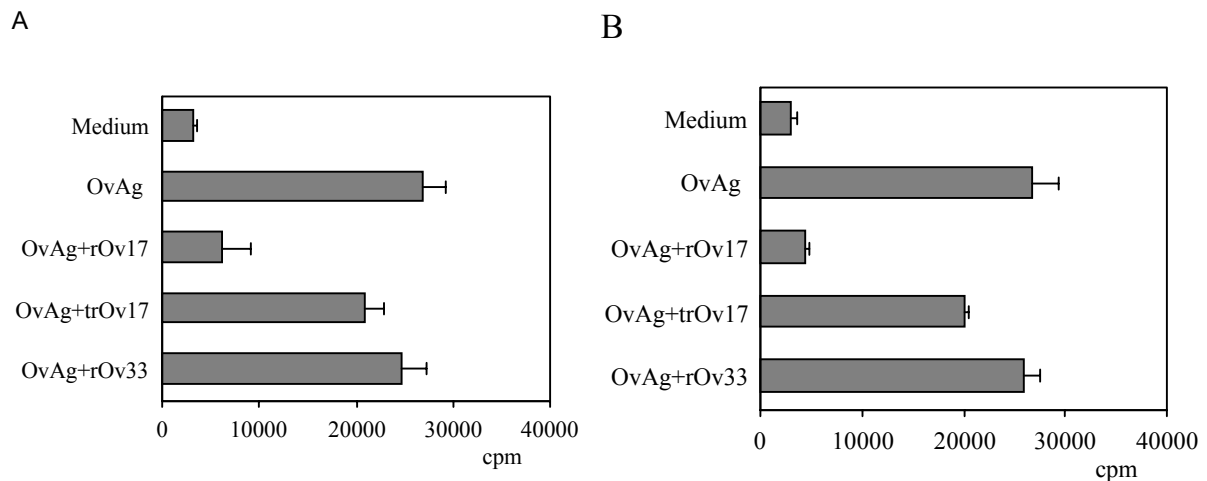


Abb. 14: Inhibition der OvAg-spezifischen Proliferation durch rOv17 und trOv17. Milzzellen OvAg immunisierter BALB/c Mäuse wurden in vitro mit 10 µg/ml OvAg restimuliert und mit 0,5 µM rOv17, trOv17 und rOv33 für 90 h inkubiert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von 3H-Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen in den letzten 20 h der Inkubation quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proliferation [cpm] ± Standardabweichung, die aus den dreifach bestimmten Proliferationswerten berechnet wurden. Der Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die OvAg-spezifische Proliferation wurde in 2 unabhängig voneinander durchgeführten Tests (A und B) untersucht. Pro Test wurden die Milzzellen von 3 Mäusen präpariert.

3.3.2 Einfluß von EwC und E64 auf die PPD-stimulierte Proliferation humaner PBMC

Um zu überprüfen, ob die immunmodulierende Wirkung eine allgemeine Eigenschaft von Cysteinproteasen-Inhibitoren ist, wurde der Einfluß von zwei weiteren Cysteinproteasen-Inhibitoren auf die PPD-stimulierte T-Zell-Proliferation getestet. Untersucht wurde EwC, ein Vertreter der Typ 2-Cysteinproteasen-Inhibitoren und E64, ein irreversibler Cysteinproteasen-Inhibitor. In den Studien wurde ein E64-Derivat (E64d) eingesetzt, welches aufgrund seiner Modifizierung membrangängig ist. EwC und E64 induzieren im Vergleich zum rOv17 bei einer Konzentration von 0,5 μM keine Inhibition der PPD-stimulierten T-Zell-Proliferation (Abb. 15).

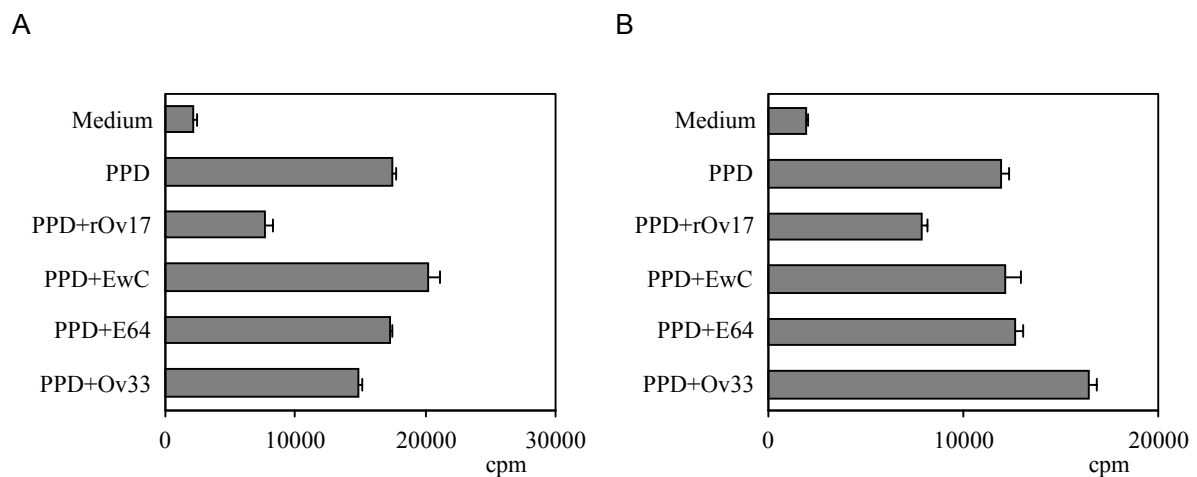


Abb. 15: PPD-stimulierte T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von EwC und E64. Humane PBMC wurden *in vitro* mit 10 IE/ml stimuliert und mit 0,5 μM EwC und E64 für 90 h inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA während der letzten 20 h der Inkubation bestimmt. Die Proben wurden in Dreieransätzen getestet, aus denen die Mittelwerte der Proliferation [cpm] und die Standardabweichungen berechnet wurden. Dargestellt sind 2 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche (A und B) mit jeweils 1 Spender.

3.3.3 Einfluß der rekombinanten *O. volvulus* Cystatine auf die polyklonal-stimulierte Proliferation von humanen PBMC

3.3.3.1 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die PHA-stimulierte Proliferation von humanen PBMC

Um zu untersuchen, ob rOv17 und trOv17 auch unabhängig von der Antigenpräsentation die Proliferation von T-Zellen beeinflussen können, wurde die Proliferation von PHA-stimulierten PBMC in Anwesenheit von rOv17 und trOv17 charakterisiert. Hierfür wurde zunächst durch den Einsatz von verschiedenen Konzentrationen von rOv17 und rOv33 eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit analysiert. rOv17 inhibiert die PHA-stimulierte Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration um 12-42% (Abb. 16). Bei einer Konzentration von 0,1 μM supprimiert rOv17 die Proliferation durchschnittlich um 12%, bei 0,25 μM um 30% und bei 0,5 μM um 42%. Das Kontrollprotein, rOv33 hat keinen inhibitorischen Einfluß auf die Proliferation der PBMC (Abb. 16).

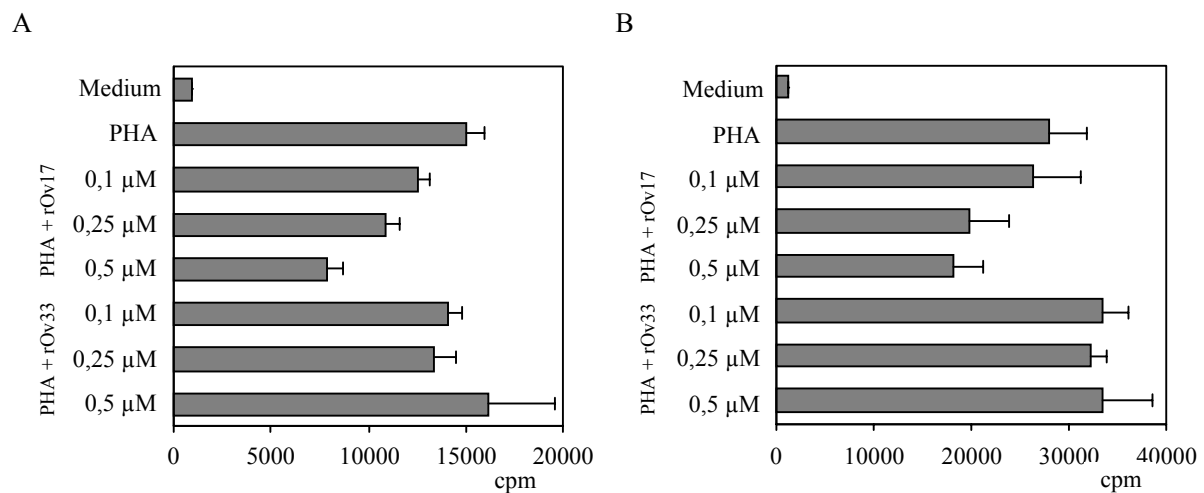


Abb. 16: Konzentrationsabhängige Inhibition der PHA-stimulierten Proliferation durch rOv17.

Humane PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17 für 72 h inkubiert. Die Quantifizierung der Proliferation erfolgte durch die Messung der Radioaktivität der Zellen nach dem Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA während der letzten 20 h der Inkubation. Die rekombinanten Proteine und die Kontrollen wurden in Dreieransätzen getestet, aus denen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurden. Dargestellt sind 2 unabhängig voneinander durchgeführte Tests (A und B) mit jeweils 1 Spender.

Der inhibitorische Effekt von rOv17 auf die PHA-stimulierte Proliferation wurde mit humanen PBMC von 10 weiteren Spendern getestet. Dabei wurde rOv17 in einer Konzentration von 0,5 μM eingesetzt, da diese Konzentration im Vortest eine deutliche Inhibition induzierte. Desweiteren wurde vergleichend zum rOv17 der Einfluß des verkürzten trOv17 untersucht. rOv17 inhibiert die PHA-stimulierte Proliferation durchschnittlich um 40% ($p < 0,0001$), das verkürzte trOv17 um 32% ($p < 0,0001$) und das Kontrollprotein rOv33 supprimiert die Proliferation um 16% ($p < 0,0001$) (Abb. 17). Wählt man rOv33 als Bezugsgröße für die Berechnung der Signifikanz, hemmen rOv17 und trOv17 auch dann die Proliferation statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

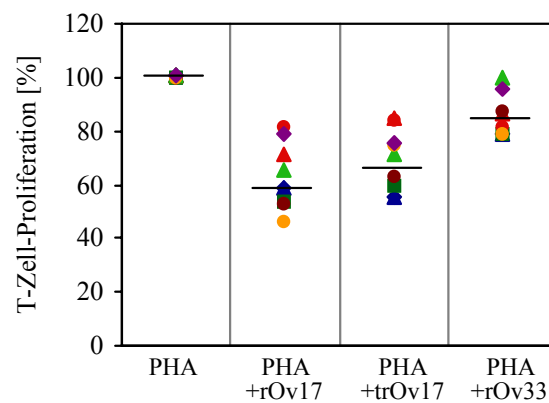


Abb. 17: Inhibition der PHA-stimulierten Proliferation humaner PBMC durch rOv17 und trOv17. PBMC von 10 Spendern wurden mit PHA stimuliert und mit 0,5 μM rOv17, trOv17 und rOv33 für 72 h inkubiert. Dargestellt sind die Proliferationswerte in [%] in Bezug auf die PHA-Kontrolle. Die Mittelwerte der Proliferation der 10 Spender sind durch Querstriche dargestellt.

3.3.3.2 Proliferation von PHA-stimulierten PBMC in Anwesenheit von rOv17 und einem anti-rOv17 Kaninchenserum

Um zu überprüfen, ob die Inhibition der PHA-stimulierten Proliferation ein rOv17-spezifischer Effekt ist, wurde untersucht, ob ein anti-rOv17 Kaninchenserum den inhibitorischen Effekt von rOv17 auf die PHA-stimulierte Proliferation neutralisiert. Hierfür wurden PHA-stimulierte PBMC mit rOv17 und anti-rOv17 Kaninchenserum koinkubiert. Der Einsatz des anti-rOv17 Kaninchenserum hebt die durch rOv17-induzierte Inhibition der Proliferation auf (Abb.18). Im Vergleich dazu, hat das Kontrollserum, ein anti-Eimerien-Kaninchenserum, keinen Einfluß auf die durch rOv17-induzierte verminderte Proliferation.

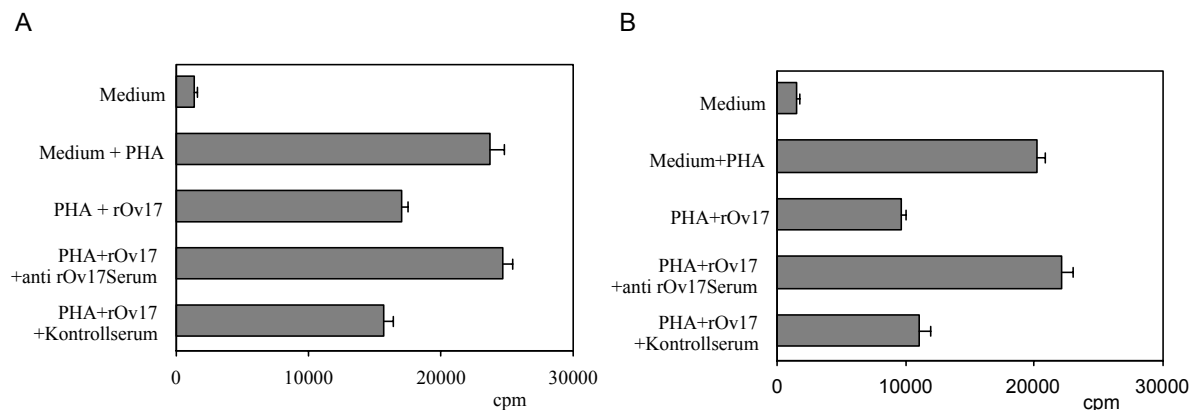


Abb. 18: Neutralisation der durch rOv17 induzierten verminderten PHA-stimulierten Proliferation durch den Einsatz eines anti-rOv17 Kaninchenserums. PHA-stimulierte PBMC wurden mit 0,5 μ M rOv17 und dem anti-rOv17 Kaninchenserum für 72 h inkubiert. Als Kontrollserum wurde ein anti-Eimerien-Kaninchenserum verwendet. Die Proliferation der Zellen wurde durch den Einbau von 3 H-Thymidin in die DNA während der letzten 20 h der Inkubation quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proliferation [cpm] \pm Standardabweichung, die aus den durchgeführten Dreifachbestimmungen berechnet wurden. Dargestellt ist das Ergebnis von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Test (A und B) mit 2 Spendern.

3.3.3.3 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die anti-CD3 Ak-stimulierte Proliferation humaner PBMC

Mit der Stimulation von humanen PBMC durch immobilisierte anti-CD3 Ak sollte überprüft werden, ob rOv17 und trOv17 die polyklonal-stimulierte Proliferation unabhängig vom verwendeten T-Zell-Stimulus inhibieren. rOv17 supprimiert die durch immobilisierte anti-CD3 Ak-stimulierte Proliferation durchschnittlich um 41,9% ($p=0,002$), trOv17 um 32,1% ($p=0,002$) und rOv33 um 16% ($p=0,004$) (Abb.19). Auch in Bezug zum Kontrollprotein rOv33 ist die Inhibition von rOv17 und trOv17 statistisch signifikant ($p=0,02$).

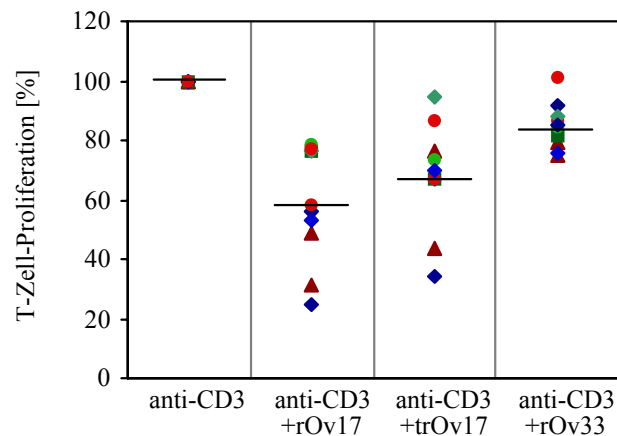


Abb. 19: Inhibition der anti-CD3 Ak-stimulierten Proliferation durch rOv17 und trOv17. PBMC wurden mit immobilisierten anti-CD3 Ak stimuliert und mit 0,5 μ M rOv17, trOv17 und rOv33 für 72 h inkubiert. Die Kontrollen und rekombinanten Proteine wurden in Dreieransätzen getestet. Die Proliferationswerte sind in [%] im Vergleich zur anti-CD3 Kontrolle dargestellt. Die Mittelwerte sind durch Querstriche dargestellt.

3.3.4 Bestimmung der Zielzelle(n) von rOv17

3.3.4.1 Charakterisierung der Bindung und Aufnahme von rOv17 und trOv17 durch Immunzellen

Ziel war es, mit Hilfe einer Fluoreszenzfarbstoffmarkierung (Fluos) von rOv17, trOv17 und rOv33, mögliche Zielzellen von rOv17 mittels FACS-Analyse zu bestimmen. Hierfür wurden die Fluos-markierten Proteine mit RPMI-verdünntem Blut inkubiert und anschließend die Bindung von rOv17, trOv17 und rOv33 im Durchflußzytometer analysiert. Die Zellpopulationen wurden durch ihr unterschiedliches Lichtstreuungsverhalten (forward scatter, side scatter) und Monozyten zusätzlich durch eine Markierung mit PE-Cy5-markierten anti-CD14 Ak identifiziert. Die Ergebnisse des Bindungsverhalten der rekombinanten Proteine sind in Abb. 20A-C dargestellt. Alle getesteten rekombinanten Proteine interagieren mit Granulozyten (Abb. 20A) und Monozyten (Abb. 20B), wobei die Interaktion der Proteine mit Monozyten im Vergleich zu den Granulozyten stärker ausgeprägt ist. Lymphozyten bleiben nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C von rOv17, trOv17 und rOv33 unbeeinflusst (Abb. 20C).

Die Gesamtfluoreszenz gibt den Anteil an oberflächlich gebundenem und intrazellulärem Fluos-markiertem Protein wieder. Um den Anteil an aufgenommenen Protein durch die Granulozyten und Monozyten beurteilen zu können, wurde die Oberflächenfluoreszenz der Zellen mit einem Quenching-Reagenz neutralisiert und anschließend die verbleibende, intrazelluläre Fluoreszenz der Proben gemessen. rOv17, trOv17 und rOv33 werden in geringem Maße von Granulozyten, stärker jedoch von Monozyten aufgenommen (Abb.20A,B).

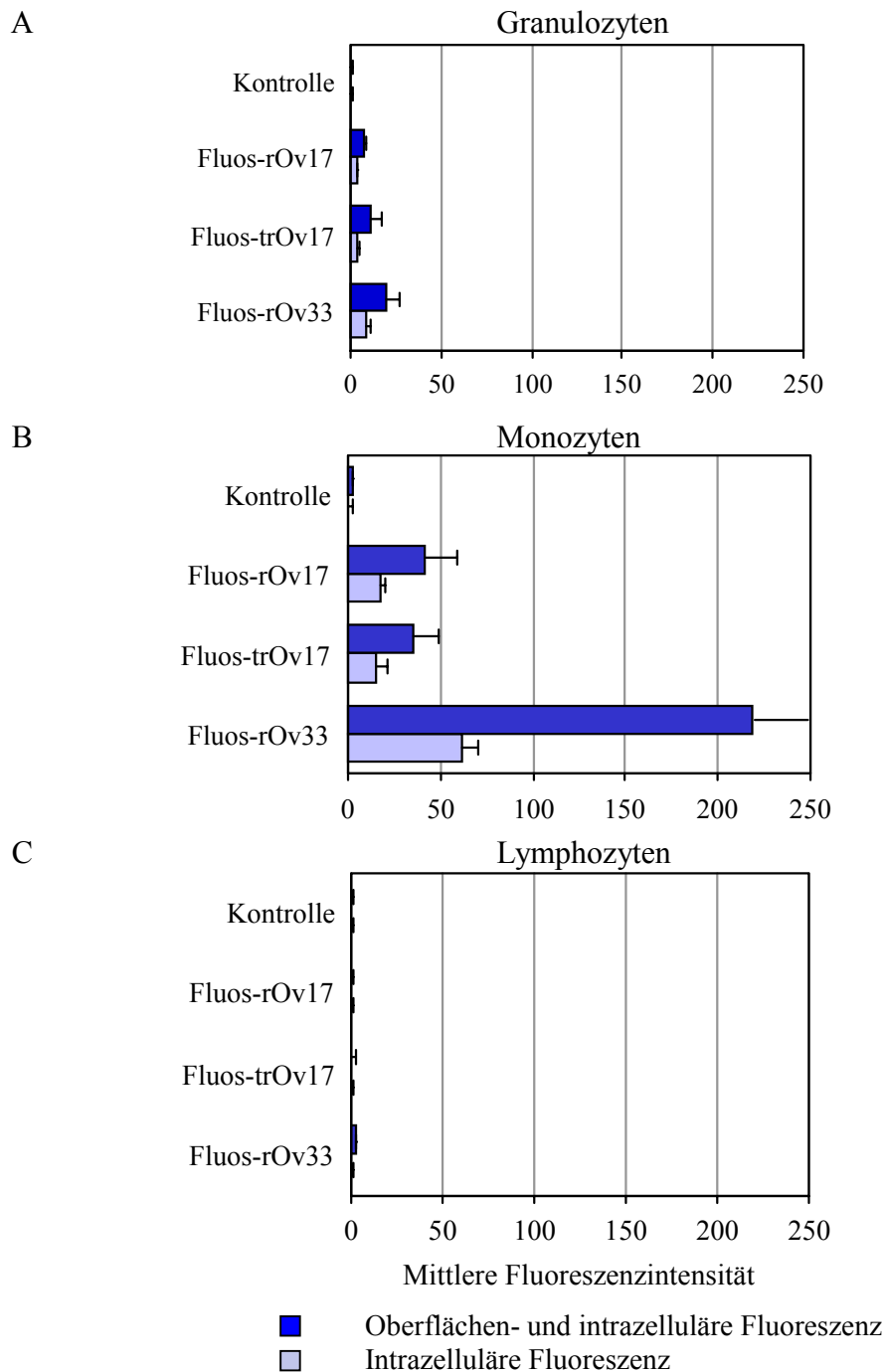


Abb. 20: Bindung und Aufnahme von Fluos-rOv17, Fluos-trOv17 und Fluos-rOv33 durch Granulozyten und Monozyten. A: Granulozyten. B: Monozyten. C: Lymphozyten. RPMI-verdünntes Blut wurde mit 0,25 μM Fluos-rOv17, Fluos-trOv17 oder Fluos-rOv33 für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Aufbereitung der Zellen wurde die Bindung und Aufnahme der Fluos-markierten Proteine im Durchflußzytometer ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität \pm Standardabweichung. Das Bindungsverhalten von rOv17, trOv17 und rOv33 wurde mit PBMC von 5 Spendern in 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen charakterisiert.

3.3.4.2 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die PHA-stimulierte Proliferation humaner, Monozyten-depletierter PBMC

Die Untersuchungen mit humanen, Monozyten-depletierten PBMC wurden durchgeführt, um zu analysieren, ob die durch rOv17 und trOv17 induzierte verminderte Proliferation, durch die Modulation von Monozytenfunktionen verursacht wird. Monozyten und Granulozyten sind CD14⁺-Zellen, eine Eigenschaft, die bei der Separierung dieser Zellpopulationen ausgenutzt wird. Da durch die PBMC-Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation keine Granulozyten mehr in der PBMC-Fraktion enthalten sein sollten, wurden durch die Depletion von CD14⁺-Zellen v. a. Monozyten aus der PBMC-Fraktion entfernt. Die CD14⁺-depletierten PBMC-Fraktionen, die für die Proliferationsstudien verwendet wurden, enthielten nach der CD14⁺-Depletion noch 1-2% CD14⁺-Zellen.

Zur Überprüfung des Erfolges der CD14⁺-Depletion wurde die Eigenschaft von Monozyten ausgenutzt, bereits 6 h nach einer LPS-Stimulation, TNF- α zu produzieren. Die CD14⁺-depletierten PBMC-Fraktionen wurden mit 5 ng LPS stimuliert und die TNF- α Produktion nach 6 h Inkubation im Überstand gemessen. Die TNF- α Produktion der CD14⁺-depletierten PBMC der 4 getesteten Spender betrug 80 pg/ml, 200pg, 43 pg/ml und 48 pg/ml im Vergleich zu einer TNF- α Produktion der entsprechenden gesamten PBMC-Fraktion von 2583 pg/ml, 3267 pg/ml, 1750 pg/ml, 1630 pg/ml. Die Messung der TNF- α Produktion bestätigte, daß in den CD14⁺-depletierten Zellfraktionen die Monozytenfraktion wirkungsvoll reduziert wurde. Die Proliferation der CD14⁺-depletierten Zellen wurde sowohl mit PHA (Abb. 21 A, C, E, G), als auch mit anti-CD3 Ak / anti-CD28 Ak (Daten nicht gezeigt) stimuliert. rOv17 und trOv17 haben in beiden Fällen keinen Einfluß auf die Proliferation. Die Proliferationsstudien mit CD14⁺-depletierten Zellen zeigen, daß in Abwesenheit von Monozyten, rOv17 keine Inhibition der polyklonal-stimulierten Proliferation induziert. Gleiches gilt für trOv17.

Vergleichend zur PHA-stimulierten Proliferation der CD14⁺-depletierten PBMC sind die Ergebnisse der PHA-stimulierten Proliferation der entsprechenden gesamten PBMC-Fraktion dargestellt (Abb. 21 B, D, F, H). Die PHA-stimulierte Proliferation der gesamten PBMC-Fraktion wird durch rOv17 und trOv17 um durchschnittlich 44% und 40% inhibiert.

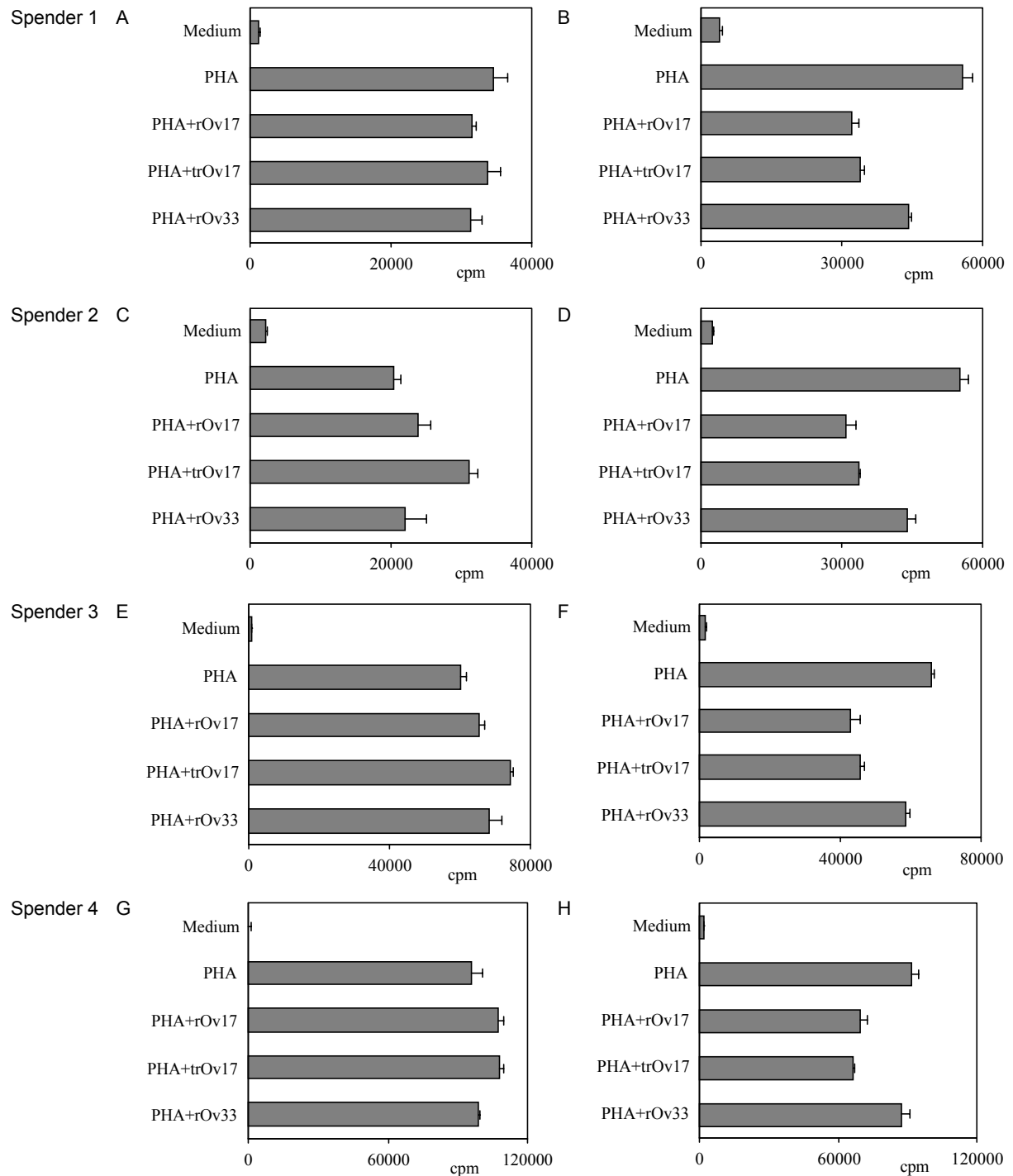


Abb. 21: Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die PHA-stimulierte Proliferation von PBMC mit und ohne Depletion von Monozyten. Humane PBMC von 4 Spendern mit und ohne Monozyten wurden mit PHA stimuliert und mit 0,5 μ M rOv17, trOv17 oder rOv33 für 72 h inkubiert. A, C, E, G: PHA-Stimulation von Monozyten-depletierten PBMC. B, D, F, H: PHA-Stimulation der gesamten PBMC-Fraktion. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proliferation [cpm] \pm Standardabweichung, die aus den Dreifachbestimmungen berechnet wurden.

3.3.5 Zytokinproduktion von humanen PBMC in Anwesenheit der rekombinanten *O. volvulus* Cystatine

3.3.5.1 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Zytokinproduktion unstimulierter humaner PBMC

Die Untersuchungen hatten zum Ziel, das immunmodulatorische Potential von rOv17 und trOv17 auf die Zytokinproduktion unstimulierter humaner PBMC zu charakterisieren. Da die Proliferationsstudien mit Monozyten-depletierten PBMC gezeigt haben, daß rOv17 seine immunmodulierende Wirkung über die Modulation von Monozytenfunktionen vermittelt, wurde in diesem Versuch der Einfluß von rOv17 und trOv17 auf Zytokine untersucht, die von Monozyten gebildet werden und im Verlauf einer Immunantwort aktivierende oder deaktivierende Funktionen besitzen. Bestimmt wurde die TNF- α , IL-10 und IL-12p40 Produktion.

Für die Bestimmung von TNF- α wurde der 6 h Kulturüberstand verwendet. rOv17 und trOv17 bedingen eine statistisch signifikant erhöhte TNF- α Produktion ($p \leq 0,001$) (Abb. 22A). Das verkürzte trOv17 induziert dabei eine stärkere TNF- α Produktion als rOv17. Das Kontrollprotein rOv33 verursacht ebenfalls eine verstärkte TNF- α Bildung ($p \leq 0,001$), wobei diese jedoch im Vergleich zum rOv17 und trOv17 um das 6-7 fache geringer ist.

Für die Bestimmung von IL-10 wurde der 48 h Kulturüberstand verwendet. rOv17 und trOv17 stimulieren PBMC zu einer statistisch signifikant erhöhten IL-10 Produktion ($p = p \leq 0,001$) (Abb. 22B), wobei das verkürzte trOv17 im Vergleich zum rOv17 wiederum einen stärkeren stimulierenden Effekt besitzt. Das Kontrollprotein rOv33 induziert eine geringfügig erhöhte IL-10 Produktion von unstimulierten humanen PBMC ($p = 0,008$).

rOv17 und trOv17 induzieren bereits nach 24 h eine verstärkte IL-10 Produktion (Daten nicht gezeigt).

Für die Bestimmung der IL-12p40 Produktion wurde ebenfalls der 48 h Kulturüberstand verwendet. Im Vergleich zur Mediumkontrolle ist in Anwesenheit von rOv17, trOv17 und rOv33 die IL-12p40 Produktion unstimulierter PBMC statistisch signifikant erhöht ($p = 0,003$) (Abb. 22C).

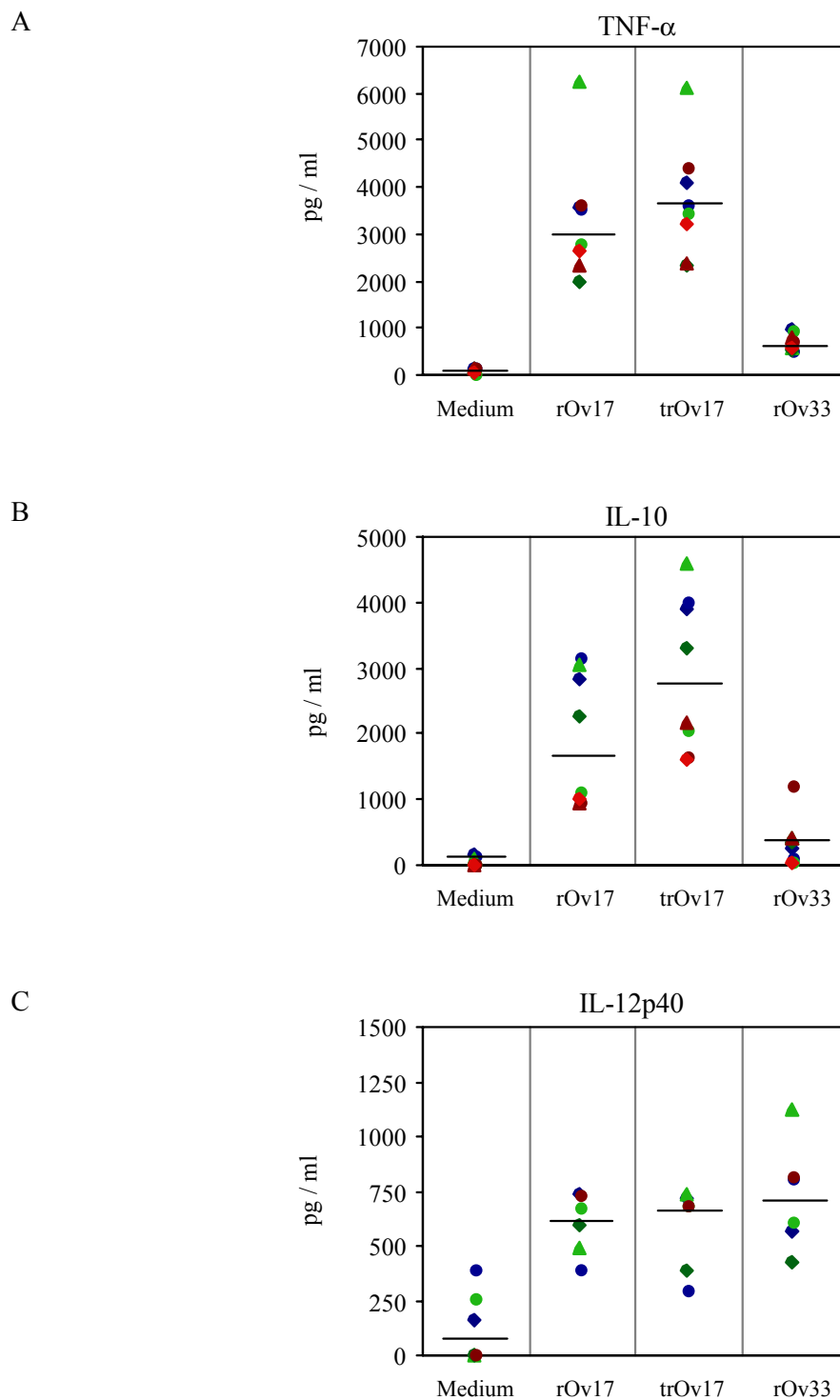


Abb. 22: Stimulation der TNF- α , IL-10 und IL-12 Produktion von unstimulierten humanen PBMC durch rOv17 und trOv17. PBMC von 6-8 Spendern wurden mit 0,5 μ M rOv17, trOv17 und rOv33 für 6 h (TNF- α) oder 48 h (IL-10, IL-12p40) inkubiert. Die Medianwerte der gemessenen Zytokinkonzentrationen sind als Querstriche dargestellt. A: TNF- α Produktion. B: IL-10 Produktion. C: IL-12p40 Produktion.

3.3.5.2 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Zytokinproduktion von stimulierten humanen PBMC

Die Untersuchungen hatten zum Ziel, vergleichend zur Zytokinproduktion von unstimulierten PBMC, den Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Zytokinproduktion von polyklonal-stimulierten PBMC zu untersuchen. Bestimmt wurde der Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Bildung von IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40, IFN- γ und TGF- β . Die Messung von IL-2 und IL-4 war aufgrund technischer Mängel der verwendeten ELISA nicht möglich. Auch die Bewertung der gemessenen TGF- β Konzentrationen war aufgrund von Mängeln des verwendeten ELISA nicht eindeutig möglich. Die Ergebnisse für die IL-10-, IL-12p40- und IFN- γ Produktion sind in Abb. 23 dargestellt. In Anwesenheit von rOv17 und trOv17 ist die Produktion von IL-10 statistisch signifikant erhöht ($p=0,002$), wobei trOv17 wiederum eine stärkere modulierende Wirkung besitzt (Abb. 23A). Das Kontrollprotein rOv33 induziert ebenfalls eine statistisch signifikant erhöhte Bildung von IL-10 ($p=0,005$), die im Vergleich zum rOv17 und trOv17 weniger potent ist (Abb. 23A).

Die Bildung von IL-12p40 ist durch rOv17 und trOv17 statistisch signifikant vermindert ($p=0,025$) (Abb. 23B). Das Kontrollprotein rOv33 beeinflusst im Vergleich dazu die IL-12p40 Bildung stimulierter PBMC nicht.

Die Bildung von IFN- γ ist durch rOv17 nicht statistisch signifikant verändert (Abb. 23C). Im Gegensatz dazu induziert das verkürzte trOv17 eine statistisch signifikant verminderte IFN- γ Produktion ($p=0,023$) (Abb. 23 C). Das Kontrollprotein rOv33 beeinflusst die Bildung von IFN- γ nicht.

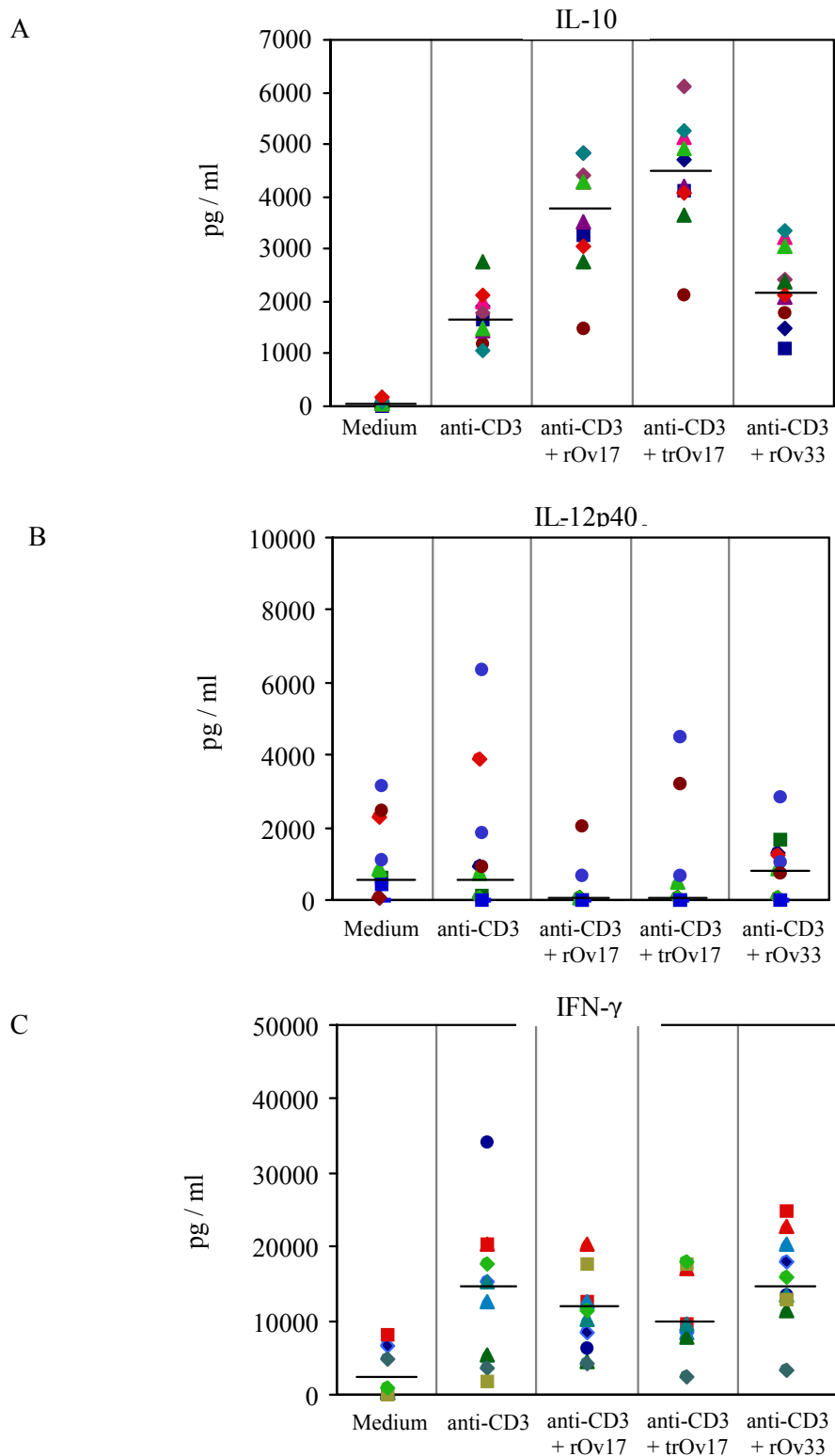


Abb. 23: Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Zytokinproduktion stimulierter humaner PBMC. PBMC von 10 Spendern wurden mit immobilisierten anti-CD3 Ak stimuliert und mit 0,5 μ M rOv17, trOv17 und rOv33 für 48 h inkubiert. Die Medianwerte der gemessenen Zytokinkonzentrationen sind als Querstriche dargestellt. A: IL-10 Produktion. B: IL-12p40 Produktion. C: IFN- γ Produktion.

3.3.6 Einfluß der rekombinanten *O. volvulus* Cystatine auf die Expression von Oberflächenmolekülen humaner Monozyten

3.3.6.1 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die HLA-DR-Expression

Die Untersuchung der Expression von HLA-DR auf humanen Monozyten sollte zeigen, ob rOv17 und trOv17 die Funktion dieser Zellen, Antigen zu präsentieren, beeinflussen. Die Inkubation von humanen PBMC mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33 führt zu einer verminderten HLA-DR-Expression durch rOv17 und gleichermaßen durch trOv17 (Abb. 24). rOv17 und trOv17 induzieren dabei bereits bei einer Konzentration von 10 nM eine Inhibition der Expression von HLA-DR um 70% bis 80%, wobei mit zunehmender Konzentration keine weitere Suppression der HLA-DR-Expression erzielt werden konnte. Das Kontrollprotein rOv33 hat bei einer Konzentration von 10 nM, 50 nM und 100 nM keinen Einfluß auf die HLA-DR-Expression, bei einer Konzentration von 0,5 μ M vermindert rOv33 die Expression von HLA-DR um 15% bis 40%.

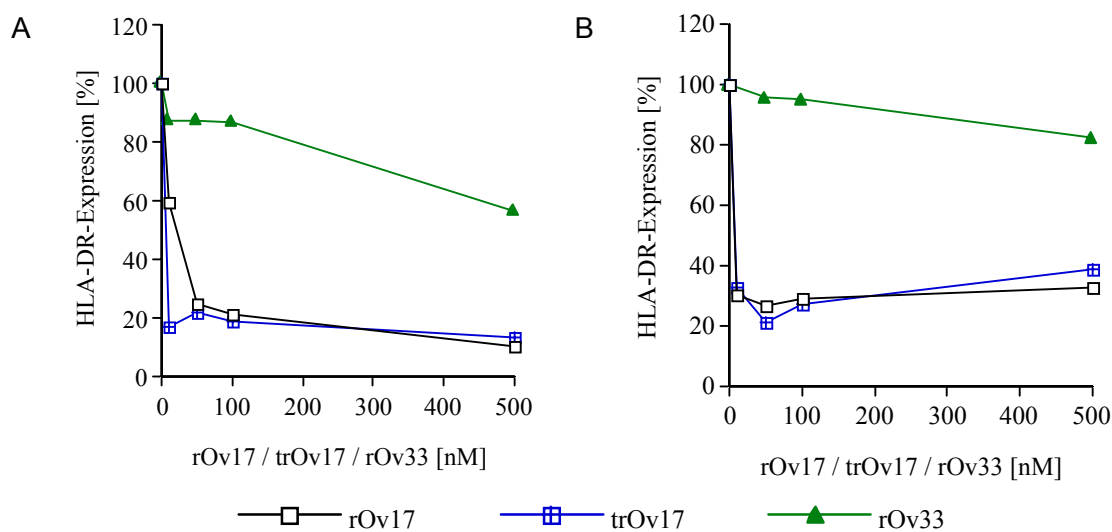


Abb. 24: Inhibition der HLA-DR-Expression von humanen Monozyten durch rOv17 und trOv17. Humane PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33 für 72 h inkubiert und die HLA-DR-Expression mittels FACS-Analyse bestimmt. Monozyten wurden durch PE-Cy5-markierte anti-CD14 Ak identifiziert und deren HLA-DR-Expression durch PE-markierte anti-HLA-DR Ak quantifiziert. Dargestellt ist die prozentuale HLA-DR-Expression der mit rOv17, trOv17 und rOv33 inkubierten Monozyten im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne rekombinante Proteine. 100% HLA-DR-Expression entsprechen einer mittleren Fluoreszenzintensität von 2000-3000. Getestet wurden 2 Spender in 2 unabhängig voneinander durchgeführten Tests (A, B).

3.3.6.2 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Expression kostimulatorischer Moleküle

Ziel dieser Untersuchungen war es, zu analysieren, ob rOv17 und trOv17 die Expression kostimulatorischer Moleküle, die wichtige Funktionen bei der Vermittlung einer antigenspezifisch-stimulierten Proliferation besitzen, beeinflussen. Getestet wurden die Expression von CD40, CD80 und CD86. (Abb. 25 A-F).

Die Expression von CD40 und CD80 auf unstimulierten humanen Monozyten ist gering. Dennoch wurde ein möglicher Einfluß von rOv17, trOv17 und rOv33 auf die Expression dieser kostimulatorischen Moleküle untersucht. Die Ergebnisse für die CD40-Expression sind in Abb. 25A und D dargestellt. rOv17 und trOv17 vermindern die CD40-Expression, wobei im ersten Versuch eine Suppression von 40% (Abb. 25A) und im zweiten Versuch eine Suppression von 20% (Abb. 25D) induziert wurde. Das Kontrollprotein rOv33 induziert im Gegensatz zu rOv17 und trOv17 eine verstärkte CD40-Expression.

Die Expression von CD80 auf humanen Monozyten wird von rOv17 und trOv17 nur unwesentlich beeinflusst. rOv17 und trOv17 vermindern die CD80-Expression um 10-20% (Abb. 25B und E). Das Kontrollprotein rOv33 wiederum bedingt eine verstärkte Expression von CD80.

Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 wird durch rOv17 und trOv17 vermindert (Abb. 25C und F). Dabei induzieren rOv17 und trOv17 bereits bei einer Konzentration von 10 nM eine Inhibition von 40%-50%, höhere Konzentrationen führen nur in einem Falle zu einer weiteren Suppression der CD86-Expression (Abb. 25C). Das Kontrollprotein rOv33 beeinflusst die CD86-Expression nicht.

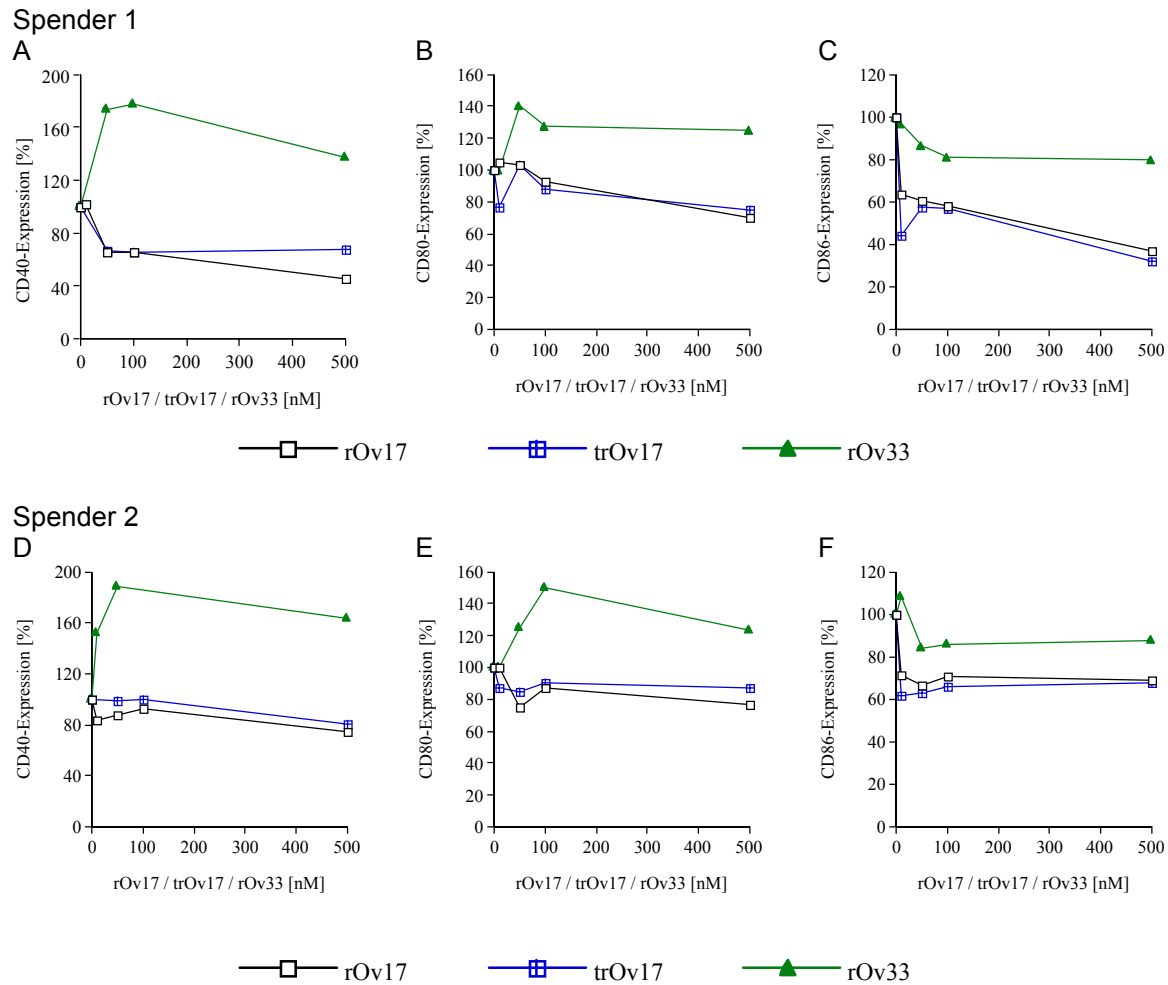


Abb. 25: Modulation der Expression von CD40, CD80 und CD86 durch rOv17 und trOv17.

Humane PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33 für 72 h inkubiert. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Monozyten wurden dabei durch PE-Cy5-markierte anti-CD14 Ak identifiziert und die Expression der kostimulatorischen Moleküle durch FITC-markierte anti-CD40 Ak oder anti-CD80 Ak und durch PE-markierte CD86 Ak quantifiziert. Dargestellt ist die prozentuale Expression von CD40, CD80 und CD86 der mit rOv17, trOv17 und rOv33 inkubierten Monozyten im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne rOv17, trOv17 und rOv33. 100% CD40-Expression entsprechen einer mittleren Fluoreszenzintensität von 100-200, 100% CD80-Expression einer von 30-40 und 100% CD86-Expression einer von 200-350. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit 2 Spendern. A-C: Spender 1. D-F: Spender 2. A und D: CD40-Expression. B und E: CD80-Expression. C und F: CD86-Expression.

3.3.7 Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung der durch rOv17 und trOv17 induzierten verstärkten IL-10 Produktion durch Neutralisationsstudien mit anti-IL-10 Ak

Zu den immunmodulierenden Eigenschaften von rOv17 und trOv17 gehört u. a. die Fähigkeit, die IL-10 Produktion von humanen Monozyten zu induzieren. IL-10 ist ein potentes immunmodulierendes Zytokin, welches insbesondere immunsupprimierende Eigenschaften besitzt. So vermindert IL-10 die Expression von MHC II Molekülen und von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von APZ, inhibiert die IL-12 und IFN- γ Produktion und supprimiert die T-Zell-Proliferation. IL-10 vermittelt somit immunmodulierende Eigenschaften, die den für rOv17 und trOv17 allgemein beschriebenen immunmodulierenden Eigenschaften entsprechen. Die Neutralisationsstudien mit anti-IL-10 Ak hatten daher zum Ziel, zu analysieren, ob die durch rOv17 und trOv17 induzierte erhöhte IL-10 Produktion Ursache der für rOv17 und trOv17 beschriebenen verminderten Expression von HLA-DR und der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 auf humanen Monozyten ist und ob IL-10 die verminderte IL-12 und IFN- γ Produktion vermittelt. Darüber hinaus sollte durch die Neutralisation von IL-10 im Proliferationstest untersucht werden, welche Bedeutung die verstärkte IL-10 Produktion bei der durch rOv17 und trOv17 induzierten verminderten Proliferation besitzt.

3.3.7.1 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die HLA-DR-Expression humaner Monozyten nach Neutralisation von IL-10

Der Einsatz neutralisierender anti-IL-10 Ak verhindert die durch rOv17 und trOv17 bedingte Suppression der HLA-DR-Expression auf der Oberfläche humaner Monozyten (Abb. 26A, B, D, E). Auf die Wirkung von rOv33 hat der Die Einsatz von anti-IL-10 Ak keinen Einfluß.

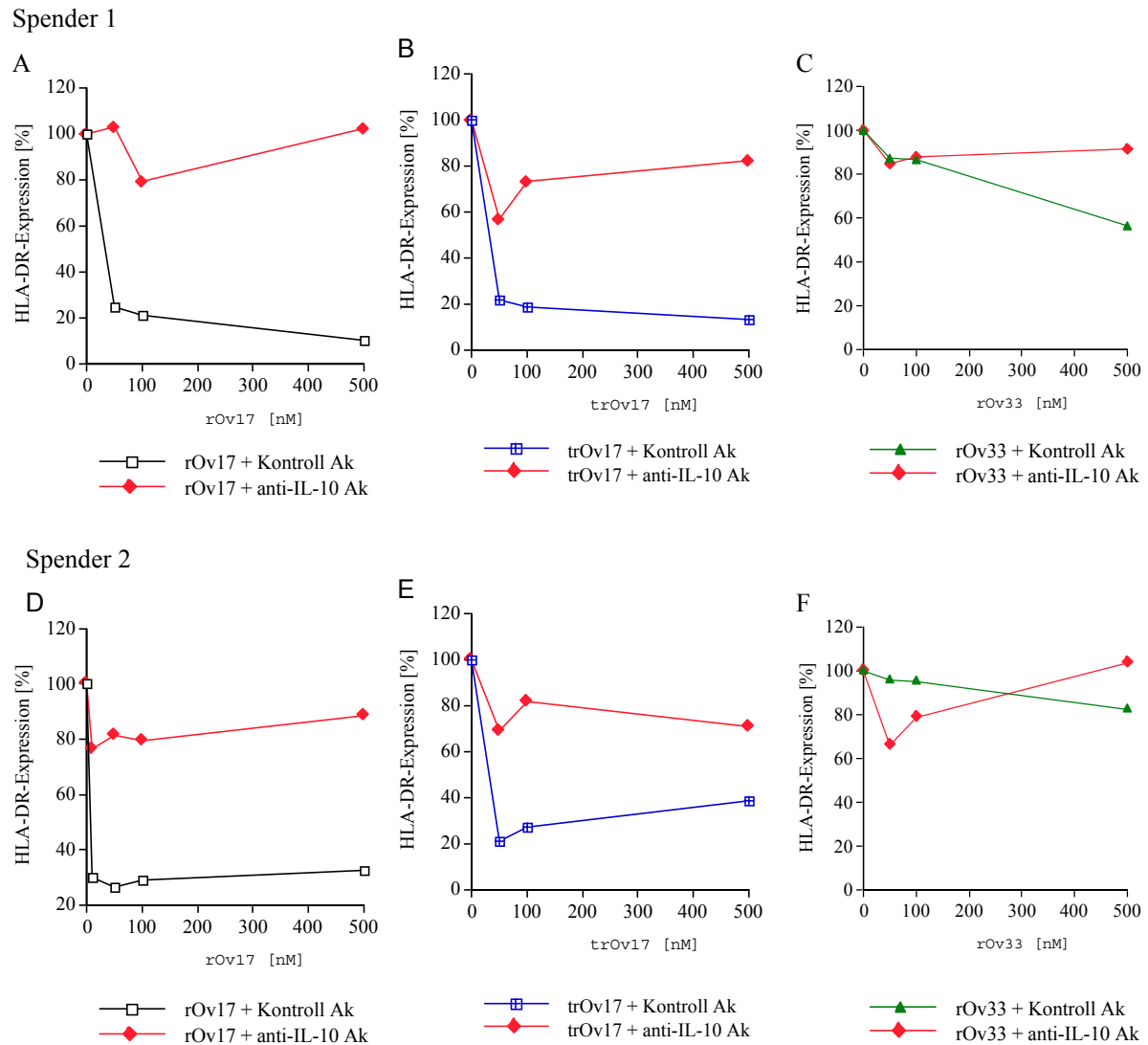


Abb. 26: Neutralisation der supprimierenden Wirkung von rOv17 und trOv17 auf die HLA-DR-Expression durch die Neutralisation von IL-10. PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33 und mit 5 µg/ml anti-IL-10 Ak oder einem Isotyp-Kontroll Ak für 72 h inkubiert. Die HLA-DR-Expression wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Expression von HLA-DR der Monozyten, die mit rOv17, trOv17 und rOv33 inkubiert wurden, im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne rekombinante Proteine. 100% HLA-DR-Expression entsprechen einer mittleren Fluoreszenzintensität von 2000-4000. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 unabhängigen Versuchen mit 2 Spendern. A-C: Spender 1. D-F: Spender 2.

3.3.7.2 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Expression kostimulatorischer Moleküle humaner Monozyten nach Neutralisation von IL-10

Die Neutralisation der durch rOv17 und trOv17 induzierten IL-10 Produktion verhindert die durch rOv17 und trOv17 induzierte Suppression der Expression von CD40 und CD86 und führt darüber hinaus zu einer verstärkten Expression von CD40, CD86 und auch CD86, wobei insbesondere die Expression von CD80 und CD86 um das 2-4 fache erhöht ist (Abb. 27-29). Im Vergleich zum rOv17 und trOv17 hat die Neutralisation von IL-10 auf die Wirkung von rOv33 bezüglich der Expression von CD40 und CD80 keinen Effekt (Abb. 27, 28). In Bezug auf die CD86-Expression induziert die Neutralisation von IL-10 im rOv33-Kontrollansatz eine verstärkte CD86-Expression (Abb. 29).

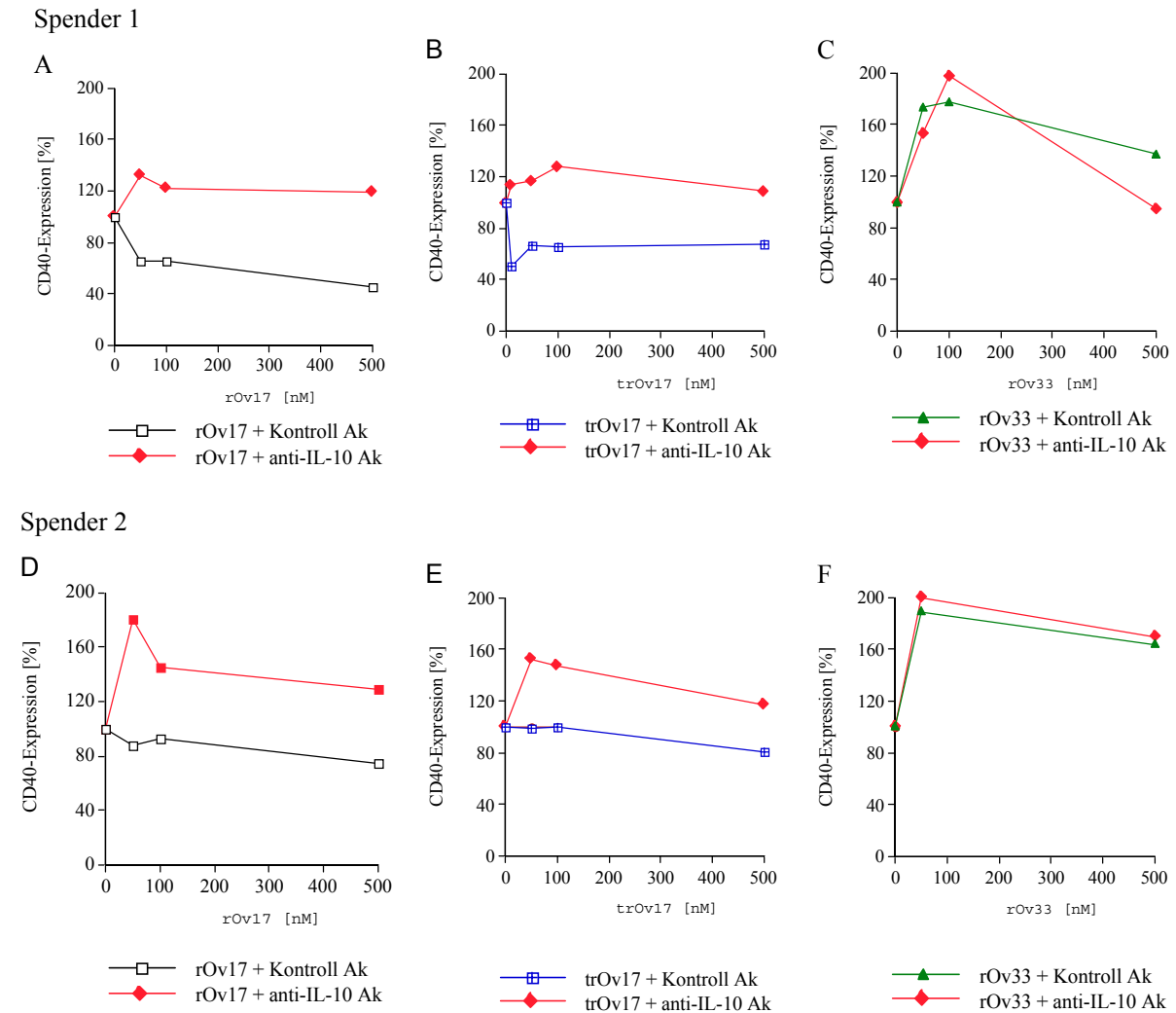
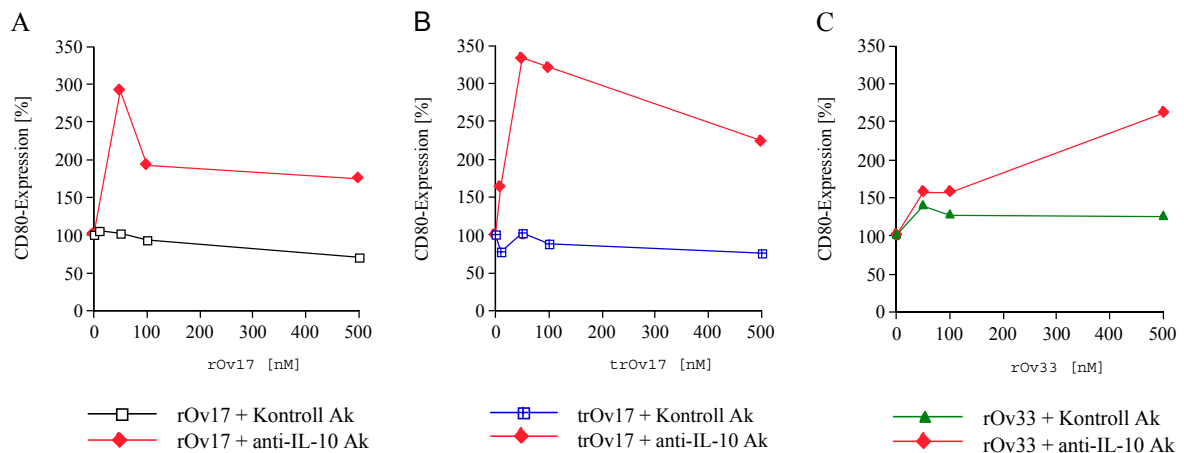
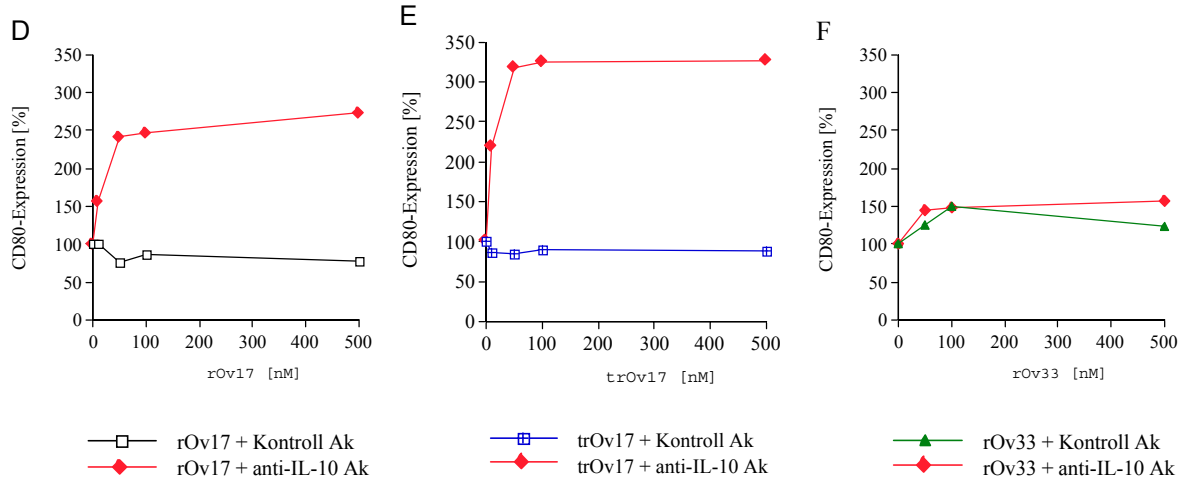


Abb. 27: Neutralisation der supprimierenden Wirkung von rOv17 und trOv17 auf die CD40-Expression durch die Neutralisation von IL-10. PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17, trOv17, rOv33 und mit 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-IL-10 Ak oder 5 $\mu\text{g/ml}$ Isotyp-Kontroll Ak für 72 h inkubiert. Die Expression von CD40 wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Dargestellt ist die prozentuale Expression von CD40 der mit rOv17, trOv17 und rOv33 inkubierten Monozyten im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne rOv17, trOv17 und rOv33. 100% CD40-Expression entsprechen einer mittleren Fluoreszenzintensität von 120-200. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 unabhängigen Versuchen mit 2 Spendern. A-C: Spender 1. D-F: Spender 2.

Spender 1

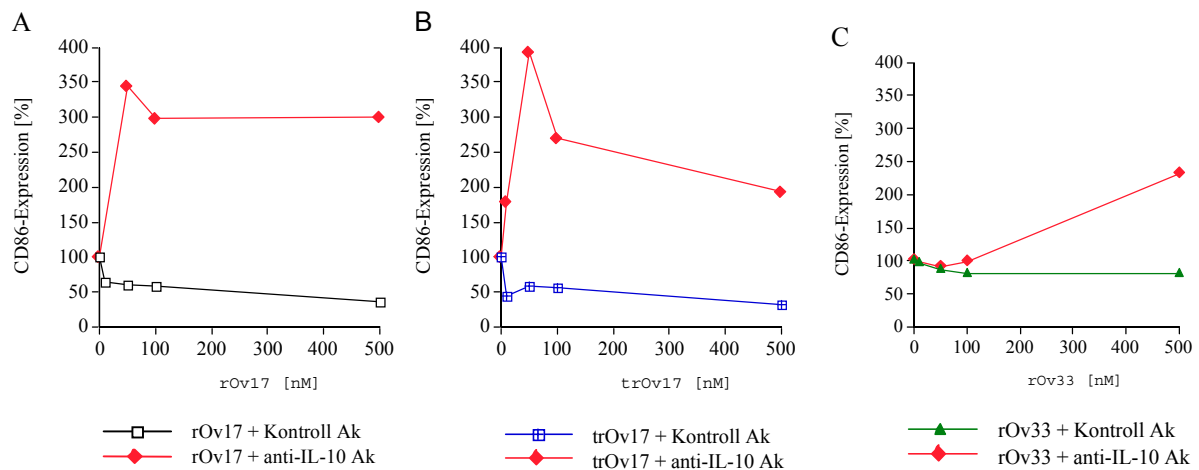


Spender 2

**Abb. 28: Expression von CD80 in Anwesenheit von rOv17 und neutralisierenden anti-IL-10 Ak.**

PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33 und mit 5 µg/ml anti-IL-10 Ak oder mit 5 µg/ml eines Isotyp-Kontroll Ak für 72 h inkubiert. Die Monozyten wurden durch PE-Cy5-markierte anti-CD14 Ak identifiziert und die Expression von CD80 durch FITC-markierte anti-CD80 Ak im Durchflußzytometer quantifiziert. Dargestellt ist die prozentuale CD80-Expression der Monozyten, die mit rOv17, trOv17 und rOv33 inkubiert wurden, im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne rOv17, trOv17 und rOv33. 100% CD80-Expression entsprechen einer mittleren Fluoreszenzintensität von 30-60. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit 2 Spendern. A-C: Spender 1. D-F: Spender 2.

Spender 1



Spender 2

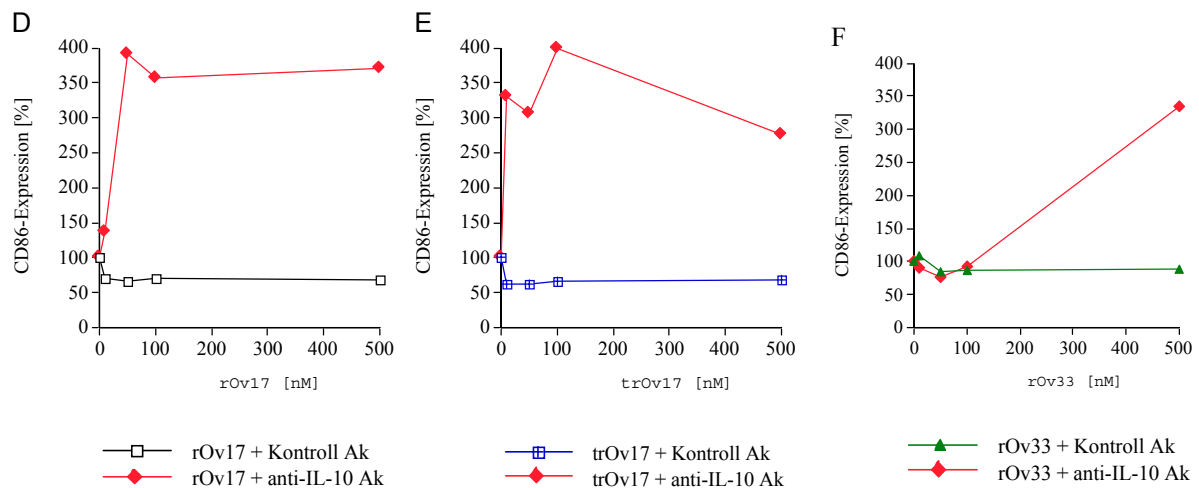


Abb. 29: Neutralisation der supprimierenden Wirkung von rOv17 und trOv17 auf die CD86-Expression durch die Neutralisation von IL-10. Die PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33 und mit 5 µg/ml anti-IL-10 Ak oder mit 5 µg/ml des Isotyp-Kontroll Ak für 72 h inkubiert. Die Expression von CD86 wurde nach der Markierung mit PE-konjugierten anti-CD86 Ak im Durchflußzytometer quantifiziert. Dargestellt ist die prozentuale CD86-Expression der Monozyten, die mit rOv17, trOv17 und rOv33 inkubiert wurden, im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne rekombinante Proteine. 100% CD86-Expression entsprechen einer mittleren Fluoreszenzintensität von 250-350. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit 2 Spendern. A-C: Spender 1. D-F: Spender 2.

3.3.7.3 Zytokinproduktion von stimulierten humanen PBMC in Anwesenheit von rOv17, trOv17 und neutralisierenden anti-IL-10 Ak

rOv17 und trOv17 supprimieren die IL-12 und IFN- γ Produktion von stimulierten humanen PBMC. Die Neutralisation der durch rOv17 und trOv17 induzierten verstärkten IL-10 Produktion sollte zeigen, inwieweit IL-10 die verminderte IL-12 und IFN- γ Produktion bedingt. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 dargestellt. Eine Neutralisation von IL-10 kann die durch rOv17 und trOv17 induzierte IL-12 Produktion nicht regenerieren (Abb. 30A). Im Vergleich dazu, wird die verminderte IFN- γ Produktion, die nur durch trOv17 statistisch signifikant inhibiert wurde, durch die Neutralisation von IL-10 vollständig regeneriert (Abb. 30B). Darüber hinaus bedingt die Neutralisation von IL-10 in allen Ansätzen eine stark erhöhte IFN- γ Produktion.

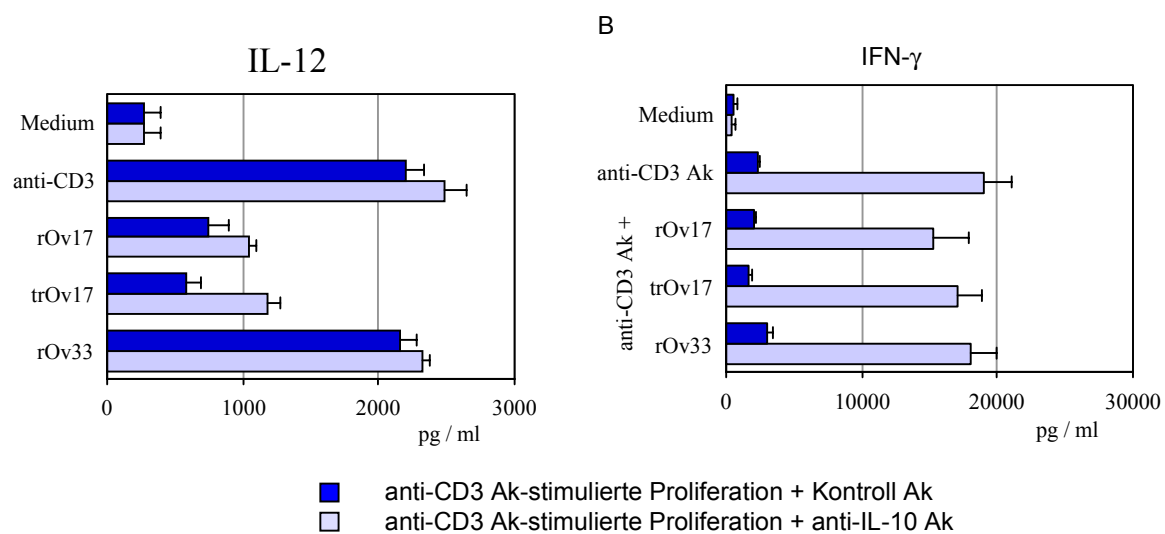


Abb. 30: Zytokinproduktion von stimulierten humanen PBMC in Anwesenheit von rOv17, trOv17 und neutralisierenden Ak. Humane PBMC von 4 Spendern wurden mit immobilisierten anti-CD3 Ak stimuliert und mit 0,5 μ M rOv17, trOv17 und rOv33 für 48 h inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zytokinproduktion \pm SEM. A: IL-12 Produktion. B: IFN- γ Produktion.

3.3.7.4 Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die polyklonal-stimulierte Proliferation in Anwesenheit neutralisierender anti-IL-10 Ak

Mit der Neutralisation von IL-10 durch anti-IL-10 Ak im Proliferationstest, sollte untersucht werden, ob die erhöhte IL-10 Produktion die verminderte polyklonal-stimulierte Proliferation von rOv17 und trOv17 bedingt. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 dargestellt. Die Neutralisation von IL-10 hebt die rOv17 und trOv17-induzierte verminderte polyklonal-stimulierte Proliferation nicht auf.

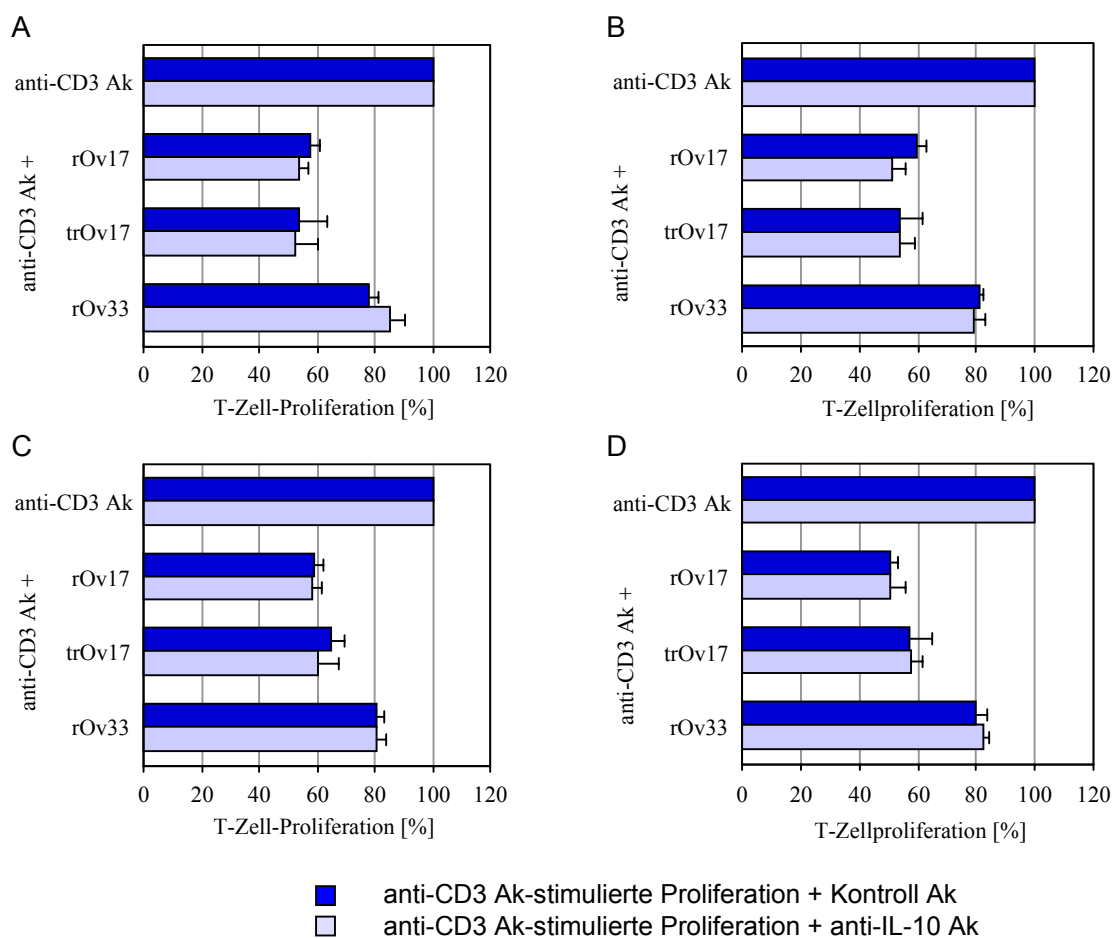


Abb. 31: Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Proliferation nach Neutralisation von IL-10. Anti-CD3 Ak-stimulierte PBMC wurden mit 0,5 μ M rOv17, trOv17 und rOv33 und mit 5 μ g/ml anti-IL-10 Ak inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Isotyp-Kontroll Ak eingesetzt. Dargestellt sind die Proliferationswerte [%] von 4 Spendern im Vergleich zur entsprechenden anti-CD3 Ak-Kontrolle.

4 DISKUSSION

Filarien sind in der Lage ihr immunologisches Umfeld zu modulieren und können dadurch für lange Zeit im Wirt überleben. In dieser Arbeit wurde das immunmodulierende Potential eines Cysteinproteasen-Inhibitors der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* untersucht. Der Cysteinproteasen-Inhibitor wurde erstmals von Lustigman et al. (1991, 1992) beschrieben. Für die Funktion des Inhibitors postulieren die Autoren die Regulation der Aktivität von Cysteinproteasen, die an der Häutung von der L3 zur L4 beteiligt sind (Lustigman et al. 1996). Die vorliegende Arbeit zeigt, daß Onchocystatin nicht nur physiologische Funktionen für den Parasiten besitzt, sondern darüber hinaus immunmodulierend wirksam ist.

4.1 Immunmodulierende Eigenschaften der rekombinanten *O. volvulus* Cystatine

4.1.1 Inhibition der antigenspezifischen Proliferation durch rOv17 und trOv17

Filarieninfektionen sind chronisch verlaufende Erkrankungen, die durch eine lange Persistenz der Erreger im Wirt charakterisiert sind und bei einem Großteil der Infizierten zu einer klinisch manifesten Erkrankung führen. Der Immunstatus dieser Personen ist dabei durch eine zelluläre Hyporeaktivität und eine Typ 2 - und Typ 3 Immunantwort gekennzeichnet.

Um zu analysieren, ob Onchocystatin an der Herausbildung eines hyporeaktiven Immunstatus des Wirtes beteiligt ist, wurde das immunmodulierende Potential von Onchocystatin mit Hilfe der rekombinant hergestellten Onchocystatine, rOv17 und trOv17, charakterisiert. Eine mögliche Beteiligung von rOv17 und trOv17 an der Herausbildung einer zellulären Hyporeaktivität wurde in antigenspezifischen Proliferationsstudien untersucht. Dabei wurde der Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die antigenspezifische Proliferation von humanen PBMC, als auch auf die filarienantigenspezifische Proliferation von Milzzellen immunisierter BALB/c Mäuse untersucht. In beiden Fällen wird die antigenspezifische Proliferation durch rOv17 und trOv17 inhibiert.

Eine erfolgreiche antigenspezifische Proliferation ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Sie setzt die Aufnahme, die Prozessierung und Präsentation von Antigen durch APZ voraus, und sie bedarf der Wirkung modulierender Signale, die sowohl durch membranständige Moleküle (wie z. B. CD86 (B7-1), CD80 (B7-2), CD40, B7H1 und B7h), als auch durch lösliche Mediatoren (Zytokine, Chemokine) vermittelt werden. Eine Beeinflussung der antigenspezifischen Proliferation ist daher auf vielfältige Art und Weise möglich. Aufgrund der biologischen Eigenschaft von rOv17 und auch von trOv17, die Aktivität von Cysteinproteasen der Papain-Superfamilie zu inhibieren, war zu vermuten, daß die Inhibition der Aktivität einer Wirtscysteinprotease, und somit eine Interaktion mit der Prozessierung und Präsentation von Antigen, Ursache für die rOv17 und trOv17 induzierte verminderte antigenspezifische Proliferation ist. Daß Cysteinproteasen-Inhibitoren ein derartiges immunmodulierendes Potential besitzen, haben Studien von Katunuma et al. (1994) gezeigt. Unter Verwendung des Cathepsin B-spezifischen Inhibitors CA074 haben die Autoren gezeigt, daß eine verminderte Prozessierung von Antigen durch die Inhibition der Aktivität von Cathepsin B eine verminderte antigenspezifische Proliferation zur Folge hat.

4.1.2 Bindung und Aufnahme von rOv17 und trOv17 durch Monozyten

Eine Interaktion von rOv17 mit Wirtscysteinproteasen von APZ, die an der Prozessierung und Präsentation von Antigen beteiligt sind, setzt voraus, daß rOv17 und trOv17 von APZ aufgenommen werden und mit Cysteinproteasen in einen direkten Kontakt kommen. Die Bindung und Aufnahme von rOv17 und trOv17 durch Monozyten wurde durch die Untersuchungen mit Fluos-markierten rOv17 und trOv17 gezeigt.

Die Aufnahme von Antigen durch APZ aus dem extrazellulären Kompartiment erfolgt über verschiedene Mechanismen, denen gemeinsam ist, daß sie die aufgenommenen Antigene in das endosomal-lysosomale Kompartiment entlassen (Lanzavecchia 1990, Guagliardi et al. 1990, Watts et al. 1997). Dies bedeutet, daß auch rOv17 und trOv17 mit großer Wahrscheinlichkeit in das endosomal-lysosomale Kompartiment gelangen und hier mit humanen Cysteinproteasen interagieren können.

4.1.3 Inhibition der Aktivität von humanem Cathepsin L und S durch rOv17 und trOv17

Die Fähigkeit von rOv17 und trOv17 die Aktivität von humanen Cysteinproteasen, wie Cathepsin B, L und S, zu beeinflussen, wurde in enzymkinetischen Untersuchungen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i gezeigt. Dabei ist rOv17 ein potenter Inhibitor von Cathepsin L und S ($K_i=0,03$ nM). Das verkürzte trOv17 hat im Vergleich mit einem K_i von 11,5 nM für Cathepsin L und einem K_i von 29,6 nM für Cathepsin S eine geringere Affinität. Das Fehlen des N-Terminus' und damit des konservierten, N-terminalen aktiven Bereiches bedingt somit eine um das 300 bzw. 900 fache verminderte Affinität von trOv17 zu Cathepsin L und S, was bedeutet, daß die N-terminale aktive Domäne für Onchocystatin eine wichtige funktionelle Komponente des Moleküls ist. Dies ist ein Strukturmerkmal, welches auch für andere Vertreter der Cystatine beschrieben worden ist (Machleidt et al. 1989, Abrahamson et al. 1991, Lindahl et al. 1992, Hall et al. 1993, Bjork et al. 1995). Trotz der verminderten Affinität von trOv17 zu den Cathepsinen L und S, ist auch das verkürzte trOv17 noch in der Lage, die Aktivität dieser beiden Cathepsine zu inhibieren, was auf die inhibitorische Wirkung der beiden C-terminalen aktiven Bereiche des Cystatins zurückzuführen ist (Auerswald et al.1995, Hall et al. 1995, Bjork et al. 1996). Die Aktivität von Cathepsin B wird von rOv17 und trOv17 kaum beeinflusst. Dies liegt vermutlich an der strukturellen Besonderheit von Cathepsin B, welches am N-Terminus ein „occluding loop“ besitzt, der den Zugang zum aktiven Zentrum der Protease für den Inhibitor blockiert (Illy et al. 1997).

Die Inhibition der Cysteinproteasen durch rOv17 und trOv17 ist für Cathepsin L bei einem pH von 5,5 und für Cathepsin S und B bei einem pH von 6,0 gezeigt worden. Dies bedeutet, daß rOv17 und trOv17 potentiell in der Lage sind, auch im sauren Milieu des endosomal-lysosomalen Kompartiment die Aktivität humaner Cathepsine zu beeinflussen.

Cysteinproteasen antigenpräsentierender Zellen katalysieren im Verlauf einer Immunantwort zwei wichtige proteolytische Prozesse. So sind Cathepsine an der Proteolyse von Antigen, zur Generierung antigenen Peptide, die nachfolgend an MHC-II-Moleküle binden können, beteiligt. Zum zweiten katalysieren Cathepsine die Degradation der Invarianten Kette (Ii), welche die Voraussetzung für die Bindung der Peptide an MHC-II-Moleküle und den

anschließenden Transport der Peptid-MHC-II-Komplexe an die Zelloberfläche darstellt (Wolf und Ploegh 1995, Roche und Cresswell 1990). An beiden Prozessen sind Cathepsin L und S beteiligt, deren Aktivität von rOv17 und auch trOv17 inhibiert wird. Cathepsin L ist an der Prozessierung von Antigen und in Thymusepithelzellen essentiell an der Degradation von li beteiligt (Nakagawa et al. 1998, 1999a). Cathepsin S ist an der Prozessierung von Antigen beteiligt und in B-Zellen und Dendritischen Zellen (DZ) für die Spaltung von li verantwortlich (Riese et al. 1996, Nakagawa et al. 1999b). Eine Inhibition von Cathepsin S führt daher zu einer Akkumulation von li-assoziierten MHC-II-Molekülen in der Zelle und zu einer verminderten antigenspezifischen Proliferation. Die verminderte Proliferation ist dabei auf die unvollständige Spaltung von li und die damit verbundene verminderte Generierung von Peptid-MHC-II-Komplexen zurückzuführen (Riese et al. 1998). Auch die Reifung von DZ zu effizienten APZ, die u. a. durch eine verstärkte Oberflächenexpression von Peptid-MHC-II-Komplexen gekennzeichnet ist, wird über die Aktivität von Cathepsin S reguliert (Pierre und Mellman 1998). Während der Reifung von DZ nimmt die Aktivität von Cathepsin S zu und führt durch die verstärkte Spaltung von li zu einer verstärkten Expression von Peptid-MHC-II-Komplexen an der Oberfläche.

Ein weiteres Cathepsin, das spezifische Funktionen im Verlauf einer Immunantwort katalysiert, welches uns aber für Inhibitionsstudien mit rOv17 und trOv17 nicht zur Verfügung stand, ist Cathepsin F. Erst kürzlich wurde gezeigt, daß Cathepsin F essentiell an der Degradation von li in Makrophagen beteiligt ist (Shi et al. 2000). Cathepsin F ist somit ein weiteres Cathepsin, welches die Effizienz der Antigenpräsentation mitbestimmt, und deren Inhibition eine verminderte Antigenpräsentation bedingen würde.

Die Fähigkeit von rOv17 und trOv17, die Aktivität humaner Cathepsine zu inhibieren, ließ vermuten, daß rOv17 und trOv17 infolge einer verminderten Generierung von Peptid-MHC-II-Komplexen eine verminderte antigenspezifische Proliferation induzieren. rOv17 sollte dabei aufgrund des stärkeren inhibitorischen Potentials gegenüber Cathepsin L und S immunmodulatorisch potenter sein als trOv17. rOv17 und trOv17 inhibieren die antigenspezifische Proliferation von humanen PBMC jedoch gleichermaßen stark. Ursache hierfür könnte sein, daß das inhibitorische Potential von trOv17 ausreichend ist, die Aktivität der Cathepsine wirksam zu inhibieren. Denkbar ist auch, daß es neben den Cathepsinen andere Cysteinproteasen gibt, die essentielle Funktionen im Verlauf einer antigenspezifischen

Proliferation übernehmen und gleichermaßen stark von rOv17 und trOv17 inhibiert werden. Die Inhibition der Aktivität von papainähnlichen Cysteinproteasen durch Cystatine wird durch drei konservierte Bereiche in der Sequenz der Cystatine vermittelt. Die wichtigste inhibitorische Komponente ist dabei die N-terminale aktive Domäne. Da dem verkürzten trOv17 diese N-terminale inhibitorische Domäne fehlt, ist eine gleichwertige Inhibition der Aktivität von Cathepsinen durch trOv17 im Vergleich zum rOv17, wenig wahrscheinlich.

Cystatine regulieren aber nicht nur die Aktivität von papainähnlichen Cysteinproteasen, sondern Vertreter der Typ 2-Cystatine können auch die Aktivität von Cysteinproteasen der Legumain-Superfamilie beeinflussen (Alvarez-Fernandez et al. 1999). Zu den Cystatinen, die die Aktivität von Legumain inhibieren, gehören Cystatin C, E/M und F. Diese Cystatine besitzen für die Inhibition der Legumaine neben der inhibitorischen Domäne für die Interaktion mit den Cathepsinen noch eine zweite inhibitorische Domäne auf dem Molekül, welche die inhibitorisch wichtige AS -Arg- an Position 39 (Die Numerierung entspricht der für humanes Cystatin C.) umfaßt. Interessanterweise weist Onchocystatin im Bereich dieser zweiten inhibitorischen Domäne AS-Homologien mit den Cystatinen C, E/M und F auf und besitzt an entsprechender Position die AS -Arg-. Onchocystatin hat damit die strukturelle Voraussetzung für eine Inhibition der Aktivität von humanem Legumain, einer Cysteinprotease, für die bisher gezeigt werden konnte, daß sie an der Prozessierung von Antigen beteiligt ist und für die eine weitere funktionelle Charakterisierung im Zusammenhang mit der Antigenpräsentation noch aussteht (Manoury et al. 1999).

Da rOv17 und auch trOv17 die inhibitorische Domäne für die Interaktion mit Legumainen besitzen, und damit die Voraussetzung erfüllen, die Aktivität von Legumainen zu beeinflussen, ist es denkbar, daß rOv17 und trOv17 die Aktivität dieser Cysteinproteasen mit ähnlicher Affinität inhibieren, da der N-Terminus der Cystatine, im Gegensatz zur Interaktion mit den Cathepsinen, bei der Inhibition der Legumaine keine Rolle spielt. Die Bedeutung einer möglichen Interaktion von rOv17 und trOv17 mit Legumain im Zusammenhang mit der verminderten antigenspezifischen Proliferation kann jedoch aufgrund fehlender Kenntnisse über die Funktion von Legumain und fehlender Inhibitionsstudien mit rOv17 und trOv17 noch nicht beurteilt werden.

Die filarienantigenspezifische Proliferation von Milzzellen immunisierter BALB/c Mäuse wird ebenfalls durch rOv17 und trOv17 inhibiert. Im Unterschied zur antigenspezifischen Proliferation humaner PBMC ist die Inhibition der filarienantigenspezifischen Proliferation durch rOv17 effizienter und das verkürzte trOv17 induziert im Vergleich zum rOv17 eine geringere Inhibition der Proliferation. Im Falle der Inhibition der Aktivität von Cysteinproteasen durch rOv17 und trOv17, würde dies wiederum eine verminderte Generierung von Peptid-MHC-II-Komplexen und eine verminderte antigenspezifische Proliferation bedingen. Das stärkere inhibitorische Potential von rOv17 gegenüber Cathepsinen könnte dabei Ursache der potenteren Inhibition der antigenspezifischen Proliferation der Mausmilzzellen durch rOv17 im Vergleich zum trOv17 sein.

Der Vergleich der immunmodulierenden Wirkung von rOv17 auf die antigenspezifische Proliferation verdeutlicht, daß die PPD-spezifische Proliferation humaner PBMC mit 45% weniger potent inhibiert wird als die filarienantigenspezifische Proliferation von Mausmilzzellen mit 90%. Die stärkere Inhibition der filarienantigenspezifischen Proliferation von Mausmilzzellen durch rOv17 hat vermutlich verschiedene Ursachen. Wenn diese immunmodulierende Eigenschaft auf die Inhibition der Aktivität einer Wirtscysteinprotease zurückzuführen ist, kann dies bedeuten, daß rOv17 murine Cathepsine mit stärkerer Potenz inhibiert als humane Cathepsine. Dies wiederum würde zur Folge haben, daß aufgrund einer unterschiedlichen immunmodulierenden Potenz von rOv17 und trOv17 im Mausmodell im Vergleich zum humanen System ein direkter Vergleich der Ergebnisse beider Systeme nicht möglich ist.

Zum anderen könnte die unterschiedliche Effizienz von rOv17 bei der Inhibition der antigenspezifischen Proliferation von humanen PBMC und Mausmilzzellen auf die Beteiligung unterschiedlicher Populationen von APZ in beiden Systemen zurückzuführen sein. So verfügen Mausmilzzellen über Makrophagen, dendritische Retikulumzellen und B-Zellen als APZ. PBMC besitzen hingegen Monozyten und B-Zellen. APZ unterscheiden sich in ihrer Ausstattung mit Cathepsinen. Jede APZ-Population verfügt über ein spezifisches Repertoire an Cathepsinen, die für jede APZ entsprechend spezifische Funktionen katalysieren. So ist beispielsweise in B-Zellen und DZ Cathepsin S für die Degradation von *Ii* essentiell, in Makrophagen übernimmt diese Funktion Cathepsin F und in Thymusepithelzellen Cathepsin L (Riese et al. 1996, Nakagawa et al. 1998, Shi et al. 2000).

Daher ist denkbar, daß aufgrund der unterschiedlichen Cathepsinausstattung von APZ und einer unterschiedlichen inhibitorischen Potenz von rOv17 gegenüber Cathepsinen, die Wirkung von rOv17 auf die verschiedenen APZ-Populationen unterschiedlich ist.

APZ unterscheiden sich auch in ihren Mechanismen und in der Effizienz, Antigen aufzunehmen, was zur Folge haben kann, daß die wirksamen Konzentrationen von rOv17 in den APZ unterschiedlich ist und deshalb ein unterschiedliches inhibitorisches Verhalten von rOv17 bezüglich der antigenspezifischen Proliferation zu beobachten ist.

Die Unterschiede im inhibitorischen Potential können desweiteren unabhängig von der Inhibition der Aktivität einer Cysteinprotease durch die Aktivierung unterschiedlich differenzierter Gedächtniszellen durch PPD bzw. durch *O. volvulus*-Antigen hervorgerufen werden. So könnte beispielsweise die Immunisierung mit *O. volvulus*-Antigen eine verstärkte Bildung von Th2 oder Th3-differenzierten Gedächtniszellen hervorrufen, die bei der Restimulation *in vitro* eine verstärkte Bildung von supprimierend wirkenden Zytokinen, wie IL-10 und TGF- β induzieren, und die den supprimierenden Effekt von rOv17 zusätzlich verstärken.

4.1.4 Einfluß von EwC und E64 auf die antigenspezifische Proliferation

Die potente Inhibition der Aktivität von humanen Cathepsinen durch rOv17 ließ die Interaktion mit Cathepsinen als Ursache der durch rOv17 induzierten verminderten antigenspezifischen Proliferation vermuten. Um zu untersuchen, ob auch andere Cysteinproteasen-Inhibitoren ein solches immunmodulierendes Potential besitzen, wurden EwC und E64 getestet. EwC ist ein Vertreter der Typ 2-Cystatine. Die Sequenzen von EwC und rOv17 sind zu 31% identisch. E64 ist ein irreversibler Cysteinproteasen-Inhibitor, welcher erstmals aus Kulturextrakten von *Aspergillus japonicum* isoliert wurde. Die Ergebnisse des Proliferationstests mit PPD-stimulierten humanen PBMC zeigen, daß EwC und E64 keinen Einfluß auf die T-Zell-Proliferation haben. EwC und E64 vermögen weder bei einer Konzentration von 0,5 μ M, noch bei einer Konzentration von 2,5 μ M (Daten nicht gezeigt) die antigenspezifische Proliferation zu inhibieren.

Daß Cysteinproteasen-Inhibitoren wie E64 dennoch die Eigenschaft besitzen, die antigenspezifische Proliferation zu inhibieren, haben Untersuchungen von Katunuma et al. (1994) gezeigt. E64 wurde bei diesen Untersuchungen allerdings in Konzentrationen von 11 μM eingesetzt. Auch in anderen Studien, bei denen die Inhibition von Cysteinproteasen durch Leupeptin charakterisiert wurde, mußten höhere Konzentrationen des Inhibitors eingesetzt werden (420 μM), um einen Effekt zu erzielen (Vidard et al. 1991, Puri et al. 1988).

Im Vergleich zu diesen Ergebnissen besteht die Besonderheit von rOv17 somit darin, die antigenspezifische Proliferation bereits in niedrigen Konzentrationen effektiv zu inhibieren. Wenn die durch rOv17 und trOv17 bedingte verminderte antigenspezifische Proliferation durch eine Inhibition der Aktivität einer Wirtscysteinprotease verursacht wird, würde dies bedeuten, daß es Wirtscysteinproteasen geben muß, die essentielle Reaktionen im Verlauf einer antigenspezifischen Proliferation katalysieren und deren Aktivität durch rOv17 und trOv17 mit hoher Affinität inhibiert werden, nicht aber bzw. nur mit geringer Affinität durch EwC und E64.

Eine Cysteinprotease, die vermutlich durch rOv17 mit hoher Affinität inhibiert wird, könnte humanes Cathepsin X sein, eine Cysteinprotease, die im menschlichen Organismus ubiquitär verbreitet ist (Nagler und Menard 1998). Humanes Cathepsin X zeigt eine 75%ige Homologie zu einer *O. volvulus* Cysteinprotease, die als die Häutungsprotease beschrieben wurde, deren Aktivität vermutlich von Onchocystatin reguliert wird (Lustigman et al. 1996). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von Cathepsin X und der Parasitenprotease wäre eine potente Inhibition von Cathepsin X durch rOv17 denkbar. Da aber das inhibitorische Potential von rOv17 gegenüber Cathepsin X noch nicht untersucht wurde, und auch die Funktion dieser Protease noch nicht bekannt ist, bleibt diese Interaktion von rOv17 und Cathepsin X als eine Ursache der Inhibition der antigenspezifischen Proliferation durch rOv17 hypothetisch.

Cystatine und E64 sind Inhibitoren von Cysteinproteasen der Papain-Superfamilie, zu denen auch die humanen Cathepsine gehören. Einige Vertreter der Typ 2-Cystatine besitzen darüber hinaus die Eigenschaft, die Aktivität von Cysteinproteasen der Legumain-Superfamilie zu inhibieren (Alvarez-Fernandez et al. 1999). E64 ist im Gegensatz dazu nicht in der Lage, die Aktivität von Legumainen zu beeinflussen. Die Eigenschaft von Typ 2-Cystatinen, die Aktivität von Legumainen zu inhibieren, liegt in einem zweiten inhibitorischen Bereich um die AS -³⁹Arg- (Die Numerierung entspricht der des humanen Cystatin C) begründet. rOv17

und trOv17, aber auch EwC besitzen diese inhibitorische Domäne, und wären somit potentiell in der Lage die Aktivität von Legumainen zu beeinflussen. Ob eine Interaktion der Inhibitoren mit Legumain eine Bedeutung bei der Beeinflussung der antigenspezifischen Proliferation besitzt, und ob ein unterschiedliches inhibitorisches Potential von rOv17, trOv17 und EwC gegenüber Legumain das unterschiedliche Verhalten bei der Inhibition der antigenspezifischen Proliferation bedingt, kann nicht beurteilt werden. Zum einen fehlen Untersuchungen, die die inhibitorische Potenz von rOv17, trOv17 und EwC gegenüber Legumain charakterisieren, und zum anderen ist eine weitere funktionelle Charakterisierung von Legumain im Zusammenhang mit der antigenspezifischen Proliferation nötig.

Das Unvermögen von EwC und E64 die antigenspezifische Proliferation in der verwendeten Konzentration zu inhibieren, kann aber auch bedeuten, daß die durch rOv17 und trOv17 induzierte verminderte antigenspezifische Proliferation nicht auf eine Modulation einer Wirtscysteinprotease zurückzuführen ist und rOv17 und trOv17 über andere Mechanismen Einfluß auf die antigenspezifische Proliferation nehmen.

Der fehlende inhibitorische Effekt von EwC und E64 kann möglicherweise aber auch darauf zurückgeführt werden, daß EwC und E64 nicht oder nicht in ausreichender Konzentration in das endosomal-lysosomale Kompartiment gelangen konnten und / oder hier sehr schnell inaktiviert wurden.

4.1.5 Inhibition der HLA-DR-Expression von humanen Monozyten durch rOv17 und trOv17

Die Untersuchungen zur Expression von HLA-DR, einem Haplotyp der MHC-II-Moleküle, auf humanen Monozyten zeigen, daß rOv17 und auch trOv17 die Expression dieses Oberflächenmoleküls vermindern. rOv17 und trOv17 reduzieren dadurch die Kapazität dieser Zellen, Antigen zu präsentieren.

MHC-II-Moleküle sind auf APZ konstitutiv exprimiert. Die Stärke der Expression wird durch verschiedene Mediatoren reguliert. Zytokine wie IFN- γ , GM-CSF, TNF- α und IL-4 stimulieren und Zytokine wie IL-10 und TGF- β vermindern die Expression von MHC-II auf Monozyten (Sztein et al. 1984, te Velde et al. 1988, de Waal Malefyt et al. 1991a, Williams et

al. 1999). Posttranslational kann die Expression von MHC-II durch die Aktivität von li-degradierenden Cysteinproteasen beeinflusst werden. Pierre und Mellman (1998) haben gezeigt, daß die mit der Reifung von DZ verbundene verstärkte Expression von MHC-II auf eine verstärkte Aktivität der li-spaltenden Cysteinprotease Cathepsin S zurückzuführen ist. Die Aktivität von Cathepsin S wird dabei durch Cystatin C, einem endogenen Cysteinproteasen-Inhibitor reguliert. Ein Cysteinproteasen-Inhibitor ist damit entscheidend bei der Regulation der Expression von Peptid-MHC-II-Komplexen auf der Oberfläche von DZ beteiligt. Neben li-degradierenden Cathepsinen muß es weitere Mechanismen geben, die die posttranslationale Expression von MHC-II regulieren. Dies geht aus Studien mit Cathepsin S - und Cathepsin L defizienten Mäuse hervor (Villadangos et al. 1999). Trotz Akkumulation von li-Fragment (lip 10)-MHC-II-Komplexen in DZ oder in Thymusepithelzellen der Cathepsin S – bzw. Cathepsin L defizienten Mäusen ist die Gesamtzahl der exprimierten MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle unverändert. Dabei konnte gezeigt werden, daß auf der Oberfläche lip10-MHC-Komplexe, aber auch Peptid-beladene MHC-II-Komplexe exprimiert wurden.

Eine Beeinflussung der Expression von HLA-DR durch rOv17 und trOv17 ist auf vielfältige Art und Weise möglich. Eine Inhibition der Aktivität einer Wirtscysteinprotease durch rOv17 und trOv17 würde eine verminderte Generierung und Expression von Peptid-MHC-II-Komplexen auf der Oberfläche der Monozyten bedingen. Die Gesamtzahl der exprimierten MHC-II-Moleküle wird dabei vermutlich nicht beeinflusst, was im Ergebnis der Untersuchungen mit Cathepsin S - und Cathepsin L defizienten Mäusen zu schlußfolgern ist. Es ist daher wahrscheinlich, daß die verminderte HLA-DR-Expression durch rOv17 und trOv17 nicht durch die Inhibition der Aktivität humaner Cathepsine bedingt ist, sondern, daß rOv17 und trOv17 die HLA-DR-Expression über einen anderen Mechanismus beeinflussen.

4.1.6 Polyklonal-stimulierte Proliferation von humanen PBMC und von Monozyten-depletierten PBMC

rOv17 und auch trOv17 beeinflussen die antigenspezifische Proliferation und inhibieren die HLA-DR-Expression auf humanen Monozyten. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der verminderten antigenspezifischen Proliferation und der verminderten HLA-DR-Expression beurteilen zu können, wurde der Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die durch PHA- und immobilisierte anti-CD3 Ak-stimulierte Proliferation untersucht, die unabhängig von der MHC-II-Expression erfolgt (mündliche Mitteilung von Prof. Volk, Charité, Berlin).

Die durch PHA- und immobilisierte anti-CD3 Ak-stimulierte Proliferation von humanen PBMC wird durch rOv17 um 40% und durch trOv17 um 32% inhibiert. Im Vergleich zur antigenspezifischen Proliferation inhibieren rOv17 und trOv17 die polyklonale Proliferation ähnlich potent. Die polyklonale Stimulation von T-Zellen durch das Mitogen PHA und durch immobilisierte anti-CD3 Ak erfolgt im Unterschied zur antigenspezifischen Proliferation unabhängig von der MHC-II-Expression von Monozyten. Da rOv17 und trOv17 die polyklonal-stimulierte und die antigenspezifische Proliferation ähnlich stark inhibieren, kann die Inhibition der antigenspezifischen Proliferation nicht ausschließlich auf die verminderte HLA-DR-Expression zurückgeführt werden.

Die Inhibition der polyklonal-stimulierten Proliferation verdeutlicht, daß rOv17 und trOv17 unabhängig von der Antigenpräsentation weitere Faktoren, die den Verlauf einer erfolgreichen T-Zell-Proliferation bestimmen, beeinflussen.

Um zu analysieren, welche Zell-Population in ihrer Funktion von rOv17 und trOv17 moduliert wird, wurden Proliferationsstudien mit Monozyten-depletierten humanen PBMC durchgeführt. rOv17 und trOv17 sind nach der Depletion von Monozyten nicht mehr in der Lage, die polyklonal-stimulierte Proliferation von Monozyten-depletierten PBMC zu inhibieren. rOv17 und trOv17 entfalten daher ihre immunmodulierende Wirkung über die Modulation von APZ-Funktionen.

4.1.7 Modulation der Zytokinproduktion durch rOv17 und trOv17

rOv17 und trOv17 modulieren die Zytokinproduktion von Monozyten, indem sie eine verstärkte Produktion von TNF- α und IL-10 induzieren, und auch die IL-12 Produktion modulieren.

TNF- α ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, welches sowohl lokal als auch systemisch wirkt. Neben vielen anderen Funktionen induziert TNF- α die Aktivierung und Differenzierung von Monozyten und moduliert T- und B-Zell-Funktionen (Beutler et al. 1989). TNF- α induziert aber nicht nur eine Entzündungsreaktion, sondern TNF- α bewirkt im weiteren Verlauf einer Entzündungsreaktion auch deren Limitierung, indem TNF- α u. a. die Produktion von IL-10 induziert (Wanidworanum et al. 1993, Meisel et al. 1996, Marino et al. 1997). Die wichtigsten TNF- α Produzenten sind aktivierte Monozyten und Makrophagen, aber auch eine Reihe anderer Zellen (Lymphozyten, NK-Zellen, Neutrophile, Mastzellen usw.) können zur TNF- α Produktion angeregt werden (Beutler et al. 1989, Ware et al. 1992). Eine Aktivierung von Monozyten zur TNF- α Produktion erfolgt u. a. nach einer Stimulation durch bakterielle Komponenten, wie LPS oder Superantigen (Burchett et al. 1988, Scholl et al. 1989).

rOv17 und auch trOv17 induzieren eine starke TNF- α Produktion und schaffen somit zunächst eine proinflammatorische Reaktionslage. Mit der Stimulation von Monozyten, TNF- α zu produzieren, schaffen rOv17 und trOv17 damit aber gleichzeitig die Voraussetzung, durch die nachfolgende Induktion von IL-10, die Entzündungs- und Immunreaktion im weiteren Verlauf zu supprimieren.

IL-10 ist ein potentes immunmodulierendes Zytokin. IL-10 kann von CD4⁺-Lymphozyten, CD8⁺-Lymphozyten, B-Zellen und Keratinozyten gebildet werden. Die potentesten IL-10 Produzenten sind jedoch Monozyten und Makrophagen (de Waal Malefyt et al. 1991a). Die IL-10 Produktion von Monozyten wird u. a. durch die TNF- α und cAMP induzierte Aktivierung von Proteintyrosinkinasen (PTK) und der Proteinkinase A und C (PKA, PKC) induziert (Platzer et al. 1995, 2000, Meisel et al. 1996). IL-10 wirkt immunsupprimierend und antiinflammatorisch (de Waal Malefyt et al. 1991b). Die immunsupprimierende Wirkung von IL-10 beruht auf der Eigenschaft, IL-12 und IFN- γ zu inhibieren und die Antigenpräsentationskapazität von APZ zu vermindern, indem IL-10 die Expression von

MHC-II, die Expression des Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf APZ inhibiert (de Waal Malefyt et al. 1991a, D'Andrea et al. 1993, Ding et al. 1993, Williams et al. 1994). Die Modulation dieser Faktoren bedingt eine IL-10 induzierte verminderte T-Zell-Proliferation. IL-10 vermag aber nicht nur über die Modulation von Monozytenfunktionen die T-Zell-Proliferation zu inhibieren, sondern IL-10 kann auch direkt, durch eine Inhibition der IL-2 Produktion, die T-Zell-Proliferation von CD4⁺-Zellen vermindern (de Waal Malefyt et al. 1993).

rOv17 und trOv17 induzieren eine starke IL-10 Produktion von unstimulierten und stimulierten PBMC, wobei das durch rOv17 und trOv17 induzierte IL-10 von Monozyten gebildet wird, da Monozyten-depletierte PBMC in Anwesenheit von rOv17 und trOv17 kein IL-10 produzieren (Daten nicht gezeigt).

Durch die verstärkte IL-10 Produktion sind rOv17 und trOv17 in der Lage, in ihrem Umfeld eine antiinflammatorische und immunsupprimierende Reaktionslage zu schaffen und über IL-10 eine Vielzahl von Immunfunktionen zu beeinflussen.

IL-12 ist ein Zytokin, welches von Monozyten/Makrophagen und DZ gebildet wird (D'Andrea et al. 1993, Trinchieri 1994). Eine IL-12 Produktion dieser Zellen wird durch verschiedene Stimuli induziert. So können Infektionserreger wie Viren, Bakterien und Protozoen eine IL-12 Produktion induzieren (Trinchieri 1998). Die Stimulation der IL-12 Bildung wird dabei v. a. durch verschiedene Produkte dieser Erreger, wie LPS, Glykolipide, Glykoproteine, bakterielle Superantigene und bakterielle DNA vermittelt (Leung et al. 1995, Cleveland et al. 1996, Grunvald et al. 1996, Ma et al. 1996, Sato et al. 1996, Camargo et al. 1997, Oswald et al. 1997). Weitere Mechanismen, die IL-12 Produktion von APZ zu induzieren, sind die Stimulation der Zellen durch IFN- γ oder GM-CSF und die Stimulation des kostimulatorischen Moleküls CD40 (Cella et al. 1996, Kubin et al. 1994a). Eine Inhibition der IL-12 Produktion wird u. a. durch IL-10, TGF- β und PGE₂ induziert (D'Andrea et al. 1993, van der Pouw Kraan et al. 1995, Toossi et al. 1997). Im Verlauf einer Immunantwort vermittelt IL-12 die Aktivierung von Makrophagen und die Differenzierung von Th1-Zellen. IL-12 ist dadurch ein wichtiger Aktivator der zellvermittelten Immunität (Kobayashi et al. 1989, Chan et al. 1991, Scott 1993, Chehimi et al. 1994, Kubin et al. 1994b).

rOv17 und trOv17 stimulieren die IL-12 Produktion von Monozyten unstimulierter PBMC. Im Gegensatz dazu wird die IL-12 Produktion von polyklonal-stimulierten PBMC durch rOv17

und trOv17 vermindert. Dies bedeutet, daß rOv17 und trOv17 zwar in der Lage sind, die IL-12 Produktion von Monozyten zu stimulieren, im Falle einer Aktivierung der Immunantwort bewirken rOv17 und trOv17 jedoch eine verminderte IL-12 Produktion.

Ein möglicher Mechanismus, die IL-12 Produktion stimulierter PBMC zu inhibieren, ist die durch rOv17 und trOv17 induzierte starke IL-10 Produktion. Da aber auch unstimulierte PBMC /Monozyten von rOv17 und trOv17 zu einer IL-10 Produktion angeregt werden, die IL-12 Produktion in diesem Falle aber nicht supprimiert ist, muß es einen weiteren Mechanismus geben, der die rOv17 und trOv17 induzierte verminderte IL-12 Produktion stimulierter PBMC induziert. Ein wichtiger Mechanismus, der die IL-12 Produktion von Monozyten induziert und der auf der Interaktion zwischen APZ und T-Zelle beruht, ist die Stimulation von CD40 durch CD40L. CD40L ist der T-Zell-Ligand von CD40, deren Expression auf T-Zellen durch eine Stimulation des T-Zell-Rezeptor-Komplexes und durch die Stimulation von CD28 induziert wird (Armitage et al. 1993, Yang et al. 1996). Die verminderte IL-12 Produktion von stimulierten humanen PBMC in Anwesenheit von rOv17 und trOv17 könnte deshalb ein Hinweis für eine verminderte CD40L-Expression der T-Zellen in Anwesenheit von rOv17 und trOv17 sein, in deren Folge die IL-12 Produktion von Monozyten vermindert ist.

Die Inhibition der IL-12 Produktion durch rOv17 und trOv17 bedeutet, daß rOv17 und trOv17 die Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen modulieren und in der Lage sind, die Entwicklung einer zellvermittelten Immunantwort zu unterdrücken.

4.1.8 Inhibition der CD40- und CD86-Expression humaner PBMC durch rOv17 und trOv17

Eine Stimulation von T-Zellen wird im Verlauf einer Immunantwort durch die Bindung eines antigenspezifischen Liganden an den T-Zell-Rezeptor-Komplex initiiert und durch ein zweites, kostimulatorisches, Signal induziert (Janeway und Bottomly 1994, Robey et al. 1995). Das erste Signal, die Bindung eines antigenspezifischen Liganden an den T-Zell-Rezeptor, gewährleistet die Spezifität der Immunantwort. Das zweite, kostimulatorische Signal ist antigenunspezifisch und induziert die klonale Expansion der T-Zellen, die Sekretion von Zytokinen, die Expression weiterer kostimulatorischer Signale und die Entwicklung von

Effektorzellen (McAdam et al. 1998). Das Fehlen des kostimulatorischen Signals bei einer gleichzeitigen Stimulation des T-Zell-Rezeptors induziert eine T-Zell-Anergie (Jenkins et al. 1988). Die erforderlichen kostimulatorischen Signale erhalten T-Zellen von APZ, durch die Bindung kostimulatorischer Moleküle an die entsprechenden T-Zell-Liganden. CD80 und CD86 sind zwei wichtige kostimulatorische Moleküle von APZ, die T-Zellen über ihre CD28-Rezeptoren aktivieren. Weitere kostimulatorische Moleküle, die aktivierende und regulierende Funktionen im Verlauf einer Immunantwort besitzen sind CD40 und CD40L, ICOS Ligand (B7h) -ICOS und B7-H1-mit unbekanntem Liganden (Cayabyab et al. 1994, Grewal et al. 1995, 1998, Dong et al. 1999, Hutloff et al. 1999, Swallow et al. 1999, Aicher et al. 2000, Ling et al. 2000, Mages et al. 2000).

Die Untersuchungen zum Einfluß von rOv17 und trOv17 auf die Expression kostimulatorischer Signale auf humanen Monozyten ergaben, daß rOv17 und trOv17 die Expression von CD86 und auch CD40 vermindern und die Expression von CD80 nicht beeinflussen.

CD86 ist konstitutiv und schnell induzierbar auf professionellen APZ exprimiert (McAdam et al. 1998). Die Expression wird im Verlaufe einer Immunantwort durch verschiedene Stimuli verstärkt bzw. induziert. Insbesondere IFN- γ oder eine Stimulation von CD40 über CD40L induzieren die Expression von CD86 (Kiener et al. 1995, Cella et al. 1996, Yokozeki et al. 1997). Im Gegensatz dazu inhibieren Zytokine wie IL-4, IL-10, TGF- β und TNF- α die Expression von CD86 auf humanen Monozyten (Ding et al. 1993, Moore et al. 1993, Creery et al. 1996). Die durch rOv17 und trOv17 induzierte verminderte CD86-Expression kann daher durch eine fehlende Stimulation und / oder durch eine Inhibition der Expression von CD86 bedingt sein. Da rOv17 und trOv17 eine verstärkte TNF- α und IL-10 Produktion induzieren, ist eine TNF- α /IL-10 induzierte verminderte Expression von CD86 sehr wahrscheinlich.

Aber auch eine verminderte Stimulation von CD40 konnte als Ursache der verminderten CD86-Expression zunächst nicht ausgeschlossen werden, insbesondere da gezeigt wurde, daß sich die kostimulatorischen Reaktionspartner CD86/CD80-CD28 und CD40-CD40L in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen (Caux et al. 1994, Kiener et al. 1995, Yin et al. 1999). Dabei induziert eine Stimulation von CD28 der T-Zellen durch CD86/CD80 zunächst die Expression von CD40L auf T-Zellen (Yang et al. 1996). CD40L stimuliert anschließend APZ

durch die Bindung von CD40, kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 zu exprimieren (Caux et al. 1994, Cella et al. 1996). Diese gegenseitige Regulation der Expression bedeutet, daß die durch rOv17 und trOv17 induzierte verminderte CD86-Expression auch Folge einer verminderten Expression von CD40L auf T-Zellen sein kann. Sie bedeutet aber auch, daß die durch rOv17 und trOv17 induzierte verminderte CD86-Expression eine verminderte CD40L-Expression auf T-Zellen bedingt, so daß rOv17 und trOv17 nicht nur über CD80 und CD28, sondern vermutlich auch über CD40 und CD40L die T-Zell-Proliferation beeinflussen.

Die verminderte Expression von CD40 auf humanen Monozyten durch rOv17 und trOv17 bestätigt die Vermutung, daß rOv17 und trOv17 auch auf die Expression dieser Kostimulatoren Einfluß nehmen. Um jedoch den Einfluß von rOv17 und trOv17 auf CD40-CD40L beurteilen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig, die die Expression von CD40L charakterisieren, da die regulierte Größe des CD40-CD40L-Reaktionspaares CD40L auf den T-Zellen ist.

4.1.9 Neutralisationsstudien mit anti-IL-10 Ak

rOv17 und trOv17 induzieren eine verstärkte Bildung von IL-10, einem potenten immunsupprimierend wirkenden Zytokin, welches auf eine Vielzahl von Immunfunktionen deaktivierend wirkt. Die Bedeutung der durch rOv17 und trOv17 induzierten verstärkten IL-10 Produktion in Bezug auf die Modulation weiterer Immunfunktionen, haben die Studien mit neutralisierenden anti-IL-10 Ak verdeutlicht. So wird durch die Neutralisation von IL-10 die durch rOv17 und trOv17 induzierte verminderte HLA-DR-Expression und die verminderte Expression von CD40 und CD86 aufgehoben. Desweiteren induziert der Einsatz neutralisierender anti-IL-10 Ak eine starke Stimulation der IFN- γ Produktion. Im Gegensatz dazu wird die verminderte IL-12 Produktion stimulierter humaner PBMC durch die Neutralisation von IL-10 nicht beeinflußt. Auch in Bezug auf die polyklonal-stimulierte Proliferation ist die alleinige Neutralisation der durch rOv17 und trOv17 induzierten IL-10-Produktion nicht ausreichend, die verminderte Proliferation von humanen PBMC aufzuheben. Die Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung von rOv17 und trOv17 belegt, daß beide *O. volvulus* Cystatine potente Immunmodulatoren sind (Abb. 32). Mit den *in vitro*

Studien konnte erstmals ein einzelnes Parasitenprotein identifiziert werden, welches mit der Induktion einer verminderten zellulären Reaktivität und einer verstärkten IL-10 Produktion immunmodulierende Eigenschaften besitzt, die bislang nur als allgemeine Charakteristika des Immunstatus eines Großteils von filarieninfizierten Personen bekannt waren.

rOv17 und trOv17 beeinflussen eine Vielzahl von Immunfunktionen, die den Verlauf einer Immunantwort bestimmen. rOv17 und trOv17 modulieren dabei Monozytenfunktionen, die den Verlauf einer T-Zell-Aktivierung beeinflussen. So vermindern rOv17 und trOv17 die Antigenpräsentationskapazität von Monozyten, modulieren deren Zytokinproduktion und vermindern die Expression kostimulatorischer Signale. Die Fähigkeit von rOv17 und trOv17 die Antigenpräsentation von Monozyten zu beeinflussen, beruht darauf, die Aktivität von humanem Cathepsin L und S zu inhibieren und die Expression von HLA-DR zu supprimieren. Desweiteren beeinflussen rOv17 und trOv17 die Bildung von TNF- α (\uparrow), IL-10 (\uparrow) und IL-12 (\downarrow) und vermindern die Expression von CD40 und CD86. Die verminderte Expression von HLA-DR, CD40 und CD86 ist dabei auf die rOv17 und trOv17 induzierte verstärkte IL-10 Produktion zurückzuführen. Auch die verminderte IFN- γ Produktion wird durch die Neutralisation von IL-10 erhöht. Im Gegensatz dazu bleibt die verminderte IL-12 Produktion und die verminderte polyklonal-stimulierte Proliferation humaner PBMC trotz Neutralisation von IL-10 bestehen. Dies verdeutlicht, daß nicht alle modulierenden Effekte von rOv17 und trOv17 über IL-10 vermittelt werden. Welche zusätzlichen Faktoren die durch rOv17 und trOv17 induzierte verminderte polyklonal-stimulierte Proliferation bedingen, und welche Bedeutung diesbezüglich die verminderte IL-12 Produktion besitzt, kann noch nicht beurteilt werden.

Die Bedeutung von IL-10 auf die Proliferation wurde bislang nur für die polyklonal-stimulierte Proliferation untersucht. Die Charakterisierung der Bedeutung der erhöhten IL-10 Produktion für die antigenspezifische Proliferation steht noch aus. Da mit der Neutralisation von IL-10 die durch rOv17 und trOv17 induzierte verminderte Expression von HLA-DR und der kostimulatorischen Moleküle verhindert wird, ist durchaus denkbar, daß aufgrund der verbesserten Antigenpräsentationskapazität eine Neutralisation von IL-10 im antigenspezifischen System auch einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation ausübt.

Die Hochregulation von IL-10 und die Induktion einer zellulären Hyporeaktivität sind charakteristische Merkmale einer chronischen Filarieninfektion. Eine Korrelation zwischen der IL-10 Produktion und der zellulären Hyporeaktivität dieser Personen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Korrelation beider Parameter haben Untersuchungen von King et al. (1993) und Mahanty et al. (1995, 1996, 1997) gezeigt. Im Unterschied dazu fanden Dimock et al. (1994), Sartono et al. (1995) und MacDonald et al. (1998) keine Korrelation zwischen der IL-10 Produktion und der zellulären Hyporeaktivität. Daß die Hochregulation von IL-10 aber dennoch an der Vermittlung der zellulären Hyporeaktivität beteiligt ist, zeigen jüngste Studien von Doetze et al. (2000), die belegen, daß nur eine gemeinsame Neutralisation von IL-10 und TGF- β die zelluläre Hyporeaktivität filarieninfizierter Personen aufheben kann.

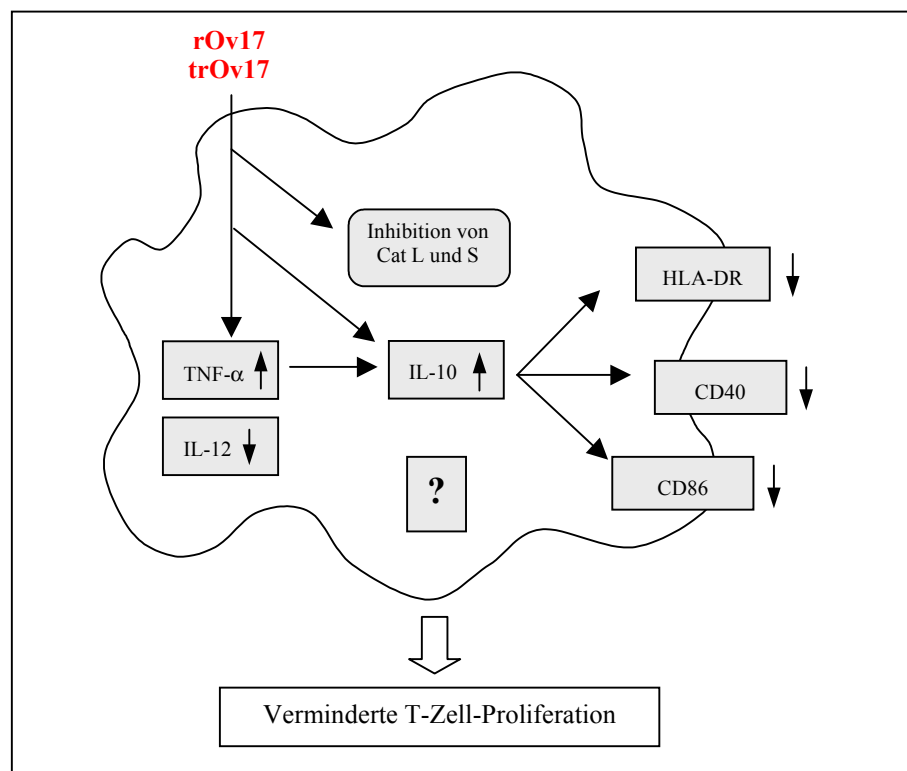


Abb. 32: Übersicht über die immunmodulierenden Eigenschaften von rOv17 und trOv17.

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen zur Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung von rOv17 und trOv17 lassen keine Aussagen über einen genauen Mechanismus zu, über den rOv17 und trOv17 ihre immunmodulierende Wirkung entfalten. Deshalb können diesbezüglich nur Hypothesen formuliert werden.

Hypothese 1)

Die durch rOv17 induzierte Immunmodulation ist auf die Inhibition der Aktivität einer Wirtscysteinprotease zurückzuführen (Abb. 33).

Die Bedeutung einer möglichen Interaktion von rOv17 mit Cysteinproteasen als Ursache für die immunmodulierende Wirkung von rOv17 zu charakterisieren, war eine Zielstellung dieser Arbeit. Cysteinproteasen, die bei der Vermittlung einer Immunantwort wichtige Funktionen übernehmen und deren Aktivität durch Cystatine reguliert wird, sind Cathepsine. Cathepsine beeinflussen die Prozessierung von Antigenen und vermitteln die Spaltung der invarianten Kette. Aufgrund dieser Eigenschaften bestimmen Cathepsine die antigenpräsentierende Funktion von APZ. Eine Interaktion von rOv17 mit der Aktivität von humanen Cysteinproteasen würde somit nur im Zusammenhang mit der Antigenpräsentation und der antigenspezifisch-stimulierten Proliferation von Bedeutung sein.

Argumente, die die Hypothese einer möglichen Interaktion von rOv17 mit humanen Cysteinproteasen unterstützten, waren die Fähigkeit von rOv17, die Aktivität humaner Cathepsine, wie Cathepsin L und S mit hoher Affinität zu inhibieren, die Eigenschaft von rOv17 die antigenspezifische Proliferation zu supprimieren und die Expression von HLA-DR auf humanen Monozyten zu vermindern. Die vergleichenden Untersuchungen mit dem verkürzten, weniger aktiven trOv17 haben aber gezeigt, daß trOv17 trotz geringerer inhibitorischer Potenz eine vergleichbare Inhibition der antigenspezifischen Proliferation humaner PBMC und eine vergleichbar starke Suppression der HLA-DR-Expression induziert. Wenn diese immunmodulierende Effekte von rOv17 und trOv17 auf eine Inhibition der Aktivität von humanen Cathepsinen zurückzuführen sein soll, wäre eine weniger starke Beeinflussung dieser Immunfunktionen durch trOv17 zu vermuten gewesen. Es sei denn, es gibt Cysteinproteasen (Cathepsine. Legumain), die im Verlauf der Immunantwort wichtige

Funktionen ausüben und die inhibitorische Potenz von trOv17 ausreichend ist, die Aktivität dieser Cysteinproteasen zu inhibieren.

Um die Bedeutung einer verminderten Antigenpräsentation im Zusammenhang mit der verminderten antigenspezifischen Proliferation zu analysieren, wurde der Einfluß von rOv17 auf die polyklonal-stimulierte Proliferation untersucht. rOv17 und trOv17 induzieren eine vergleichbar starke Inhibition der antigenspezifischen und polyklonal-stimulierten Proliferation humaner PBMC. Dies bedeutet, daß die Antigenpräsentation im Zusammenhang mit der verminderten T-Zell-Proliferation von untergeordneter Bedeutung ist und damit auch eine mögliche Interaktion von rOv17 und trOv17 mit humanen Cysteinproteasen.

Auch die Suppression der durch rOv17 und trOv17 induzierten HLA-DR-Expression humaner Monozyten ist nicht auf die Inhibition einer Wirtscysteinprotease zurückzuführen, da die Neutralisationsstudien mit anti-IL-10 Ak gezeigt haben, daß die verminderte HLA-DR-Expression Folge der erhöhten IL-10 Produktion ist. Auch wenn die verminderte HLA-DR-Expression nicht auf die Inhibition der Aktivität li-degradierender Cysteinproteasen durch rOv17 und trOv17 zurückzuführen ist, schließt dies jedoch nicht aus, daß rOv17 und trOv17 eine verminderte Generierung und Expression von Peptid-MHC-II-Komplexen induzieren.

Auch wenn die Ergebnisse der *in vitro* Studien eine Inhibition der Aktivität von Cysteinproteasen durch rOv17 und trOv17 als Ursache der Immunmodulation als weniger bedeutsam erscheinen lassen, ist jedoch zu berücksichtigen, daß sich die immunmodulierende Wirkung von Onchocystatin auf die Antigenpräsentation *in vivo* im Vergleich zu den *in vitro* Studien unterscheiden kann. Da *O. volvulus* in der Unterhaut des Wirtes lebt, wird Onchocystatin mit den hier vorhandenen APZ, wie Makrophagen, Histiozyten und DZ (Langerhans Zellen) interagieren. In den *in vitro* Studien wurde bislang nur der Einfluß auf Monozyten untersucht. Da DZ die potentesten APZ sind (Cella et al. 1997), deren Reifung u. a. durch die Aktivität von Cystatin C reguliert wird (Pierre und Mellman 1998), ist denkbar, daß eine Beeinträchtigung der antigenpräsentierenden Funktion von DZ durch Onchocystatin als Cysteinproteasen-Inhibitor eine *in vivo* Relevanz bei der Entwicklung einer zellulären Hyporeaktivität besitzt.

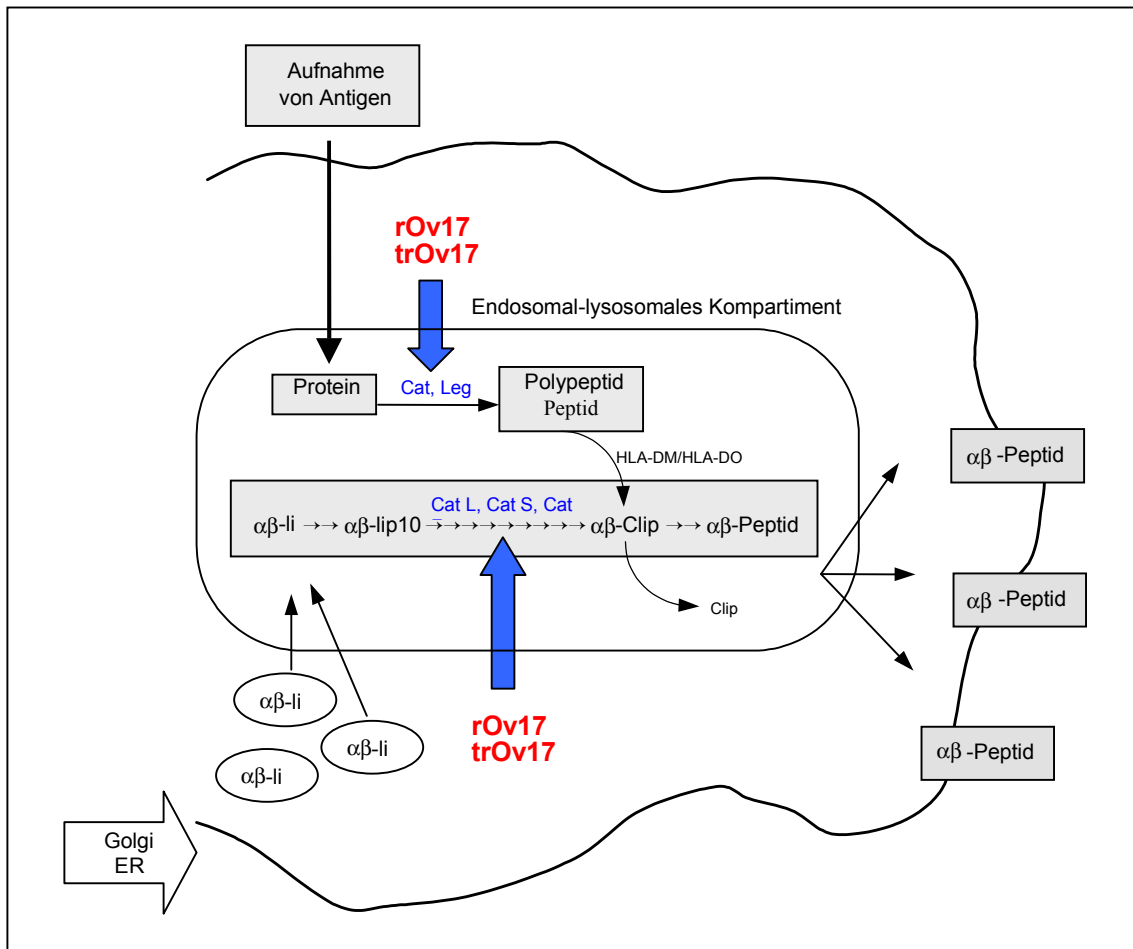


Abb. 33: Generierung von Peptid-beladenen MHC-II-Komplexen unter Beteiligung von Cathepsinen und mögliche Beeinflussung dieser Funktion durch rOv17 und trOv17. Cat: Cathepsin, Leg: Legumain, li: invariante Kette, Clip: class-II associated invariant chain peptide, αβ: MHC-II-Molekül, αβ-li: li-assoziiertes MHC-II-Molekül, αβ-lip10: li-Fragment p10-assoziiertes MHC-II-Molekül, αβ-Clip: Clip-assoziiertes MHC-II-Molekül.

Die Bildung von Peptid-beladenen MHC-II-Komplexen ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche antigenspezifische Immunantwort. Cathepsine erfüllen hierbei zwei wichtige katalytische Prozesse. Zum ersten prozessieren Cathepsine im endosomal-lysosomalen Kompartiment Antigen und generieren Peptide, die anschließend, gebunden an MHC-II-Moleküle, auf der Oberfläche der APZ präsentiert werden. Zum zweiten vermitteln Cathepsine die Prozessierung der MHC-II-assoziierten invarianten Kette, die zur Bildung Clip-assoziiertes MHC-II-Moleküle führt. Die Generierung von Clip, welches die antigene Bindungsgrube der MHC-II-Moleküle blockiert, ermöglicht anschließend die Beladung von MHC-II-Molekülen mit antigenen Peptiden. Dabei wird Clip unter Beteiligung der MHC-II-ähnlichen Moleküle HLA-DM und HLA-DO gegen das antigene Peptid ausgetauscht. Das Peptid-beladene MHC-II-Molekül kann nun auf der Oberfläche der APZ präsentiert werden und die antigenspezifische Immunantwort induzieren. An der Prozessierung von li sind Aspartyl- und Cysteinproteasen beteiligt. Die vollständige Prozessierung von li zum MHC-II-assoziierten Clip-Fragment erfolgt jedoch unter Beteiligung spezifischer Cysteinproteasen. So vermittelt Cathepsin S die Generierung von Clip in B-Zellen und DZ, Cathepsin L in Thymusepithelzellen und Cathepsin F in Makrophagen.

Eine Inhibition der Aktivität von Cysteinproteasen durch rOv17 und trOv17 könnte daher zu einer Beeinflussung der Prozessierung von Antigenen und zu einer Behinderung der Beladung von MHC-II-Molekülen mit antigenen Peptiden führen, in deren Folge die Präsentation der APZ vermindert ist.

Hypothese 2)

Die immunmodulierenden Eigenschaften von rOv17 und trOv17 sind unabhängig von ihrer Funktion als Cysteinproteasen-Inhibitor und sind rezeptorvermittelt.

Aufgrund der Komplexität der immunmodulierenden Effekte von rOv17 und der gleichermaßen potenten Immunmodulation durch das verkürzte trOv17 und die Eigenschaft von rOv17 und trOv17, bereits in sehr niedrigen Konzentrationen eine potente immunmodulierende Wirkung zu entfalten, lassen die Hypothese einer rezeptorvermittelten Wirkung von rOv17 und trOv17 zu. Demnach würde durch die Bindung von rOv17 und trOv17 an bestimmte Rezeptoren humaner Monozyten eine Stimulation dieser Zellen erfolgen, die durch eine Hochregulation von TNF- α gekennzeichnet ist, die im weiteren von einer verstärkten IL-10 und einer verminderten HLA-DR- und CD86-Expression gefolgt wird. In Folge wird zusammen mit weiteren, noch nicht bekannten Faktoren, eine Suppression der Immunantwort induziert. Aufgrund der Ähnlichkeiten des modulierenden Potentials von rOv17/trOv17 und dem Endotoxin LPS, wäre es durchaus möglich, daß rOv17/trOv17 ihre Wirkung über ähnliche Mechanismen entfalten. LPS vermittelt seine immunmodulierende Wirkung auf Monozyten durch die Bindung an CD14/(LBP), β 2-Integrinen (CD11/CD18) und die Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 (Wright et al. 1990, Poltorak et al. 1994, Flaherty et al. 1997, Yang et al. 1998). Die Eigenschaft dieser Rezeptoren, unterschiedlich strukturierte Liganden zu binden (Wright 1995, Takeuchi et al. 1999, Ulevitch et al. 1999), könnte eine Interaktion dieser Rezeptoren mit rOv17 und trOv17 ermöglichen.

Die Hypothese der rezeptorvermittelten Immunmodulation von rOv17 und trOv17 liefert auch eine mögliche Erklärung für die teilweise potentere immunmodulierende Wirkung des verkürzten trOv17. Demzufolge könnte eine höhere Affinität von trOv17 zu den entsprechenden Rezeptoren eine stärkere Signalwirkung zur Folge haben und eine im Vergleich zum rOv17 stärkere Immunmodulation bedingen.

Falls sich diese Hypothese bestätigt, würde dies bedeuten, daß Parasiten und bakterielle Erreger ähnliche Mechanismen benutzen, um die Immunantwort ihrer Wirte zu modulieren.

Hypothese 3)

rOv17 und trOv17 interagieren aufgrund von Sequenzhomologien mit der Funktion der humanen mitogen- und streßaktivierten Proteinkinase-1 (MSK1) oder aber mit dem humanen MPM2-reaktiven Phosphoprotein-1.

Ein Aminosäuresequenzabgleich von Onchocystatin mit Proteinen der Swisspir-Datenbank hat neben den erwarteten Sequenzhomologien zu anderen Cystatinen eine Sequenzhomologie mit der humanen MSK1 und mit dem humanen MPM2-reaktiven Phosphoprotein 1 ergeben (Abb. 34). Die Homologie von Onchocystatin zur MSK1 befindet sich am C-Terminus im Bereich der AS 116 bis 162 und beträgt 29%. Mit dem MPM2-reaktiven Phosphoprotein 1 weist Onchocystatin drei homologe Bereiche auf. Der erste umfaßt den Bereich zwischen den AS 33 und 83 und weist eine Homologie von 23% auf, der zweite Bereich mit 38% Homologie umfaßt die AS 76 bis 96 und der dritte Bereich mit einer Homologie von 27% umfaßt die AS 101 bis 129.

MSK1 ist eine Proteinkinase, die die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element-binding protein*) vermittelt (Deak et al. 1998). MSK1 ist ein in vielen Geweben exprimiertes Enzym und ist im Zellkern lokalisiert.

Das MPM2-reaktive Phosphoprotein 1 ist ebenfalls im Zellkern lokalisiert und ist an der Mitose von Zellen beteiligt (Westerndorf et al. 1994).

Da nicht bekannt ist, welche Strukturmerkmale für die Funktion des MPP1 und des MPM2-reaktiven Phosphoprotein 1 entscheidend sind, kann über die Bedeutung der homologen Bereiche des Onchocystatins mit diesen humanen Proteinen keine Aussage gemacht werden. Weiterhin würde eine Interaktion von rOv17 und trOv17 mit der MPP1 und dem MPM2-reaktiven Phosphoprotein 1 voraussetzen, daß rOv17 und trOv17 bzw. Onchocystatin in den Zellkern der Zelle gelangen muß, um hier modulierend wirken zu können. Desweiteren ist nicht bekannt, welche Bedeutung diese Proteine für Monozyten haben.

A

10	20	30	40	50	60
<u>MLTIKDGTLLIHL</u> LLFSVV <u>ALVQLQGA</u> KSÄRAKNPSKMEŠKTGENQDRP <u>VLLGGWED</u> RD <u>P</u>					
70	80	90	100	110	120
KDEEILELLPSILMKVNEQSNDEYHLMPIKLLKVSSQVVÄGVKYM <u>QVARSQCKKSSN</u>					
130	140	150	160		
EKVDLTKCKKLEGHPEKVM <u>TLEVWEK</u> PWENFMRVEILGTKEV					

B

10	20	30	40	50	60
<u>MLTIKDGTLLIHL</u> LLFSVV <u>ALVQLQGA</u> KSÄRAKNPSKMEŠKTGENQDRP <u>VLLGGWED</u> RD <u>P</u>					
70	80	90	100	110	120
KDEEILELLPSILMKVNEQSNDEYHLMPIKLLKVSSQVVÄGVKYM <u>QVARSQCKKSSN</u>					
130	140	150	160		
EKVDLTKCKKLEGHPEKVM <u>TLEVWEK</u> PWENFMRVEILGTKEV					

Abb. 34: Homologe Aminosäuresequenzabschnitte von Onchocystatin mit der humanen MSK 1 und dem humanen MPM2-reaktiven Phosphoprotein 1. Der Aminosäureabgleich mit Proteinen der Swisspir-Datenbank hat eine Sequenzhomologie von Onchocystatin mit der humanen MSK 1 und dem humanem MPM2-reaktiven Phosphoprotein 1 ergeben. A: Aminosäuresequenzähnlichkeit von Onchocystatin mit der humanen MSK 1. Der grau unterlegte Bereich kennzeichnet den Sequenzabschnitt (AS 116 bis 162), in dem Onchocystatin mit der MSK1 zu 29% homolog ist. B: Aminosäuresequenzähnlichkeit von Onchocystatin mit dem humanen MPM2-reaktiven Phosphoprotein 1. Die 3 grau unterlegten Bereiche kennzeichnen die Sequenzabschnitte in denen Onchocystatin Homologien zum humanem MPM2-reaktiven Phosphoprotein 1 besitzt. Der erste Bereich umfaßt die AS 33 bis 83 und weist eine Homologie von 23% auf. Der zweite Bereich umfaßt die AS 76 bis 96 und besitzt eine Homologie von 38%, der dritte Bereich umfaßt die AS 101 bis 129 und hat eine Homologie von 27%. Unterstrichen dargestellt ist die Signalsequenz von Onchocystatin.

4.2 Charakterisierung des Kontrollproteins rOv33

rOv33 wurde als Kontrollprotein gewählt, da es ein Parasitenprotein der Filarie *O. volvulus* ist, welches strukturell charakterisiert worden war und welches uns für die Klonierung und Expression in *E. coli* zur Verfügung stand. rOv33 wurde erstmals von Lucius et al. (1988) beschrieben und hat strukturell Ähnlichkeit mit Aspartylproteasen-Inhibitoren (Willenbacher et al. 1993). rOv33 ist in der Hypodermis und in den Reproduktionsorganen der Filarien lokalisiert und ist eine Komponente des E/S-Produktes.

rOv33 wurde als Kontrolle vergleichend zum rOv17 und trOv17 in allen Untersuchungen getestet. Die Ergebnisse zeigen, daß rOv33 die polyklonal-stimulierte Proliferation und auch die Zytokinproduktion humaner PBMC beeinflusst. Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich um einen rOv33-spezifischen Effekt oder um einen immunmodulierenden Effekt, des die Proteinfraction kontaminierenden LPS handelt.

Die vergleichenden Untersuchungen mit rOv33 haben aber dennoch bestätigt, daß die durch rOv17 und trOv17 induzierten Effekte rOv17- bzw. trOv17 spezifisch sind.

4.3 Vergleichende Untersuchungen von rOv17, trOv17 und LPS

LPS ist Grundbaustein der Bakterienzellwand gramnegativer Bakterien und wirkt bereits im pg-Bereich immunmodulatorisch. Die Stimulation von Monozyten und Makrophagen durch LPS führt zunächst zu einer Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 (Morrison et al. 1987). Dieser proinflammatorische Reaktionsstatus der Monozyten wird im weiteren Verlauf von einem antiinflammatorischen Reaktionsstatus (Endotoxintoleranz) abgelöst, der durch die Bildung von IL-10 und IL-1RA und durch eine verminderte Expression von MHC-II und von kostimulatorischen Signalen charakterisiert ist (Andersson et al. 1992, Howard et al. 1992, Randow et al. 1995, Wolk et al. 2000).

Aufgrund der prokaryotischen Expression von rOv17, trOv17 und rOv33 enthalten die aufgereinigten Proteinfractionen LPS. Um einen möglichen Einfluß von LPS auf die immunmodulierende Wirkung der rekombinanten Proteine beurteilen zu können, wurde die LPS-Konzentration, die durch den Einsatz der rekombinanten Proteine in die Zellkultur verursacht wurde, bestimmt. Die Bestimmung des LPS-Gehaltes in der Zellkultur

verdeutlicht, daß mit dem Einsatz der rekombinanten Proteine ein LPS-Eintrag in die Zellkultur mit bereits wirksamen pg-Mengen erfolgte. Die Bestimmung des LPS-Gehaltes verdeutlicht aber auch, daß mit dem Einsatz von rOv17 im Vergleich zum trOv17 und der Kontrolle rOv33 der niedrigste LPS-Eintrag in die Zellkultur verbunden war, so daß vergleichend zur Kontrolle rOv33 die beschriebenen immunmodulierenden Effekte von rOv17 vermutlich nicht auf die LPS-Kontamination von rOv17 zurückzuführen sind. Mit dem Einsatz von trOv17 war im Vergleich zum rOv17 eine höhere LPS-Kontamination der Zellkulturansätze verbunden, ein Umstand, der den direkten Vergleich der durch rOv17 und trOv17 induzierten immunmodulierenden Effekte erschwert. Die vergleichenden Untersuchungen der Ergebnisse von trOv17 mit der Kontrolle rOv33, die eine vergleichbare LPS-Kontamination verursacht, zeigen jedoch, daß auch durch trOv17 eine Immunmodulation induziert wird, die nicht ausschließlich auf deren LPS-Gehalt zurückzuführen ist.

Um den Einfluß der LPS-Kontamination der rekombinanten Proteine besser charakterisieren zu können, wurde vergleichend zum rOv17, trOv17 und rOv33 eine zusätzliche *E. coli* LPS-Kontrolle (0127 B8) getestet. Diese LPS-Kontrolle induziert in entsprechender Konzentration keine vergleichbar starke Immunmodulation wie rOv17 und trOv17. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß eine abschließende Beurteilung dieser Ergebnisse nicht möglich ist, da jüngste Untersuchungen gezeigt haben, daß sich das immunmodulierende Potential von LPS von unterschiedlichen *E. coli*-Stämme unterscheidet (mündliche Mitteilung von Prof. Hartung, Universität Konstanz). Da als reine LPS-Kontrolle LPS von einem anderen *E. coli*-Stamm (0127 B8) verwendet wurde, können diese Ergebnisse nur als Anhaltspunkt dienen.

Ein weiterer Versuch, einen möglichen Einfluß von LPS auszuschließen, beinhaltete den Einsatz eines LPS-neutralisierenden Proteins, BPI (*bactericidal / permeability-increasing protein*). Unter Verwendung von BPI wurde das immunmodulierende Potential von rOv17 und trOv17 auf die IL-10 Produktion humaner unstimulierter PBMC und die HLA-DR-Expression humaner Monozyten untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). In Anwesenheit des LPS-neutralisierenden Proteins BPI konnte der durch rOv17 induzierte Effekt auf die IL-10 Produktion und die HLA-DR-Expression fast vollständig aufgehoben werden, was zunächst vermuten ließ, daß die beschriebenen immunmodulierenden Effekte von rOv17 auf deren LPS-Gehalt zurückzuführen ist. Um bei der Beurteilung dieser Ergebnisse einen möglichen Einfluß von BPI auf die Wirksamkeit von rOv17 auszuschließen, wurde die inhibitorische

Aktivität von rOv17 gegenüber humanem Cathepsin L mit und ohne BPI untersucht. Im Ergebnis dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß BPI die inhibitorische Wirksamkeit von rOv17 gegenüber Cathepsin L um 60% vermindert. Aufgrund der Interaktion von BPI mit rOv17, ist daher auch mit dieser Untersuchung keine zuverlässige Beurteilung des Einflusses der LPS-Kontamination der rekombinanten Proteine auf die immunmodulierenden Eigenschaften von rOv17 und trOv17 möglich.

Im Ergebnis der verschiedenen Untersuchungen, mit dem Ziel, den Einfluß des LPS-Gehaltes der rekombinanten Proteine auf deren immunmodulierenden Potential quantifizieren zu können, wird deutlich, daß der Vergleich mit der Kontrolle rOv33 in diesem Zusammenhang am aussagekräftigsten ist.

5 SCHLUBFOLGERUNG

Die *in vitro* Studien mit den rekombinant hergestellten *O. volvulus* Cystatinen verdeutlichen, daß Onchocystatin ein potentes immunmodulierendes Parasitenprotein ist. In seiner Gesamtheit wirken die rekombinanten *O. volvulus* Cystatine supprimierend und deaktivierend auf den Verlauf einer Immunantwort. Die rekombinanten *O. volvulus* Cystatine modulieren dabei Effektormechanismen der Monozyten, die den Verlauf einer T-Zell-Aktivierung beeinflussen. Für das native Onchocystatin kann geschlußfolgert werden, daß es vermutlich an der Herausbildung und der Erhaltung eines für die chronische Filarieninfektion charakteristischen hyporeaktiven Immunstatus beteiligt ist.

Hinsichtlich des auslösenden Mechanismus der rOv17 und trOv17 induzierten Immunmodulation konnte keine abschließende Erklärung gefunden werden. Eine mögliche Bedeutung einer Interaktion von rOv17 und trOv17 mit Cysteinproteasen für die Modulation der antigenspezifischen Immunantwort kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Modulation der Zytokinproduktion und die Beeinflussung der Expression von Oberflächenmolekülen verdeutlichen jedoch, daß rOv17 und trOv17 auch unabhängig von ihrer Funktion als Cysteinproteasen-Inhibitoren immunmodulierend wirksam sind.

Die Untersuchung der immunmodulierenden Eigenschaften der rekombinanten *O. volvulus* Cystatine hat einige wesentliche, aber dennoch nicht alle Faktoren des komplexen immunmodulierenden Geschehens aufgeklärt. Insbesondere die Faktoren, die an der Induktion der durch rOv17 und trOv17 induzierten zellulären Hyporeaktivität beteiligt sind, sind noch nicht ausreichend charakterisiert. Daher sollte die Suche nach weiteren immunmodulierenden Eigenschaften und die Suche nach dem auslösenden Mechanismus Ziel künftiger Untersuchungen sein. Um die *in vivo* Relevanz der immunmodulierenden Wirkung des *O. volvulus* Cystatins besser charakterisieren zu können, sollte der Einfluß von *O. volvulus* Cystatin auf die Funktion verschiedener APZ unter Verwendung eines eukaroytisch exprimierten *O. volvulus* Cystatin oder des nativen Onchocystatin untersucht werden.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Material

6.1.1 Laborgeräte

Beta-counter
 ELISA-Reader MRX
 ELISA-Waschgerät
 Lumineszenz Spektrophotometer
 Fluoroscan II
 Fluoreszenzphotometer SFM 25
 Invers-Mikroskop
 Kühlzentrifuge 5415 C
 Kühlzentrifuge 5810 R
 Magnetrührer
 Mikroskop
 Neubauer-Zählkammer
 Peristaltische Pumpe
 pH-Meter 526
 Präzisionspipetten
 Schüttelinkubator
 Spektralphotometer Hitachi U 2000
 Thermocycler
 Thermocycler PCR System 9700
 Tischzentrifuge 5415 C
 Ultraschallgerät HD 200
 Video-Dokumentationsgerät E.A.S.Y.RH
 Wasserbad DC3
 Zell-Ernter

Wallac, Finnland
 Dynatech, Denkendorf
 Dynatech, Denkendorf
 Perkin Elmer, Langen
 Labsystems, Frankfurt
 BIO-TEK, Neufahrn
 Leica, Wetzlar
 Eppendorf, Hamburg
 Eppendorf, Hamburg
 IKA Labortechnik, Staufen
 Zeiss, Oberkochen
 Migge, Heidelberg
 BIORAD, München
 WTW, Weilheim
 Eppendorf, Hamburg
 New Brunswick, Nürtingen
 Colora Meßtechnik, Lorch
 Eppendorf, Hamburg
 Perkin Elmer, Langen
 Eppendorf, Hamburg
 Heinemann, Schw. Gmünd
 Herolab, Wiesloch
 Haake, Karlsruhe
 Wallac, Finnland

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyse-Schläuche
 Einwegkanülen
 Einwegpasteurpipetten
 Einwegspritzen
 ELISA-Platten (Maxisorp)
 Gel-Blotting-Papier
 Nitrozellulosemembran (0,2 µm)
 Petrischalen
 Pipettenspitzen
 Polypropylen-Röhrchen (12, 14, 50 ml)
 Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)
 Reaktionsgefäße (0,2 und 0,5 ml)
 Sterilfilter (0,2 – 0,45 µm)
 VS+ Säulen
 Zellkulturplatten

Serva, Heidelberg
 Braun, Melsungen
 Greiner, Nürtingen
 Braun, Melsungen
 Nunc, Wiesbaden
 Schleicher & Schuell, Dassel
 Pharmacia, Freiburg
 Greiner, Nürtingen
 Greiner, Nürtingen
 Greiner, Nürtingen
 Greiner, Nürtingen
 Biozym, Oldendorf
 Schleicher & Schuell, Dassel
 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
 Costar, Bodenheim

6.1.3 Reagenzien

3H-Thymidin	ICN, Eschwege
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
Antibiotika	AppliChem, Darmstadt
Anti-CD3 Ak (Orthoclone-Okt3)	Janssen-Cilag, Neuss
Agar	AppliChem, Darmstadt
Beriglobin (OBAE 30)	Centeon,
Brij 35	Sigma, Deisenhofen
BSA	AppliChem, Darmstadt
Chemikalien	Roth, Karlsruhe
DNA-Marker BioSizer II/V	AGS, Heidelberg
dNTP	Roth, Karlsruhe
E 64d	Bachem, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Eiweißcystatin	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	Biochrom KG, Berlin
Ficoll Paque	Pharmacia, Freiburg
Fluoreszenzsubstrate	Bachem, Heidelberg
Glasfaserfilter	Wallac, Finnland
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe
LPS (<i>E. coli</i> 0127 B8)	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Metofane (Metoxyfluran)	Janssen-Cilag, Neuss
Milchpulver	Fluka, Deisenhofen
MW-Standard (mid range)	Promega, Mannheim
MW-Standard vorgefärbt	Sigma, Deisenhofen
Ni-NTA-Agarose	Quiagen, Hilden
Oligonukleotide (Primer)	Roth, Karlsruhe
Oligonukleotide (Primer)	TIBMOL BIOL, Berli
Organische Lösungsmittel	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Stammlösung	Gibco BRL, Karlsruhe
PHA	Pharmacia, Freiburg
Protein-Marker	Pharmacia, Freiburg
Quenching Reagenz	OPREGEN Pharma, Heidelberg
RPMI 1640	Gibco BRL, Karlsruhe
RPMI (VLE) 1640	Biochrom KG, Berlin
Squalan	Fluka, Deisenhofen
Synperonic L101	Serva, Heidelberg
Szintillationsmembran	Wallac, Finnland
TMB-Substrat	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween	Serva, Heidelberg

6.1.4 Enzyme

DNase, RNase	Boehringer Mannheim, Mannheim
T4 DNA-Ligase	New England Biolab, USA
DNA-Restriktionsenzyme	AGS, Heidelberg
Taq-Polymerase	Gibco BRL, Karlsruhe
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Papain	Sigma, Deisenhofen

Humanes Cathepsin L	CALBIOCHEM, Bad Soden
Humanes Cathepsin B	Sigma, Deisenhofen
Humanes Cathepsin S	Prof. Wiederanders, Institut für Biochemie Universitätsklinik Jena

6.1.5 Kommerzielle Kits

Gel-Extraktionskit QUIAEXII	Quiagen, Hilden
Plasmid-Mini-Kit	Quiagen, Hilden
Plasmid-Midi-Kit	Quiagen, Hilden
Duoset (IFN- γ , TGF- β)	R & D System, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-10-Kit	R & D System, Wiesbaden-Nordenstadt
OptEIA™ (IL-10, IL-12, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , TGF- β)	Pharmingen, Hamburg
BCA-Test	-Pierce, USA
pGEM T-Easy	Promega, Mannheim
Quantitativer Chromogener LAL-Test	BioWhittaker, Verviers, Belgien

6.1.6 Primer

Ov17		
forward (Ov17 Start):	5' -GTTTCAGTTGCAAGGAGCC- 3'	
reverse (Ov17 Ende)	5' -TCATACTTCTTTTGTTCCC- 3'	
Ov33		
forward (33 f 5')	5' -CCATGGAGCTCGGTGTAGTAAAAAGGTACAATAAACGT- 3'	
reverse (33 f 3')	5' -CACCCGTCGACCATAGATTGCGACGCAGAAATG- 3'	

6.1.7 Agarosegel-Elektrophorese-Puffer

10x TBE	1M	Tris-HCl
	1M	Borsäure
	20 mM	EDTA (pH 8,0)
10x TAE	400 mM	Tris-Ac
	10 mM	EDTA (pH 8,0)
	1,14%	Eisessig
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA (pH 8,0)
6x Probenpuffer	0,25%	Bromphenolblau
	0,25%	Xylen-Cyanol FF
	30%	Glycerol
	in H ₂ O	
EtBr-Lösung	10 mg/ml	in H ₂ O

6.1.8 Puffer für Kleine Plasmidpräparation

Lysispuffer	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	100 mM	NaOH
	0,5%	SDS
	0,5 mg/ml	RNase (frisch zusetzen)
Kaliumazetat/Essigsäure	3 M	Kaliumazetat, pH 6,0

6.1.9 Plasmide, cDNA und *E. coli*-Stämme

E. coli Stämme

DH5 α	Stratagen, Heidelberg
XL-1 Blue	Stratagen, Heidelberg
BL21 (DE3)	Novabiochem, Bad Soden
BL21 (DE3) pLys S	Novabiochem, Bad Soden

Plasmide

pBlueskript (SK+)	Stratagen, Heidelberg
pET 28	Novabiochem, Bad Soden
Ov33-pGEX	Thomas Pogonka, HU-Berlin

cDNA

L3 cDNA-Bank	Dr. St. A. Williams, Northampton
--------------	----------------------------------

6.1.10 Bakterien-Kulturmedien

LB-Medium	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt ad 1l mit H ₂ O, pH 7,5 autoklavieren
LB-Platten	LB-Medium 1,5 % Agar autoklavieren
SOB-Medium	20 g Trypton 5g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml KCl (250 mM) ad 995 ml H ₂ O pH 7,0 autoklavieren 5 ml sterile 2 mM MgCl ₂
SOC-Medium	SOB-Medium 10 mM sterilfiltrierte Glukose
TB-Puffer	10 mM PIPES 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl pH 6,7 (mit KOH einstellen) 55 mM MgCl ₂ sterilfiltrieren
X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml in Dimethyl-Formamid
IPTG-Stammlösung	1 M in H ₂ O

6.1.11 Antibiotika

Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin	10 mg/ml in H ₂ O
Chloramphenikol	34 mg/ml in Ethanol

6.1.12 Puffer für Löslichkeitstest

1) PBS / 0,1% Triton	PBS mit 0,5 M NaCl 0,1% Triton X-100 pH 8,0	
2) Imidazol-Puffer	5 mM 0,5 M 20mM pH 7,9	Imidazol NaCl Tris-HCl
3) Harnstoff-Puffer	6 M 100 mM 10 mM pH 8.0	Harnstoff NaH ₂ PO ₄ Tris-HCL

6.1.13 Puffer für die affinitätschromatographische Aufreinigung von rOv17, trOv17 und rOv33

Denaturierende Aufreinigung

Puffer A: (Bindungspuffer)	6 M 100 mM 10 mM pH 8.0	Guanidinium-HCl NaH ₂ PO ₄ Tris-HCL
Puffer B: (Waschpuffer)	6 M 100 mM 10 mM pH 8.0	Harnstoff NaH ₂ PO ₄ Tris-HCL
Puffer C: (Waschpuffer)		Puffer B pH 6,3
Puffer D: (Waschpuffer)		Puffer B pH 5,9
Puffer E: (Elutionspuffer)		Puffer B pH 4,5

Native Aufreinigung

A) Imidazolaufreinigung

Bindungspuffer	5 mM 0,5 M 20mM pH 7,9	Imidazol NaCl Tris-HCl
Waschpuffer	60 mM 0,5 M 20 mM pH 7,9	Imidazol NaCl Tris-HCl
Elutionspuffer	1 M 0,5 M 20 mM pH 7,9	Imidazol NaCl Tris-HCl

B) Aufreinigung mit PBS/Triton X-100

Bindungspuffer	PBS mit 0,5 M NaCl 0,1% Triton X-100 pH 8,0
Waschpuffer	PBS mit 0,5 M NaCl 0,01% Triton X-100 pH 5,0
Elutionspuffer	PBS mit 0,5 M NaCl 0,01% Triton X-100 pH 4,5

6.1.14 SDS-PAGE-Pufferlösungen

Acrylamid-Stammlösung (30%)	29,2 g Acrylamid 0,8 g Bisacrylamid ad 100 ml H ₂ O
-----------------------------	--

Acrylamidgel-Gebrauchslösung

	4%	14%	16%
Acrylamid (30%)	2,7 ml	9,4 ml	10,7 ml
H ₂ O	12 ml	5,4 ml	4 ml
0,5 M Tris (pH 6,8)	5 ml	-	-
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	5 ml	5 ml
SDS (10%)	200 µl	200 µl	200 µl
Temed	40 µl	10 µl	10 µl
10% APS	auf 1% frisch zusetzen	auf 1% frisch zusetzen	auf 1% frisch zusetzen

APS	10% in H ₂ O
2x SDS-Probenpuffer	20% Glycerin 4% SDS 1,5% Bromphenolblau 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 10% β-Mercaptoethanol 2 mM PMSF
Laemmli-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin
Färbelösung	0,1% SDS 20% Ethanol 10% Essigsäure 0,1% Coomassie Blau R-250 in H ₂ O
Entfärber	20% Ethanol 10% Essigsäure in H ₂ O

6.1.15 Puffer für Transfer und Western-Blot

Transferpuffer	50 mM	Tris
	380 mM	Glycin
	0,1%	SDS
	20%	Methanol
10x TBS	1 M	NaCl
	50 mM	Tris
	pH 7,4	
Ponceau-Färbelösung	2%	Ponceau
	30%	Trichloressigsäure
	30%	Sulfobenzoesäure
BSA/TBS	3% BSA in TBS □ □	
Peroxidase-Substratlösung	10 ml	TBS
	600 µl	aus 0,3% Chlornaphthol
	5 µl	aus 30% H ₂ O ₂

6.1.16 Puffer für ELISA

Beschichtungspuffer	0,2 M	Carbonatpuffer, pH 9,0
Blockierungspuffer	3% BSA in PBS	
Waschpuffer	PBS / 0,025% Tween 20	
TMB-Substratlösung	1 mg TMB in 100 µl DMSO	
	9,9 ml 100 mM Na-Azetat	
	1 µl 30% H ₂ O ₂	
Stoplösung	1 M H ₂ SO ₄	

6.1.17 Antikörper und Konjugate

rOv17 Kaninchenserum	Charles River, Kisslegg
monoklonaler Maus-anti-rOv33 IgG ₁ -Ak (IVA7)	R. Lucius, HU-Berlin
Ziege-anti-Maus IgG+IgM (H+L) Pox-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG+IgM (H+L) Pox-konjugiert	Dianova, Hamburg
monoklonaler Maus anti-humane-IL-10 Ak (IgG ₁)	Robert Sabat, Charité-Berlin
Maus IgG ₁ Kontrollantikörper	R & D System, Wiesbaden-Nordenstadt
PE-konjugierte anti-humane HLA-DR Ak (Klon L243)	Becton Dickenson, Heidelberg
FITC-konjugierte anti-humane CD80 Ak (Klon BB1)	Pharmingen, Hamburg
PE-konjugierte anti-humane CD86 Ak (Klon 2331)	Pharmingen, Hamburg
FITC-konjugierte anti-humane CD40 Ak (Klon 5C3)	Pharmingen, Hamburg
PE-Cy5-konjugiert anti-humane CD14 Ak (Klon RMO52)	Coulter Immunotech, Heidelberg
FITC-konjugierte anti-humane CD14 Ak (UCHM-1)	Dianova, Hamburg
FITC-konjugierte Maus IgG1 Ak (Klon 679.1Mc7)	Coulter Immunotech, Heidelberg
PE-konjugierte Maus IgG2a Ak (Klon X39)	Becton Dickenson, Heidelberg
anti-humane CD3 Ak (Orthoclone-Okt3)	Janssen-Cilag, Neuss
anti-humane CD28 Ak (Klon CD28.2)	Pharmingen, Hamburg

6.1.18 Puffer und Lösungen für kinetische Messungen mit rOv17 und trOv17

Probenpuffer

Papain-Probenpuffer	200 mM 200 mM 4 mM 4 mM 0,01% pH 6,8	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ EDTA DTT (frisch zusetzen) Brij 35
Cathepsin S-Probenpuffer	13 mM 87 mM 5 mM 5 mM 0,01% pH 6,0	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ EDTA DTT (frisch zusetzen) Brij 35
Cathepsin L-Probenpuffer	340 mM 60 mM 4 mM 8 mM 0,01% pH 5,5	Na-Azetat Essigsäure EDTA DTT (frisch zusetzen) Brij 35
Cathepsin B-Probenpuffer	352 mM 48 mM 4 mM 8 mM 0,01% pH 6,0	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ EDTA DTT Brij 35

Cysteinproteasen-Stammlösung (EwC-titrierte Konzentration)

Cathepsin B	0,12 µM (E64-titriert)
Cathepsin L	0,85 µM
Cathepsin S	0,67 µM
Papain	1,5 µM

Cysteinproteasen-Arbeitslösung für K_i-Wert Bestimmung (EwC-titrierte Konzentration)

Cathepsin B	117 nM (E64-titriert)
Cathepsin L	11,3 nM
Cathepsin S	9,0 nM
Papain	10,0 nM

Substrat-Stammlösungen

Z-Val-Val-Arg-AMC (Cathepsin S)	10 mM in DMSO
Z-Phe-Arg-AMC (Cathepsin L)	10 mM in DMSO
Z-Arg-Arg-AMC (Cathepsin B)	10 mM in DMSO
Z-Phe-Arg-AMC (Papain)	10 mM in DMSO

Substrat-Arbeitslösungen für K_i-Wert Bestimmung

Z-Val-Val-Arg-AMC (Cathepsin S)	40 µM in Probenpuffer
Z-Phe-Arg-AMC (Cathepsin L)	5 µM in Probenpuffer
Z-Arg-Arg-AMC (Cathepsin B)	40 µM in Probenpuffer
Z-Phe-Arg-AMC (Papain)	25 µM in Probenpuffer

6.1.19 Zellkultur-Medien

1x PBS	136,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
RPMI komplett	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml /Streptomycin 5-10% hitzeinaktiviertes FCS
PHA-Arbeitslösung	200 µg/ml
anti-CD3 Ak-Arbeitslösung	200 ng/ml
³ H-Thymidin- Arbeitslösung	50 µCi/ml
Trypanblau-Lösung	160 mg in 100 ml PBS
Erythrozytenlyse-Lösung	90 ml aus 160 mM NH ₄ Cl 10 ml 170 mM Tris pH 7,6

6.1.20 Adjuvans

2x STP	PBS 10% Squalane 0,4% Tween 80 1,0% Synperonic L 101
--------	---

6.1.21 Puffer für Durchflußzytometrie

FACS-Puffer	0,1% NaN ₃ 2% FCS in PBS
-------------	--

6.1.22 Tiermaterial

BALB/c Mäuse	H-2 ^d Haplotyp	BGVV, Berlin
--------------	---------------------------	--------------

6.2 Methoden

6.2.1 Gewinnung von Parasitenmaterial

6.2.1.1 Herstellung von *O. volvulus*-Antigenextrakt

5 tiefgefrorene, adulte *O. volvulus* Weibchen wurden bei RT aufgetaut, mit PBS gewaschen und in 1-2 ml PBS mit einer Schere in einem Blockschälchen fein zerkleinert und anschließend mit Hilfe eines Glashomogenisators homogenisiert. Das Wurmhomogenat wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis mit 60 W für 3 min beschallt. Die lösliche Proteinfraction wurde anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 15 000 rpm von der unlöslichen Proteinfraction getrennt. Der Überstand (OvAg) wurde abpipettiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Test (Pkt. 6.2.3.1) bestimmt.

6.2.1.2 Gewinnung von Kulturüberstand weiblicher *O. volvulus* Würmer

Die Kulturüberstände von *O. volvulus* Weibchen für die Quantifizierung der Ov17-Ausscheidung wurden uns freundlicherweise von Dr. Norbert (Bernhard-Nocht Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Nach der Isolierung aus bindegewebigen Knoten wurden unversehrte, bewegliche Weibchen einzeln in je 6 ml Kulturmedium für 8 h vorinkubiert, wobei durch stündlichen Mediumswechsel restliche Kollagenase entfernt wurde. Nur intakte, vitale Weibchen wurden für eine weitere *in vitro* Kultivierung ausgewählt. Die Kultivierung erfolgte in je 1 ml Kulturmedium, welches alle 24 h erneuert wurde. Die gesammelten Kulturüberstände wurden sterilfiltriert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

6.2.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die DNA der rekombinanten *O. volvulus* Proteine, rOv17 und rOv33, wurde mit Hilfe der PCR unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase amplifiziert (Saiki et al. 1988, Bej et al. 1991).

PCR-Ansatz:

Amplifikation der Ov17-DNA

2 µl 5' Primer (20 pmol/µl)
 2 µl 3' Primer (20 pmol/µl)
 5 µl *O. volvulus* L3 cDNA Bank
 2 µl 2 mM dNTP Gemisch
 5 µl 10x PCR Puffer mit MgCl₂
 1 µl Taq-Polymerase (1U/µl)
 ad 50 µl HPLC Wasser

Amplifikation der Ov33-DNA

2 µl 5' Primer (20 pmol/µl)
 2 µl 3' Primer (20 pmol/µl)
 1 µl Template DNA (0,5 µg/µl Ov33-pGEX)
 2 µl 2 mM dNTP Gemisch
 5 µl 10x PCR Puffer mit MgCl₂
 1 µl Taq-Polymerase (1U/µl)
 ad 50 µl HPLC Wasser

PCR-Amplifikationszyklus

Ov17 Zyklus 1: 2 min 95°C, 2 min 50°C, 4 min 72°C
 2-34: 1 min 95°C, 2 min 50°C, 4 min 72°C
 35: 1 min 95°C, 2 min 50°C, 4 min 72°C

Ov33 Zyklus 1: 3 min 95°C, 1 min 50°C, 1 min 72°C
 2-29: 1 min 95°C, 1 min 50°C, 1 min 72°C
 30: 1 min 95°C, 1 min 50°C, 11 min 72°C

6.2.2.2 **Aufreinigung und Konzentrierung von DNA**

6.2.2.2.1 *Isolation von DNA-Fragmenten*

a) *Phenol-Chloroform Extraktion*

Die Phenol-Chloroform Extraktion wurde nach der Methode von Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) im Verhältnis 1:1 versetzt und 5 min bei RT und 14 000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend im Verhältnis 1:1 mit Chloroform-Isoamylalkohol gewaschen, um verbliebene Reste an Phenol aus der DNA-Lösung zu entfernen. Die DNA wurde mittels Ethanolpräzipitation (Pkt. 6.2.2.2.3) konzentriert.

b) *DNA-Isolierung aus Agarosegelen*

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAEX II Gel-Extraktions-Kit durchgeführt. Das Grundprinzip dieser DNA-Aufreinigung besteht in der Auflösung der Agarose, der selektiven Bindung von Nukleinsäure an Silikatpartikel (Glasmilch) bei einem $\text{pH} \leq 7,5$ unter Hochsalzbedingungen, dem Waschen der gebundenen Nukleinsäuren mit Hochsalzpuffern und der anschließenden Elution der DNA bei $\text{pH} 8,5$ unter Niedrigsalzbedingungen (TE-Puffer oder H_2O). Die Isolierung der DNA erfolgte entsprechend der Vorgaben des Herstellers.

6.2.2.2.2 *Isolation von Plasmid-DNA*

a) *Plasmidaufreinigung aus E. coli mittels Quiagen-Säulen*

Für die Präparation von hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden käuflich erworbene Quiagen-Säulen verwendet. Die Plasmidaufreinigung dieser Kits beruht auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979) mit anschließender Aufreinigung von supercoiled Plasmid-DNA durch Ionenaustausch-Chromatographie. Für die Plasmidisolation wurden Mini- und Midipräparationssäulen verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Vorgaben des Herstellers.

b) Kleine Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse

2 ml LB-Medium wurden nach Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Das Bakterienpellet dieser Kultur wurde in 300 µl Lyse-Puffer resuspendiert und die Suspension nach Zugabe von 0,5 mg/ml RNase 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 150 µl einer 3 M Kaliumazetat/Essigsäure-Lösung wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Plasmid-DNA mittel Ethanolfällung (Pkt. 6.2.2.2.3) konzentriert. Das Plasmidpellet wurde in 25 µl TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

6.2.2.2.3 DNA Konzentrierung mittels Ethanolpräzipitation

DNA wurde aus einer Lösung durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und mit dem 2,5 fachen Volumen an reinem Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde bei 4°C, 15 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer oder H₂O gelöst.

6.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Extinktionsmaximum für Nukleinsäuren) bestimmt. Verunreinigungen wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm (Extinktionsmaximum für Proteine) gemessen. Für saubere Nukleinsäurelösungen sollte der Quotient der Extinktionswerte von 260 nm / 280 nm zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die DNA-Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Nukleinsäure [µg/ml]} = \text{OD}_{260} \times D \times F$$

F = Verdünnungsfaktor

D = 50 µg/ml für doppelsträngige DNA

D = 40 µg/ml für einzelsträngige DNA / RNA

D = 33 µg/ml für Oligonukleotide

6.2.2.4 Restriktionsverdau von Vektoren und DNA-Fragmenten

2-10 µg DNA wurden in einem Reaktionsansatz von 20 µl unter Zusatz der entsprechenden Restriktionsendonukleasen und ihren Puffern geschnitten. Plasmide wurden 2 h, PCR-Produkte 12 h inkubiert. Die Temperaturbedingungen des Restriktionsverdaus wurden nach den Vorgaben des Herstellers für das entsprechende Enzym festgelegt. Die Restriktionsendonukleasen wurden anschließend durch Hitzeinaktivierung deaktiviert oder durch eine Phenol-Chloroform Fällung oder durch Auftrennung im Agarosegel aus dem Reaktionsgemisch entfernt.

6.2.2.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung der Religierung von geschnittenen Vektoren wurden die terminalen 5'-Phosphatgruppen durch eine alkalische Kälberphosphatase abgespalten. 5 µg geschnittene, Phenol-Chloroform aufgereinigte oder gelulierte Vektor-DNA wurden wie folgt dephosphoryliert:

Dephosphorylierungsansatz

5 µg Vektor-DNA
1 µl alkalische Kälberphosphatase (1U/µl)
3 µl 10x Dephosphorylierungspuffer
ad 30 µl H₂O

Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/10 Volumen 200 mM EGTA zum Reaktionsansatz und durch anschließende Inkubation bei 65°C für 10 min gestoppt. Die dephosphorylierte Vektor-DNA wurde Phenol-Chloroform extrahiert.

6.2.2.6 Ligation von DNA

Die Ligation eines DNA-Inserts in den entsprechenden Vektor erfolgte in einem molaren Verhältnis von 3:1, 1:1 und 1:3.

Ligationsansatz:

1 µl Vektor-DNA (ca. 50-100 ng)
4 µl Insert-DNA
1 µl 10x Ligasepuffer
0,5 µl T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/µl)
ad 10 µl HPLC Wasser

Der Ligationsansatz wurde bei 12 °C für 12 bis 48h inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Ligation ohne Insert-DNA durchgeführt.

6.2.2.7 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde zur Aufreinigung von DNA und zur Beurteilung von Restriktionsverdauansätzen durchgeführt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurde eine Konzentration der Agarose von 0,8-2,0% gewählt. Die Agarose wurde durch Erhitzen in 1x TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen der Agarose auf 50°C wurde EtBr aus einem 10 mg/ml Stock auf eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 6x Probenpuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 80 V aufgetrennt. Zur Beurteilung der Größe der aufgetrennten DNA wurden die Molekulargewichtsmarker Biosizer II und V verwendet. Die aufgetrennte DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht.

6.2.2.8 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien erfolgte nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990). 250 ml SOB Medium wurden mit einer Bakterienkolonie des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bei 18°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 (logarithmische Wachstumsphase) inkubiert. Die Bakterien wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das

Bakterienpellet wurde in 80 ml kaltem TB Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. DMSO wurde unter vorsichtigem Schütteln tropfenweise bis zu einer Endkonzentration von 7% zugegeben. Die Bakterien wurden erneut 10 min auf Eis inkubiert, anschließend à 1ml aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz der kompetenten Bakterien betrug 5×10^7 - 1×10^8 transformierte Bakterienkolonien pro μg Plasmid-DNA.

6.2.2.9 Transformation kompetenter E. coli-Bakterien mit Plasmid-DNA

50 ng Plasmid-DNA (1-5 μl) wurden in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Kompetente Zellen wurden bei RT aufgetaut und 100 μl zum Plasmid zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 30 min auf Eis und anschließend für 30 sec bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 900 μl SOB-Medium wurde der Transformationsansatz bei 37°C und 400 rpm für 1 h inkubiert. 100-200 μl des Transformationsansatzes wurden auf eine Agarplatte (mit entsprechendem selektiven Antibiotikum) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Als Kontrollen wurden bei jedem Transformationsansatz zum einen Bakterien ohne Plasmid und zum anderen Bakterien mit einem „leeren“ Plasmid transformiert.

6.2.2.10 Identifizierung positiver Transformanten

6.2.2.10.1 Blau-Weiß-Screening

Bakterien mit einer Mutation im lac Z-Gen (lacZ ΔM15) produzieren eine enzymatisch inaktive β -Galaktosidase, der am N-Terminus 30 AS fehlen. Werden diese Bakterien mit einem Plasmid transformiert, welches die fehlende, sog. α -Region (α -Peptid) induzierbar exprimiert, kann durch α -Komplementation der beiden Proteine das funktionelle Enzym entstehen, welches das chromogene Substrat X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -Galaktosidase) metabolisiert. Die Metabolisierung des Substrates X-gal führt zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonie. Wird der kodierende Bereich des α -Peptids durch den Einbau von Fremd-DNA unterbrochen, so geht die α -Donoraktivität des α -Peptids verloren

und es kann keine aktive- β -Galaktosidase mehr gebildet werden. Transformierte Bakterien, die in ihrem Plasmid Fremd-DNA enthalten bleiben weiß.

LB-Agarplatten wurden für das Blau-Weiß-Screening vorbereitet, indem 40 μ l X-gal (20 mg/ml) und 10 μ l IPTG (1 M) mit einem Drigalski-Stab gleichmäßig ausplattiert wurden.

6.2.2.10.2 Plasmidpräparation und Restriktionsverdau

Zur Kontrolle des Transformationserfolges mittels Restriktionsverdau wurden jeweils 5 weiße Kolonien pro Platte einer Transformation mit Blau-Weiß-Screening oder 10 Kolonien pro Platte einer Transformation ohne Blau-Weiß-Screening überprüft. 2 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz wurden mit jeweils einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Nach Plasmidextraktion mittels alkalischer Lyse (Pkt. 6.2.2.2.2) und anschließendem Restriktionsverdau (Pkt. 6.2.2.4) wurden die DNA-Proben im Agarosegel aufgetrennt und die Bakterienkolonien, deren Plasmid ein Insert enthielt, identifiziert.

6.2.2.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung wurde Plasmid-DNA mittels Quiagensäulen aufgereinigt (Pkt. 6.2.2.2.2). Die Sequenzierung wurde von der Firma AGOWA (Berlin) nach der Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt.

6.2.2.12 Langzeitlagerung von Bakterienstocks

Für die Langzeitlagerung von Bakterien wurden 0,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur mit 0,5 ml sterilem 100%igem Glycerin versetzt. Die Bakterien wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.2.2.13 *Untersuchung des Löslichkeitsverhaltens von rOv17, trOv17 und rOv33*

Eine 20 ml LB-Kultur mit entsprechendem Antibiotikazusatz wurde mit 0,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 wurde die Expression der rekombinanten Proteine durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach 3 h Inkubation wurden 3x2 ml Kultur abgenommen und die Bakterien abzentrifugiert (5 min, 4°C, 15 000 rpm). Die Bakterinpellets wurden in jeweils 200 µl eines Löslichkeitspuffers resuspendiert. Die Löslichkeit wurde mit einem PBS/Triton X-100-Puffer, mit einem Imidazol-Puffer und mit einem 6M Harnstoff-Puffer getestet. Die Bakteriensuspension wurde 30 sec bei 60 W auf Eis beschallt und anschließend bei 15 000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde abgenommen und bei -20°C aufbewahrt. 10 µl des Überstandes und 5 µl der unlöslichen Pelletfraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, um die Löslichkeit der rekombinanten Proteine zu beurteilen. Die Löslichkeit der rekombinanten Proteine bestimmte die Wahl der Aufreinigungsmethode.

6.2.2.14 **Affinitätschromatographische Aufreinigung von rOv17, trOv17 und rOv33**

Alle rekombinanten Proteine wurden im pET-Expressionssystem exprimiert, welches durch die Bereitstellung von 6 Histidinresten am N-Terminus der rekombinanten Proteine eine affinitätschromatographische Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Säule ermöglicht. Für die Aufreinigung rekombinanter Proteine wurde jeweils 1 l LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz mit 20 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 inkubiert. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach einer Inkubationsdauer von 3 h wurden die Bakterien bei 4°C und 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml Bindungspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (100 µg/ml) und DNaseI (5 µg/ml) / RNase A (10 µg/ml) wurde die Suspension für 3 min auf Eis beschallt (60 W) und anschließend bei 4°C und 15 000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min über die mit Bindungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Matrix (1 ml) gegeben. Die beladene Säule wurde

mit 10 ml Bindungspuffer und 50 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins wurde anschließend mit dem entsprechenden Elutionspuffer induziert. Das Eluat wurde in 10 Fraktionen à 2 ml aufgefangen und anschließend dialysiert. Bei nativer Aufreinigung erfolgte die Dialyse mehrmals gegen PBS. Bei denaturierender Aufreinigung erfolgte die erste Dialyse gegen einen 1 M Harnstoffpuffer und anschließend gegen einen 0,5 M und 0,25 M Harnstoffpuffer und im weiteren mehrmals gegen PBS. Die dialysierten Fraktionen wurden sterilfiltriert.

6.2.3 Biochemische Methoden

6.2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test

Die Proteinkonzentration der rekombinanten Parasitenproteine wurde mittels BCA-Test (Smith et al. 1985) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode besteht in der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} , die durch die Peptidbindungen der Proteine unter alkalischen Bedingungen induziert wird. Reduzierte Kupfer-Ionen bilden mit Bicinchonin-Säure (BCA) einen farbigen, wasserlöslichen Chelatkomplex, deren Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen wird. Die Durchführung des BCA-Tests erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

6.2.3.2 Präzipitation von Proteinen

6.2.3.2.1. Acetonfällung

Die Proteinlösung wurde zu 20-50% mit Aceton versetzt und anschließend bei 4°C und 14 000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und wenn erforderlich, verbliebenes Protein erneut mit Aceton gefällt. Das Proteinpellet wurde in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach Erhitzen auf 95°C (3 min) im SDS-PAGE aufgetrennt.

6.2.3.2.2 TCA-Fällung

Aus einer 100%igen TCA-Lösung wurde ein entsprechendes Volumen zum Erreichen einer Endkonzentration von 10% zu der Proteinlösung dazugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend 20 min bei 4°C und 14 000 rpm zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde mit Ethanol-Ether (1:1) gewaschen, um restliche TCA zu entfernen. Das Proteinpellet wurde in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach Erhitzen auf 95°C im SDS-PAGE aufgetrennt.

6.2.3.3. Funktionelle Charakterisierung von rOv17 und trOv17

6.2.3.3.1 Titration der aktiven Zentren von Papain und humanem Cathepsin B, L und S

Die Titration der aktiven Zentren der humanen Cysteinproteasen wurden mit E64 und mit EwC durchgeführt. Die Proteasen wurden hierfür mit verschiedenen Konzentrationen von E64 und EwC für 45 min bei RT in Mikrotiterplatten inkubiert. E64 und EwC wurden in Konzentrationen von 7, 14, 21, 28, 35, 42 und 49 nM eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubation wurde dem Proteasen-Inhibitor-Gemisch fluorogenes Substrat zugesetzt (Tab. 6). Das Endvolumen der Ansätze betrug 250 μ l. Die Restaktivität der Proteasen wurde durch unverzügliche Messung des freigesetzten fluorogenen Produktes Aminomethylcoumarin (AMC) in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (Exzitationswellenlänge 355 nm, Emissionswellenlänge 460 nm).

Tab. 6: Substrate und Substratkonzentration im Titrationstest.

	Substrat	Substratkonzentration
Papain	Z-Phe-Arg-AMC	25 μ M
Cathepsin B	Z-Arg-Arg-AMC	120 μ M
Cathepsin L	Z-Phe-Arg-AMC	10 μ M
Cathepsin S	Z-Val-Val-Arg-AMC	40 μ M

6.2.3.3.2 Titration der wirksamen rOv17 Konzentration

Die Titration der aktiven Zentren von rOv17 erfolgte mit titriertem, humanem Cathepsin L. Cathepsin L wurde mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17 (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 nM) für 45 min bei RT in Microtiterplatten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde dem Proteasen-Inhibitor-Gemisch Z-Phe-Arg-AMC-Substratlösung auf eine Endkonzentration von 10 μ M zugesetzt. Das Endvolumen der Ansätze betrug 250 μ l. Die Restaktivität der Proteasen wurde durch unverzügliche Messung des freigesetzten fluorogenen Produktes AMC in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (Exzitationswellenlänge 355 nm, Emissionswellenlänge 460 nm). Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism.

6.2.3.3.3 Bestimmung der K_M -Werte für Cathepsin L und B

Die kinetischen Messungen erfolgten bei 37°C in einem beheizbaren Photometer über einen Zeitraum von 150 sec. Die Messungen wurden in einem 2 ml-Reaktionansatz in Quarzküvetten, die mit einem Magnetrührer versehen waren, durchgeführt. Für alle Reaktionsansätze wurde 37°C vorgewärmter Probenpuffer verwendet. Vor Beginn der Messungen wurde die Protease in ihrem Probenpuffer für 5 min bei 37°C aktiviert. Anschließend wurde die Proteaseaktivität austitriert, so daß in einem Zeitraum von 60-90 sec 1000 Fluoreszenzeinheiten freigesetzt wurden. Hierfür wurden 1980 µl des vorgewärmten Puffer-Substratlösung in die Küvette vorgelegt und 20 µl der aktivierten Proteaselösung dazugeben. Zeitgleich mit der Zugabe der Protease wurde die Messung gestartet. Entsprechend des Kurvenverlaufs wurde die Protease weiter verdünnt oder konzentriert, um die oben genannte Voraussetzung zu erfüllen. Anschließend wurde die Proteaseaktivität in Anwesenheit von verschiedenen Substratkonzentrationen über einen Zeitraum von 150 sec bei 37°C gemessen (Tab. 7). Hierfür wurden ein entsprechendes Volumen Cathepsin-Probenpuffer in die Quarzküvette vorgelegt und das entsprechende Volumen Substrat aus einer 10 mM Stammlösung zugegeben, so daß ein Endvolumen von 1980 µl erzielt wurde. Die Küvette wurde in das beheizte Fluoreszenzphotometer verbracht. Nach Nullabgleich des Gemisches wurde die Messung nach Zugabe der Protease (20 µl) zeitgleich gestartet. Die Abspaltung der fluorogenen Produktes AMC wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge 460 nm kontinuierlich über einen Zeitraum von 150 sec aufgezeichnet. Für die Messungen wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism.

Tab. 7: Testparameter für die K_M -Wert-Bestimmung.

	Cathepsin-Konzentration	Substrat	Getestete Substratkonzentration
Cathepsin B	1,17 nM	Z-Arg-Arg-AMC	25; 50; 100; 200; 300; 400; 500 µM
Cathepsin L	0,47 nM	Z-Phe-Arg-AMC	0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 50; 6,0; 7,0; 8,0 µM

Der K_M -Wertes für Cathepsin S war bereits am Institut für Biochemie der Universitätsklinik Jena bestimmt worden. Der K_M -Wert für Papain war vorgegeben.

6.2.3.3.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_i von rOv17 und trOv17 für Papain und Cathepsin B, L und S

Die Bestimmung der K_i -Werte für rOv17 erfolgte mit der pflanzlichen Cysteinprotease Papain und mit den humanen Cysteinproteasen Cathepsin B, L und S. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie es bereits für die Bestimmung des K_M -Wertes beschrieben wurde. Für die Bestimmung der K_i -Werte wurde die Proteaseaktivität in Anwesenheit von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (rOv17, trOv17) über einen Zeitraum von 320 sec bei 37°C gemessen. Der vorgewärmte Probenpuffer wurde mit der entsprechenden Menge Inhibitor in die Küvette pipettiert, so daß ein Volumen von 1980 µl erreicht wurde. Die Küvette wurde in das beheizte Fluoreszenzphotometer verbracht. Nach Zugabe der entsprechenden Protease (20 µl) wurde die Messung zeitgleich gestartet. Das Volumen des eingesetzten rOv17/trOv17 wurde so gewählt, daß 5% des Reaktionsendvolumens nicht überschritten wurden. Die getesteten Konzentrationen und Substrate sind in Tab. 8 aufgeführt. Die Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm „GraphPad Prism“.

Tab. 8: Testparameter für die Bestimmung der K_i -Werte.

	Cathepsin-Konzentration	Substratkonzentration	Getestete rOv17-Konzentration	Getestete trOv17-Konzentration
Papain	0,10 nM	25 µM Z-Phe-Arg-AMC	1,7; 2,7; 3,4; 4,1; 5,5 nM	10; 50; 100 nM
Cathepsin B	1,17 nM	40 µM Z-Arg-Arg-AMC	3,5; 35; 70; 173 nM	n.d.
Cathepsin L	0,11 nM	5 µM Z-Phe-Arg-AMC	0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5 nM	10; 50; 100 nM
Cathepsin S	0,09 nM	40 µM Z-Val-Val-Arg-AMC	0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5 nM	10; 50; 100 nM

Das Kontrollprotein rOv33 wurde beispielhaft im Aktivitätstest mit Papain in einer Konzentration von 50, 100 und 200 nM getestet.

6.2.3.4 Fluoreszein-Markierung von rOv17, trOv17 und rOv33

Die Markierung der rekombinanten Parasitenproteine rOv17, trOv17 und rOv33 wurde mit einem Fluoreszein Labeling Kit durchgeführt. Die Markierung der Proteine erfolgte entsprechend der Durchführungsvorschriften des Herstellers. Der molare Reaktionsansatz wurde so gewählt, daß 1 Molekül Protein mit 5 Molekülen Fluos umgesetzt wurde.

6.2.4 Immunologische Methoden

6.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Rekombinant, aufgereinigte Parasitenproteine, Bakterienproteingemische und OvAg-Gesamtextrakt wurden mittels SDS-PAGE unter Anwendung des diskontinuierlichen Puffer-System nach Laemmli (1970) analysiert. Beurteilt wurden die Auftrennung von Proteinen und die Reinheit von Proteinfractionen. Zudem erfolgte eine Schätzung des Molekulargewichts und der Konzentration der aufgetrennten Proteine.

Für die Anfertigung der Acrylamidgele wurden Minigel-Apparaturen verwendet. Die Acrylamidkonzentration (12,5%, 14%, 16%) des Trenngeltes wurde entsprechend des Molekulargewichts der aufzutrennenden Proteine variiert. Für das Sammelgel wurde eine 6%ige Acrylamidlösung verwendet. Die zu analysierenden Proteinfractionen wurden mit 2x Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95°C erhitzt. Nach Beladung des Polyacrylamidgels wurden die Proben bei 120-160 V bei RT oder 4°C aufgetrennt. Zur Charakterisierung des Molekulargewichts der aufzutrennenden Proteine wurde jeweils ein Standard mit vorgefärbten Proteinen definierter Größe im SDS-PAGE mitgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die aufgetrennten Fractionen im Coomassie-Bad angefärbt und anschließend entfärbt und getrocknet. Für eine weitere immunologische Charakterisierung wurden die aufgetrennten Fractionen elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Towbin et al. 1979).

6.2.4.2 Western Blot

Für den Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine bei 400 mA für 3 h oder über Nacht bei 80 mA elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (NZ-Membran) transferiert. Die NZ-Membran wurde anschließend in 3% BSA/TBS für 15 min bei RT inkubiert, um die freien Bindungsstellen der NZ-Membran zu blockieren. Nach 3x Waschem mit TBS wurde die NZ-Membran mit dem ersten Antikörper für 1,5 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden nichtgebundene Antikörper durch 3x Waschen mit TBS entfernt. Die NZ-Membran wurde

anschließend für weitere 1,5 h bei RT mit dem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper inkubiert. Anschließend wurde nach 3x Waschen der NZ-Membran mit TBS die Farbreaktion durch Zugabe des entsprechenden Substrates induziert. Durch Waschen der NZ-Membran in TBS wurde die Farbreaktion gestoppt. Die NZ-Membran wurde anschließend getrocknet.

rOv17:

1. Antikörper: anti-rOv17 Kaninchenserum, 1:500 in BSA/TBS verdünnt
2. Antikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Ak, 1:10000 in 3% BSA/TBS verdünnt

rOv33:

1. Antikörper: anti-rOv33 monoklonaler Maus-Antikörper, IVA7, unverdünnt
2. Antikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege anti-Maus Ak, 1:10000 in 3% BSA/TBS verdünnt

6.2.4.3 Immunisierung von BALB/c Mäusen

Für die Immunisierung der Mäuse wurde das Adjuvans STP, welches sowohl die humorale als auch die zellvermittelte Immunantwort anregt, eingesetzt. Jeweils 6 männliche BALB/c Mäuse (ca. 7 Wochen alt) wurden 3x im Abstand von 12 Tagen mit jeweils 25 µg OvAg in STP immunisiert. Die Mäuse wurden mit dem Narkotikum Metoxyfluran betäubt. Pro Impfdosis wurden 25 µg/250 µl PBS mit 250 µl STP gemischt und subkutan appliziert. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Milzzellen für einen antigenspezifischen Proliferationstest präpariert.

6.2.4.4 ELISA

6.2.4.4.1 Zytokin-ELISA

Für die Zytokinbestimmung wurde der 6 h, 24 h und 48 h Kulturüberstand von unstimulierten oder polyklonal-stimulierten PBMC gewonnen. In den Überständen wurde die Konzentration von IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40, TNF- α , TGF- β und IFN- γ bestimmt. Verwendet wurden kommerzielle ELISA-Sets. Die ELISA wurden entsprechend der Vorgaben des Herstellers

durchgeführt. Für die Bestimmung von IL-2 und IL-12p40 wurden die Kulturüberstände 1:2, für IL-10 1:5 und für die Messung von TGF- β und IFN- γ 1:10 verdünnt. Für die Bestimmung von IL-4 wurden unverdünnte Kulturüberstände eingesetzt. Die Überstände aus den Neutralisationsversuchen mit anti-IL-10 Ak wurden für die Bestimmung von IL-10 1:5, für die Bestimmung von IL-12p40 1:10 und für die Messung von IFN γ 1:20 verdünnt.

6.2.4.4.2 *ELISA zur Quantifizierung der Onchocystatin Ausscheidung durch O. volvulus Weibchen*

Für die Bestimmung der Onchocystatin Ausscheidung wurden 24 h Kulturüberstände von 5 verschiedenen *O. volvulus* Weibchen verwendet. Hierfür wurden ELISA-Platten mit 50 μ l Kulturüberstand plus 25 μ l Beschichtungspuffer und mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17 beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x Waschen mit PBS/0,025% Tween-20 erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit Blockierungspuffer (3% BSA/TBS) bei 37°C. Nach einem erneuten Waschschrift wurde gebundenes Antigen mit einer 1:5000 Verdünnung des rOv17 Kaninchenserums in einem Volumen von 50 μ l für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 3x Waschen wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt (50 μ l), um gebundene rOv17 Ak zu quantifizieren. Nach erneutem Waschen wurden 50 μ l der entsprechenden Enzym-Substrat-Lösung zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 1 min mit 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im ELISA-Meßgerät bestimmt. Als Kontrolle wurde ein Kaninchen-anti-Eimerien Hyperimmunserum (1:5000 verdünnt) getestet.

6.2.4.5 **FACS-Analyse zur Bestimmung der Zielzelle(n) von rOv17**

Humanes Blut wurde mit RPMI 1:1 verdünnt und 300 μ l dieser Verdünnung mit 0,5 μ M Fluos-markiertem rOv17, trOv17 und rOv33 in einem 2 ml-Reaktionsgefäß für 2 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 μ l Inkubationsansatz für eine CD14-Markierung ohne Quenching und 100 μ l für eine CD14-Markierung mit Quenching in je ein Serum-Röhrchen überführt. Die Proben für eine CD14-Markierung ohne Quenching wurden 20 min mit 5 μ l PE-Cy5-makierten CD14-Antikörpern bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml einer Erylyse-Lösung bei RT für 15 min lysiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (4°C/5 min/1000 rpm) und nach einem Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer im Durchflußzytometer analysiert. Die Proben, die gequencht und CD14 markiert werden sollten, wurden zunächst mit 50 µl Quenching-Reagenz versetzt und anschließend sofort 3x mit 1ml FACS-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen resuspendiert und mit 5 µl PE-Cy5-markiertem CD14-Antikörper für 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend wie bereits beschrieben für die durchflußzytometrische Analyse aufbereitet.

6.2.4.6 Bestimmung der Expression von HLA-DR, CD40, CD80 und CD86 auf humanen Monozyten in Anwesenheit von rOv17 und trOv17

Humane PBMC (8×10^5) wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von rOv17, trOv17 und rOv33 bei 37°C inkubiert. Für die anschließende FACS-Analyse der HLA-DR-, CD80-, CD86- und CD40-Expression humaner Monozyten wurde eine Doppelfluoreszenzmarkierung durchgeführt. Monozyten wurden durch eine CD14-Markierung unter Verwendung von PE-Cy5-konjugierten anti-CD14 Ak identifiziert. Für die Markierung von HLA-DR, CD80, CD86 und CD40 wurden PE-konjugierte anti-HLA-DR Ak, FITC-konjugierte anti-CD80 Ak, PE-konjugierte anti-CD86 Ak und FITC-konjugierte anti-CD40 Ak verwendet. Als Kontrollen wurde FITC-konjugiertes IgG1 und PE-konjugiertes IgG2a eingesetzt.

Nach Ablauf der Inkubation der PBMC mit rOv17, trOv17 und rOv33 wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und zu je 2×10^8 in Serum-Röhrchen überführt. Nach dem Waschen der PBMC mit 1 ml FACS-Puffer (5 min/1000 rpm/4°C) wurden die Zellen zur Markierung der Oberflächenmoleküle für 20 min bei 4°C mit den entsprechenden Ak inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Expression der Oberflächenmoleküle im Durchflußzytometer analysiert.

6.2.4.7 Präparation von Mausmilzzellen

Die Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation getötet und in ein 70%iges Ethanolbad getaucht. Die Milz wurde steril entnommen und durch ein engmaschiges Sieb mit Hilfe eines Stempels passiert. Die Milzzellsuspension wurde durch auf- und abpipettieren homogenisiert und nachfolgend in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Milzzellsuspension wurde mit kaltem RPMI auf 40 ml aufgefüllt und 10 min auf Eis inkubiert, um Zellklumpen und grobe Bindegewebesteile sedimentieren zu lassen. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und bei 4°C und 1100 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Milzcellpellet aufgeschüttelt und 10 min in 11 ml Erylyse-Lösung auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation wurden die Milzzellen 2x mit RPMI gewaschen und in 3 ml RPMI komplett aufgenommen. Die Zellzahl wurde in einer 1:100 Verdünnung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

6.2.4.8 Präparation von humanen PBMC

Die Präparation von humanen PBMC wurde mittels einer Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Pro Spender wurden 30 ml Blut zur Aufreinigung von PBMC verwendet. Das Blut wurde mit PBS 1:1 verdünnt. In einem 15 ml-Reaktionsgefäß wurden 3 ml Ficoll mit 10 ml verdünntem Blut überschichtet. In einem 50 ml-Reaktionsgefäß wurden 12 ml Ficoll mit 40 verdünntem ml Blut überschichtet. Nach einer Zentrifugation bei 18°C und 1200 rpm für 40 min (ohne Bremse) wurde die PBMC-Fraktion in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und 3x mit 30 ml RPMI gewaschen (18°C/1200 rpm/10 min). Anschließend wurden die PBMC in 10 ml RPMI komplett aufgenommen und die Zellzahl in einer 1:100 Verdünnung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

6.2.4.9 Depletion von CD14⁺-Zellen

CD14⁺-Zellen wurden aus aufgereinigten PBMC depletiert. Für die Depletion wurden CD14 MicroBeads verwendet. Nach der Aufreinigung der PBMC wurden alle Manipulationen der PBMC auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

PBMC, die aus der Aufreinigung von 30 ml Blut gewonnen wurden ($3-6 \times 10^7$ Zellen), wurden mit 40 ml PBS/1% BSA gewaschen und anschließend in 800 μ l PBS/1% BSA resuspendiert. Die PBMC wurden anschließend für die Blockade von Fc-Rezeptoren mit 3 mg/ml Beriglobin und mit CD14 MicroBeads im Verhältnis 1:5 (200 μ l) für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 14 ml PBS/1%BSA gewaschen (4°C/1200 rpm/ 10 min) und anschließend in 1 ml PBS/1%BSA resuspendiert. Für die Depletion von CD14⁺-Zellen wurden VS⁺-Säulen verwendet. Die weitere Durchführung der Depletion erfolgte entsprechend der Protokollvorgaben des Herstellers.

Die Effektivität der CD14⁺-Depletion wurde durch eine CD14-Markierung der einzelnen Zellfraktionen mit FITC-konjugierten anti-CD14-Ak und anschließender FACS-Analyse überprüft. Hierfür wurden jeweils 50 μ l der Zellfraktionen mit 1 ml PBS/1%BSA gewaschen (4°C/2000 rpm/10 min), in 100 μ l PBS/1% BSA resuspendiert und mit FITC-konjugierten anti-CD14-Ak (1:50 verdünnt) für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der markierten Zellen mit 1 ml PBS/1%BSA wurden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert. Die CD14⁺-negative Zellfraktion wurden auf 97-99% angereichert. Die CD14⁺-depletierte Zellfraktion wurden anschließend mit 40 ml RPMI gewaschen und in 10 ml RPMI komplett aufgenommen. Die Zellen wurden in einer 6-well Kulturplatte verteilt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Noch vorhandene Monozyten wurden so durch Adhärenz aus der Zellfraktion entfernt. Das Adhärenzverfahren wurde nochmals wiederholt und die nichtadhärenten Zellen anschließend mit RPMI komplett über Nacht bei 37°C inkubiert. Die CD14⁺-depletierten Zellen wurden geerntet, zentrifugiert (RT/1200 rpm/10 min) und in RPMI komplett aufgenommen.

6.2.4.10 PHA-Stimulation von humanen PBMC

Humane PBMC wurden in einer Konzentration von $3,5 \times 10^5$ Zellen pro well in eine 96-well Flachbodenplatte ausplattiert und mit 10 μ g/ml PHA stimuliert. Zu den stimulierten PBMC wurden verschiedene Konzentrationen von rOv17 (0,1 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M) und dem Kontrollprotein, rOv33 zugegeben. Für Neutralisationsstudien wurde zu den Ansätzen 1 μ l anti-rOv17 Kaninchenserum zugegeben. Das Endvolumen der Proliferationstests betrug 200 μ l. Die Zellen wurden bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂ Gehalt von 5% für 72

h inkubiert. Für die Bestimmung der Proliferation der PBMC wurden in den letzten 20 h der Inkubation pro Well 1 μCi ^3H -Thymidin zugegeben.

6.2.4.11 Anti-CD3 Ak-Stimulation von humanen PBMC

Humane PBMC ($3,5 \times 10^5$ /well) wurden mit löslichen oder immobilisierten anti-CD3 Ak stimuliert. Für die Stimulation mit löslichen anti-CD3 Ak wurden diese in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Für die Immobilisation von anti-CD3 Ak wurden 50 μl einer 100 $\mu\text{g/ml}$ konzentrierten anti-CD3 Ak Stammlösung pro well einer 96-well Flachbodenplatte pipettiert. und 2 h bei 37°C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch 2x Waschen mit 100 μl PBS entfernt. Die anti-CD3 Ak stimulierte Proliferation wurde in Anwesenheit von 0,5 μM rOv17, trOv17, rOv33 und 200 pg/ml LPS untersucht. Für Neutralisationsstudien wurden 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-IL-10 Ak oder 5 $\mu\text{g/ml}$ eines Maus-IgG₁ Kontroll-Ak eingesetzt. Das Endvolumen der Proliferationstests betrug 200 μl . Die Zellen wurden bei 37°C , 100% Luftfeuchtigkeit und einem CO_2 Gehalt von 5% für 72 h inkubiert. Zur Quantifizierung der Proliferation wurden die Zellen 20 h vor Ablauf der Inkubationszeit mit 1 μCi ^3H -Thymidin inkubiert. Alle Ansätze wurden in Dreieransätzen durchgeführt und alle Versuche mindestens einmal wiederholt.

6.2.4.12 Antigen-spezifische Stimulation von humanen PBMC

Humane PBMC wurden in einer Konzentration von $3,5 \times 10^5$ Zellen pro well in eine 96-well Flachbodenplatte ausplattiert, mit 10 IE/ml PPD stimuliert und der Einfluß von 0,5 μM rOv17, trOv17 und rOv33 auf die Proliferation untersucht. Die Zellen wurden bei 37°C , 100% Luftfeuchtigkeit und einem CO_2 Gehalt von 5% für 96 h inkubiert. Zur Quantifizierung der Proliferation wurden die Zellen 20 h vor Ablauf der Inkubationszeit mit 1 μCi ^3H -Thymidin inkubiert. Alle Ansätze wurden in Dreieransätzen durchgeführt.

6.2.4.13 Stimulation von CD14⁺-depletierten, humanen PBMC mit anti-CD3 Ak / anti-CD28 Ak und PHA

Die CD14⁺-depletierten PBMC wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro well in eine 96-well Flachbodenplatte ausplattiert und mit 2 µg/ml anti-CD3/2,5 µg/ml anti-CD28 Ak oder mit 10 µg/ml PHA stimuliert. Zu den stimulierten PBMC wurden 0,5 µM rOv17, trOv17 und rOv33 zugegeben. Das Endvolumen der Proliferationstests betrug 200 µl. Die Zellen wurden bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂ Gehalt von 5% für 72 h inkubiert. Zur Quantifizierung der Proliferation wurden die Zellen 20 h vor Ablauf der Inkubationszeit mit 1 µCi ³H-Thymidin inkubiert. Alle Ansätze wurden in Dreieransätzen durchgeführt und alle Versuche mindestens einmal wiederholt.

6.2.4.14 Antigen-spezifische Stimulation von Mausmilzzellen

Die Milzzellen ($3,5 \times 10^5$ /well) von OvAg-immunisierten Mäusen wurden mit 10 µg/ml OvAg stimuliert und mit 0,5 µM rOv17, trOv17 oder rOv33 für 96 h bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Nach einer Inkubation von 76 h wurden die Zellen mit je 1 µCi ³H-Thymidin versetzt und weitere 20 h inkubiert.

6.2.4.15 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Zellkulturüberstände wurden nach 6 h, 24 h und 48 h von unstimulierten oder polyklonal stimulierten humanen PBMC geerntet und bei -80°C gelagert.

6.2.4.16 Ernten ³H-Thymidin markierter Zellen und Szintillationsmessung

Die Proliferation der Zellen wurden durch den Einbau von ³H-Thymidin in die DNA sich teilender Zellen quantifiziert. Hierfür wurden die Zellen in den letzten 20 h der Inkubation mit 1 µCi ³H-Thymidin inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die radioaktiv markierten Zellen mit Hilfe eines Zellerntes auf Glasfaserfilter überführt. Die Filter wurden 1

h bei 50°C getrocknet. Anschließend wurde auf einer Heizplatte bei 100°C eine Szintillationsmembran auf die Glasfaserfilter aufgeschmolzen. Nach Erstarren der Szintillationsmembran wurde die Radioaktivität des inkorporierten ^3H -Thymidins in einem Beta-Counter mit einer Zählzeit von 1 min gemessen. Die Proliferation wurde als Funktion der Radioaktivität in cpm dargestellt.

6.2.4.17 LPS-Konzentrationsbestimmung

Die LPS-Konzentration der rekombinanten Proteine wurde mit einem kommerziellen Testkit (Quantitativer Chromogener LAL-Test) bestimmt. Die Proteinfractionen wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Vorgaben des Herstellers.

6.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde am Institut für Informatik der Humboldt-Universität zu Berlin unter Verwendung des Student-T-Tests oder des Wilcoxon-Rank-Tests durchgeführt.

7 LITERATUR

Abrahamson, M., R.W. Mason, H. Hansson, D.J. Buttle, A. Grubb, and K. Ohlsson. 1991. Human cystatin C. role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and its inactivation by leucocyte elastase. *Biochem. J.* 273:621-626.

Abrahamson, M. 1994. Cystatins. *Methods Enzymol.* 244:685-700.

Aicher, A., M. Hayden-Ledbetter, W.A. Brady, A. Pezzutto, G. Richter, D. Magaletti, S. Buckwalter, J.A. Ledbetter, and E. A. Clark. 2000. Characterization of Human Inducible Costimulator Ligand Expression and Function. *J. Immunol.* 164:4689-4696.

Alam, A., L.Y. Cohen, S. Aouad, and R.P. Sekaly. 1999. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J. Exp. Med.* 190:1879-1890.

Allen J.E., and A.S. McDonalds. 1998. Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunol.* 20:241-247.

Alvarez-Fernandez, M., A.J. Barrett, B. Gerhartz, P.M. Dando, J. Ni, and M. Abrahamson. 1999. Inhibition of Mammalian Legumain by Some Cystatins Is Due to a Novel Second Reactive Site. *J. biol. Chem.* 274:19195-19203.

Andersson, J., L. Bjork, C.A. Dinarello, H. Towbin, and U. Andersson. 1992. Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. *Eur. J. Immunol.* 22:2617-2623.

Armitage, R.J., T.W. Tough, B.M. Macduff, W.C. Fanslow, M.K. Spriggs, F. Remsdell, and M.R. Alderson. 1993. CD40 ligand is a T cell growth factor. *Eur. J. Immunol.* 53:2326-2331.

Auerswald, E. A., D.K. Nagler, I. Assfalg-Machleidt, M.T. Stubbs, W. Machleidt, and H. Fritz. 1995. Hairpin loop mutations of chicken cystatin have different effects on the inhibition of cathepsin B, cathepsin L and papain. *FEBS Lett.* 361:179-184.

Barrett, J. 1986. The cystatins: A diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed. Biochim. Acta* 45:1346-1374.

Bej, A.K., M.H. Mahbubani, and R.M. Atlas. 1991. Amplification of nucleic acid by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:301-334.

- Bennett, K., T. Levine, J.S. Ellis, R.J. Peanasky, I.M. Samloff, J. Kay, and B.M. Chain.** 1992. Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E. *Eur. J. Immunol.* 22:1519-1524.
- Beutler, B., and A. Cerami.** 1989. The biology of cachectin/TNF alpha primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* 7:625-655.
- Birnboim, H.C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bjork, I., I. Brieditis, and M. Abrahamson.** 1995. Probing the functional role of the N-terminal region of cystatins by equilibrium and kinetic studies of the binding of Gly-11 variants of recombinant human cystatin C to target proteinases. *Biochem. J.* 306:513-518.
- Bjork, I., I. Brieditis, E. Raub-Segall, E. Pol, K. Hakansson, and M. Abrahamson.** 1996. The importance of the second hairpin loop of cystatin C for proteinase binding. Characterization of the interaction of Trp-106 variants of the inhibitor with cysteine proteinases. *Biochemistry.* 35:10720-10726.
- Brattig, N.W., C. Nietz, S. Hounkpatin, R. Lucius, F. Seber, U. Pichlmeier, and T. Pogonka.** 1997. Differences in cytokine responses to *Onchocerca volvulus* extract and recombinant Ov33 and OvL3-1 proteins in exposed subjects with various parasitologic and clinical states. *J. Infect. Dis.* 176:838-842.
- Brattig, N.W., I. Krawietz, A.Z. Abakar, K.D. Erttmann, T.F. Kruppa, and A. Massougbdji.** 1994. Strong IgG isotypic antibody response in sowdah type onchocerciasis. *J. Infect. Dis.* 170:955-961.
- Burchett, S. K., W.M. Weaver, J.A. Westall, A. Larsen, S. Kronheim, and C.B. Wilson.** 1988. Regulation of Tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 140:3473-3481.
- Camargo, M.M., I.C. Almeida, M.E.S. Pereira, M.A.J. Ferguson, L.R. Travassos, and R.T. Gazzinelli.** 1997. Glykophosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* 158:5890-5901.
- Carafoli, E., and M. Molinari.** 1998. Calpain: A Protease in Search of a Function? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:193-203.
- Caux, C., N. Burdin, L. Galibert, P. Hermann, N. Renard, C. Servet-Delprat, and J. Banchereau.** 1994. Functional CD40 on B lymphocytes and dendritic cells. *Res. Immunol.* 145:235-239.

- Cayabyab, M., J.H. Phillips, and L.L. Lanier.** 1994. CD40 preferentially costimulate activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 152:1523-1531.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber.** 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity. T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184:747-752.
- Cella, M., F. Salusto, and a. Lanzavecchia.** 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:10-16.
- Chan, S.H., B. Perussia, J.W. Gupta, M. Kobayashi, M. Pospisil, H.A. Young, S.F. Wolf, D. Young, S.C. Clark, and G. Trinchieri.** 1991. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 173:869-879.
- Chehimi, J., and G. Trinchieri.** 1994. Interleukin 12: a bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 14:149-161.
- Chen, J.M., P.M. Dando, N.D. Rawlings, M.A. brown, N.E. Young, R.A. Stevens, E. Hewitt, C. Watts, and A.J. Barrett.** 1997. Cloning and Characterization of Mammalian Legumain, an Asparaginyl Endopeptidase. *J. Biol. Chem.* 272:8090-8098.
- Chen, J.M., P.M. Dando, R.A.E. Stevens, M. Fortunato, and A.J. Barrett.** 1998. Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase. *Biochem. J.* 335:111-117.
- Cleveland, M.G., J.D. Gorham, T.L. Murphy, E. Tuomanen, and K.M. Murphy.** 1996. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect. Immun.* 64:1906-1912.
- Creery, W.D., F. Diaz-Mitoma, L. Filion, and A. Kumar.** 1996. Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur. J. Immunol.* 26:1273-1277.
- Cygler, M., and J.S. Mort.** 1997. Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie.* 79:645-652.
- Dafa'alla, T.H., H.W. Ghalib, A. Abdelmageed, and J.F. Williams.** 1992. The profile of IgG and IgG subclasses of onchocerciasis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 88:258-263.
- Dando, P.M., M. Fortunato, L. Smith, C.G. Knight, J.E. McKendrick, and A.J. Barrett.** 1999. Pig kidney legumain: an asparaginyl endopeptidase with restricted specificity. *Biochem. J.* 339:743-749.

- D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N.M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri.** 1993. Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Human Lymphocyte Interferon γ -Production by Suppressing Natural Killer Cell Stimulatory Factor/IL-12 Synthesis in Accessory Cells. *J. Exp. Med.* 178:1041-1048.
- de Waal Malefyt, R., H. Yssel, and J.E. de Vries.** 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 150:4754-4765.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C.G. Figdor, and J.E. de Vries.** 1991a. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174:1209-1220.
- de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, M.G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, and J.E. de Vries.** 1991b. Interleukin 10 (IL-10) and Viral IL-10 Strongly Reduce Antigen-specific Human T Cell Proliferation by Diminishing the Antigen-presenting Capacity of Monocytes via Downregulation of Class II Major Histocompatibility Complex Expression. *J. Exp. Med.* 174:915-924.
- Deak, M., A.D. Clifton, J.M. Lucocq, and D.R. Alessi.** 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 17:4426-4441.
- Deehan, M.R., M. J. Frame, R.M. Parkhouse, S.D. Seatter, S.D. Reid, M.M. Harnett, and W. Harnett.** 1998. A phosphorylcholin-containing filarial nematode-secreted product disrupts B lymphocyte activation by targeting key proliferative signaling pathways. *J. Immunol.* 160:2692-2999.
- Deehan, M.R., M.M. Harnett, and W. Harnett.** 1997. A filarial nematode secreted product differentially modulates expression and activation of protein kinase C isoforms in B lymphocytes. *J. Immunol.* 159:6105-6111.
- Denis, F., E. Rheaume, S.M. Aouad, A. Alam, R.P. Sekaly, and L.Y. Cohen.** 1998. The role of caspases in T cell development and the control of immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:1005-1019.
- Deveraux, Q.L., and J.C. Reed.** 1999. IAP-family of proteins-Suppressors of cell death. *Genes Dev.* 13:239-252.
- Deveraux, Q.L., R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed.** 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature.* 388:300-303.
- Dimock, K.A., D.G. Addiss, M.L. Eberhard, and P.J. Lammie.** 1994. Differential proliferative and interleukin-10 responses to fractionated filarial antigens: preferential recognition by patient with chronic lymphatic dysfunction. *J. Infect. Dis.* 170:403-412.

- Ding, L., P.S. Linsley, L.Y. Huang, R.N. Germain, and E.M. Shevach.** 1993. IL-10 Inhibits Macrophage Costimulatory Activity by Selectively Inhibiting the Up-Regulation of B7 Expression. *J. Immunol.* 151:1224-1234.
- Doetze, A., J. Satoguina, G. Buchard, T. Rau, C. Löliger, B. Fleischer, and A. Hoerauf.** 2000. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by Th3/Tr1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor- β but not by a Th1 to Th2 shift. *Int. Immunol.* 12:623-630.
- Doetze, A., K.D. Erttmann, M.Y. Gallin, B. Fleischer, and A. Hoerauf.** 1997. Production of both IFN-gamma and IL-5 by *Onchocerca volvulus* S1 antigen-specific CD4⁺ T cells from putatively immune individuals. *Int. Immunol.* 9:721-729.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen.** 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 5:1365-1369.
- Duke, B.O.** 1993. The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Trop. Med. Parasitol.* 44:61-68.
- Elkhalifa, M.Y., H.W. Ghalib, T. Dafa'Alla, and J.F. Williams.** 1991. Suppression of human lymphocyte responses to specific and non-specific stimuli in human onchocerciasis. *Clin. Exp. Immunol.* 86:433-439.
- Elkon, K.B.** 1999. Caspases: Multifunctional Proteases. *J. Exp. Med.* 190:1725-1727.
- Elson, L.H., M.H. Calvopina, W.Y. Paredes, E.N. Araujo, J.E. Bradley, R.H. Guderian, and T.B. Nutman.** 1995. Immunity in Onchocerciasis: Putative Immune Persons Produce a Th1-like Response to *Onchocerca volvulus*. *J. Infect. Dis.* 171:652-658.
- Elson, L.H., R.H. Guderian, E. Araujo, J.E. Bradley, A. Days, and T.B. Nutman.** 1994. Immunity to onchocerciasis: identification of a putatively immune population in a hyperendemic area of Ecuador. *J. Infect. Dis.* 169:588-594.
- Emori, Y., H. Kawasaki, S. Imajoh, K. Imahori, and K. Suzuki.** 1987. Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3590-3594.
- Flaherty, S.F., D.T. Golenbock, F.H. Milham, and R.R. Ingalls.** 1997. CD11/CD18 leucocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxins. *J. Surg. Res.* 73:85-89.
- Gallin, M., K. Edmonds, J.J. Ellner, K.D. Erttmann, A.T. White, H.S. Newland, H.R. Tayler, and B.M. Geene.** 1988. Cell-mediated immune responses in human infection with *Onchocerca volvulus*. *J. Immunol.* 140:1999-2007.

Grewal, I.S., and R.A. Flavell. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 16:111-135.

Grewal, I.S., J. Xu, and R.A. Flavell. 1995. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature.* 378:617-620.

Grunvald, E., M. Chiaramonte, S. Hieny, M. Wysocka, G. Trinchieri, S.N. Vogel, R.T. Gazzinelli, and A. Sher. 1996. Biochemical characterization and protein kinase C dependency of monokine-inducing activities of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 64:2010-2018.

Guagliardi, L.E., B. Koppelman, J.S. Blum, M.S. Marks, P. Cresswell, and F.M. Brodsky. 1990. Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature.* 343:133-139.

Halfon, S., J. Ford, J. Foster, L. Dowling, L. Lucian, M. Sterling, Y. Xu, M. Weiss, M. Ikeda, D. Liggett, A. Helms, C. Caux, S. Lebercque, C. Hannum, S. Menon, T. McClanahan, D. Gorman, and G. Zurawski. 1998. Leukostatin, a new Class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 273:16400-16408.

Hall, A., H. Dalboge, A. Grubb, and M. Abrahamson. 1993. Importance of the evolutionarily conserved glycine residue in the N-terminal region of human cystatin C (Gly-11) for cysteine endopeptidase inhibition. *Biochem. J.* 291:123-129.

Hall, A., K. Hakansson, R.W. Mason, A. Grubb, and M. Abrahamson. 1995. Structural basis for the biological specificity of cystatin C. Identification of leucine 9 in the N-terminal binding region as a selectivity-conferring residue in the inhibition of mammalian cysteine peptidases. *J. Biol. Chem.* 270:5115-5121.

Harnett, W., M.R. Deehan, K.M. Houston, and M.M. Harnett. 1999. Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein. *Parasite Immunol.* 21:601-608.

Hartmann, S., B. Kyewski, B. Sonnenburg, and R. Lucius. 1997. A filarial cysteine protease inhibitor downregulates T cell proliferation and enhances IL-10 production. *Eur. J. Immunol.* 27:2253-2260.

Hoerauf, A., L. Volkmann, C. Hamelmann, O. Adjei, I.B. Autenrieth, B. Fleischer, and D.W. Buttner. 2000. Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *Lancet.* 355:1242-1243.

Howard, M., A. O'Garra, H. Ishida, R. de Waal Malefyt, and J. Vries. 1992. Biological properties of interleukin-10. *J. Clin. Invest.* 12:239-247.

Hutloff, A., A.M. Dittrich, K.C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R.A. Kroczek. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 397:263-266.

Illy, C., O. Quraishi, J. Wang, E. Purisima, T. Vernet, and J.S. Mort. 1997. Role of the Occluding Loop in Cathepsin B Activity. *J. Biol. Chem.* 272:1197-1202.

Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96:23-28.

Janeway, C.A., and K. Bottomly. 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*. 76:275-285.

Jenkins, M.R., J.D. Ashwell, and R.H. Schwartz. 1988. Allogenic non-T spleen cells restore the responsiveness of normal T cell clones stimulated with antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 140:3324-3330.

Katunuma, N., Y. Matsunaga, and T. Saibara. 1994. Mechanism and Regulation of Antigen Processing by Cathepsin B. *Advan. Enzyme Regul.* 34:145-158.

Kiener, P.A., P. Moran-Davis, B.M. Rankin, A.F. Wahl, A. Aruffo, and D. Hollenbaugh. 1995. Stimulation of CD40 with purified soluble gp36 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J. Immunol.* 155:4917-1925.

King, C.L., S. Mahanty, V. Kumaraswami, J.S. Abrams, J. Regunathan, K. Jayaraman, E.A. Ottesen, and T.B. Nutman. 1993. Cytokine Control of Parasite-specific Energy in Human Lymphatic Filariasis. *J. Clin. Invest.* 92:1667-1673.

Kirschke, H., A.J. Barrett, and N.D. Rawlings. 1995. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *CCQ*. 2:1581-1643.

Kirschke, H., and A.J. Barrett. 1987. In: *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*. (Glaumann, H. und Ballard, F.J. Eds) pp. 193-238, Academic Press, London.

Klager, S., H.E. Hagen, and J.E. Bradley. 1999. Effects of an *Onchocerca*-derived cysteine protease inhibitor on microfilariae in their simuliid vector. *Parasitology*. 118:305-310.

Kobayashi, M., L. Fritz, M. Ryan, R.M. Hewick, S.C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, and G. Trinchieri. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170:827-845.

- Kubin, M., J.M. Chow, and G. Trinchieri.** 1994a. Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor- α , and IL-10 production in human myeloid leukemia cell lines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells. *Blood.* 83:1847-1855.
- Kubin, M., M. Kamoun, and G. Trinchieri.** 1994b. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J. Exp. Med.* 180:211-222.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lal, R.B., V. Kumaraswami, C. Steel, and T. B. Nutman.** 1990. Phosphorylcholine-containing antigens of *Brugia malayi* nonspecifically suppress lymphocyte function. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42:56-64.
- Lanzavecchia, A.** 1990. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8:773-793.
- Leid, R. W., C.M. Suquet, H.G.A. Bouwer, and D.J. Hinrichs.** 1986. Interleukin Inhibition by a Parasite Proteinase Inhibitors, Taeniastatin. *J. Immunol.* 137:2700-2702.
- Leung, D.Y.M., M. Gately, A. Trumble, B. Ferguson-Darnell, P.M. Schlievert, and L.J. Picker.** 1995. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin-12. *J. Exp. Med.* 181:747-753.
- Lindahl, P., M. Nycander, K. Ylinenjarvi, E. Pol, and I. Bjork.** 1992. Characterization by rapid-kinetic and equilibrium methods of the interaction between N-terminally truncated forms of chicken cystatin and the cysteine proteinases papain and actinidin. *Biochem. J.* 286:165-171.
- Ling, V., P.W. Wu, H.F. Finnerty, K.M. Bean, V. Spaulding, L.A. Fouser, J.P. Leonard, S.E. Hunter, R. Zollner, J.L. Thomas, J.S. Miyashiro, K.A. Jakobs, and M. Collins.** 2000. Cutting edge: identification of GL-50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS-receptor. *J. Immunol.* 164:1653-1657.
- Lucius, R., H. Schulz-Key, D.W. Buttner, A. Kern, B. Kaltmann, J. Prod'homme, F. Seber, R.D. Walter, K.C. Saxena, and H.J. Diesfeld.** 1988. Characterization of an immunodominant *Onchocerca volvulus* antigen with patient sera and a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 167:1505-1510.

- Luder, C.G.K., H. Schulz-Key, M. Banla, S. Pritze, and P.T. Soboslay.** 1996. Immunoregulation in onchocerciasis: predominance of Th1-type responsiveness to low molecular weight antigens of *Onchocerca volvulus* on exposed individuals without microfilaridermia and clinical disease. *Clin. Exp. Immunol.* 105:245-253.
- Lustigman, S., B. Brotman, T. Huima, A.M. Prince, and J.H. McKerrow.** 1992. Molecular cloning and characterization of Onchocystatin, a cysteine protease inhibitor of *Onchocerca volvulus*. *J. Biol. Chem.* 267:17339-17346.
- Lustigman, S., B. Brotman, T. Huima, and A.M. Prince.** 1991. Characterization of an *Onchocerca volvulus* cDNA clone encoding a genus specific antigen present in infective larvae and adult worms. *Mol. Bio. Para.* 45:65-76.
- Lustigman, S., J.H. McKerrow, K. Shah, J. Lui, and T. Huima.** 1996. Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J. Biol. Chem.* 271:30181-30189.
- Ma, X., J.M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S.F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri.** 1996. The interleukin-12p40 gene promoter is primed by interferon- γ in monocytic cells. *J. Exp. Med.* 183:147-157.
- MacDonals, A.S., R.M. Maizels, R.A. Lawrence, I. Dransfield, and J.E. Allen.** 1998. Requirement for In Vivo Production of IL-4, but Not IL-10, in the induction of Proliferative Suppression by Filarial Parasites. *J. Immunol.* 160:4124-4132.
- Machleidt W., U. Thiele, B. Laber, I. Assfalg-Machleidt, A. Esterl, G. Wiegand, J. Kos, V. Turk, and W. Bode.** 1989. Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor. *FEBS Lett.* 243:234-238.
- Mackenzie, C.D., J.F. Williams, B.M. Sisley, M.W. Steward, and J. O'Day.** 1985. Variations in Host Responses and the Pathogenesis of Human Onchocerciasis. *Rev. Infect. Dis.* 7:802-808.
- Maekawa, Y., K. Himeno, H. Ishikawa, H. Hisaeda, T. Sakai, T. Dainichi, T. Asao, R. Good, and N. Katunuma.** 1998. Switch of CD4+T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* 161:2120-2127.
- Mages, H.W., A. Hutloff, C. Heuck, K. Buchner, H. Himmelbauer, F. Oliveri, and R.A. Kroczeck.** 2000. Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur. J. Immunol.* 30:1040-1047.
- Mahanty, S., and T.B. Nutman.** 1995. Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of interleukin 10. *Paras. Immunol.* 17:385-392.

- Mahanty, S., M. Ravichandran, U. Raman, K. Jayaraman, V. Kumaraswami, and T.B. Nutman.** 1997. Regulation of Parasite Antigen-Driven Immune Responses by Interleukin-10 (IL-10) and IL-12 in Lymphatic Filariasis. *Infect. Immun.* 65:1742-1747.
- Mahanty, S., S.N. Mollis, M. Ravichandran, J.S. Abrams, V. Kumaraswami, K. Jayaraman, E.A. Ottesen, and T.B. Nutman.** 1996. High levels of spontaneous and parasite antigen-driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hyporesponsiveness in human lymphatic filariasis. *J. Infect. Dis.* 173:769-773.
- Manoury, B., E.W. Hewitt, N. Morrice, P.M. Dando, A.J. Barrett, and C. Watts.** 1998. An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature.* 396:695-699.
- Marino, M.W., A. Dunn, D. Grail, M. Inglese, Y. Noguchi, E. Richards, A. Jungbluth, H. Wada, M. Moore, B. Williamson, S. Basu, and L. J. Old.** 1997. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:8093-8098.
- McAdam, A.J., A.N. Schweitzer, and A.H. Sharpe.** 1998. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 165:231-147.
- McCarthy, J. S., E.A. Ottesen, T.B. Nutman.** 1994. Onchocerciasis in endemic and nonendemic populations: differences in clinical presentation and immunologic findings. *J. Infect. Dis.* 170:736-741.
- Meisel, C., K. Vogt, C. Platzer, F. Randow, C. Liebenthal, and H.-D. Volk.** 1996. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor- α and interleukin-10 expression. *Eur. J. Immunol.* 26:1580-1586.
- Menard, H.A., and M. El-Amine.** 1996. The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Immunol. Today.* 17:545-547.
- Moore K.W., A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira, and T.R. Mosman.** 1993. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11:165-190.
- Morrison, D.C., and L. Ryan.** 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann. Rev. Med.* 38:417-432.
- Nagler, D.K., and R. Menard.** 1998. Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett.* 434:135-139.
- Nakagawa T., W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters, and A. Rudensky.** 1998. Cathepsin L: Critical role in Ii Degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science.* 280:450-453.

- Nakagawa, T.Y., and A.Y. Rudensky.** 1999a. The role of lysosomal proteinases in MHC II class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* 172:121-129.
- Nakagawa, T.Y., W.H. Brissette, P.D. Lira, R.J. Griffiths, N. Petrushova, J. Stock, J.D. McNeish, S.E. Eastman, E.D. Howard, S.R. Clarke, E.F. Rosloniec, E.A. Elliott, and A.Y. Rudensky.** 1999b. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.* 10:207-217.
- Ni, J., M. Abrahamson, M. Zhang, M.A. Fernandez, A. Grubb, J. Su, G.L. Yu, Y. Li, D. Permelee, L. Xing, T.A. Coleman, S. Gentz, R. Thotakura, N. Nguyen, M. Hesselberg, and R. Gentz.** 1997. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J. Biol. Chem.* 272:10853-10858.
- Ni, J., M.A. Fernandez, L. Danielsson, R.A. Chillakuru, J. Zhang, A. Grubb, J. Su, R. Gentz, and M. Abrahamson.** 1998. Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 273:24797-24804.
- Nicklin, M.J., and A.J. Barrett.** 1984. Inhibition of cysteine proteinases and dipeptidyl peptidase I by egg-white cystatin. *Biochem. J.* 223:245-253.
- Oswald, I.P., C.M. Dozois, J. Petit, and G. Lemaire.** 1997. IL-12 synthesis is an obligatory step in trehalose dimycolate-induced activation of mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 65:1364-1369.
- Ottesen, E.A.** 1995. Immune responsiveness and the pathogenesis of human onchocerciasis. *J. Infect. Dis.* 171:659-671.
- Pastrana D., N. Raghavan, P. Fitzgeralds, S. Eisinger, C. Metz, R. Bucala, R. Schleimer, C. Bickel, and A. Scott.** 1998. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infect. Immun.* 66:5955-5963.
- Pierre, P., and I. Mellman.** 1998. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell.* 93:1135-1145.
- Platzer, C., C. Meisel, K. Vogt, M. Platzer, and H.-D. Volk.** 1995. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor- α and cAMP elevating drugs. *Int. Immunol.* 7:517-523.
- Platzer, C., W.-D. Docke, H.-D. Volk, and S. Prosch.** 2000. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *J. Neuroimmunol.* 105:31-38.

- Poltorak, A., X. He, I. Smirnowa, M.Y. Liu, C.V. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, P. Layton, and B. Beutler.** 1998. Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/19ScCr mice. Mutations in Tlr4 gene. *Science*. 282:2985-2088.
- Puri, L., and Y. Factorovich.** 1988. Selective inhibition of antigen presentation to cloned T cells by protease inhibitors. *J. Immunol.* 141:3313-3317.
- Randow, F., U. Syrbe, C. Meisel, D. Krausch, H. Zuckermann, C. Platzer, and H.-D. Volk.** 1995. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 181:1887-1892.
- Rawlings, N.D., and A.J. Barrett.** 1994. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244:461-486.
- Riese, J.R., R.N. Mitchell, J.A. Villadangos, G.P. Shi, J.T. Palmer, E.R. Karp, G.T. De Sanctis, H.L. Ploegh, and H.A. Chapman.** 1998. Cathepsin S Activity Regulates Antigen Presentation and Immunity. *J. Clin. Invest.* 101:2351-2363.
- Riese, R.J., P.R. Wolf, D. Bromme, L.R. Natkin, J.A. Villadangos, H.L. Ploegh, and H.A. Chapman.** 1996. Essential Role for Cathepsin S in MHC Class II-Associated Invariant Chain Processing and Peptide Loading. *Immunity.* 4:357-366.
- Robey, E., and J.P. Allison.** 1995. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptors and costimulatory molecules. *Immunol. Today.* 16:306-310.
- Roche, P.A., and P. Cresswell.** 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature.* 345:615-618.
- Roy, N., Q.L. Deveraux, R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed.** 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16:6914-6925.
- Rozman, J., J. Stojan, R. Kuhelj, V. Turk and B. Turk.** 1999. Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett.* 459:358-362.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, and K.B. Mullis.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-491.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour.

- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467.
- Sartono, E.Y., C.M. Kruize, F. Partorno, A. Kurniawan, R.M. Maizels, and M. Yakdanbaksh.** 1995. Specific T cell unresponsiveness in human filariasis: diversity in underlying mechanisms. *Parasite Immunol.* 17:587-594.
- Sato, Y., M. Roman, H. Tighe, D. Lee, M. Corr, M. Nguyen, G.J. Silverman, M. Lotz, D.A. Carson, and E. Raz.** 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science.* 273:352-354.
- Scholl, P., A. Diez, W. Mourad, J. Parsonnet, R.S. Geha, and T. Chatila.** 1989. Toxic shock syndrome toxin 1 binds to major histocompatibility complex class II molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:4210-4214.
- Scott, P.** 1993. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science.* 260:496-497.
- Shi, G.P., R.A.R. Bryant, R. Riese, S. Verhelst, C. Driessen, Z. Li, D Bromme, H.L. Ploegh, and H.A. Chapman.** 2000. Role for Cathepsin F in Invariant Chain Processing and Major Histocompatibility Complex Class II Peptide Loading by Macrophages. *J. Exp. Med.* 191:1177-1185.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, and D.C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- Sorimachi, H., S. Ishiura, and K. Suzuki.** 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328:721-732.
- Sotiropoulou, G., A. Anisowicz, and R. Sager.** 1997. Identification, cloning, and characterisation of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer. *J. Biol. Chem.* 272:903-910.
- Steel, C., and T.B. Nutman.** 1993. Regulation of IL-5 in Onchocerciasis. A Critical Role for IL-2. *J. Immunol.* 150:5511-5518.
- Suzuki, K., and H. Sorimachi.** 1998. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.* 433:1-4.
- Swallow, M.M., J.J. Wallin, and W.C. Sha.** 1999. B7h, a Novel Costimulatory Homolog of B7.1 and B7.2, Is Induced by TNF- α . *Immunity.* 11:423-432.
- Sztein, M.B., P.S. Steeg, H.M. Johnson, and J.J. Oppenheim.** 1984. Regulation of human peripheral blood monocyte DR antigen expression in vitro by lymphokines and recombinant interferons. *J. Clin. Invest.* 73:556-565.

- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 11:443-451.
- Tamm, I., Y. Want, E. Sausville, D.A. Sudiero, N. Vigna, T. Oltersdorf, and J.C. Reed.** 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by FAS (CD95), Bax, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 59:5315-5320.
- te Velde, A.A., J.P.G. Klomp, B.A. Yard, H.E. de Vries, and C.G. Figdor.** 1988. Modulation of phenotypic and functional properties of human blood monocytes by IL-4. *J. Immunol.* 140:1548-1554.
- Toossi, Z., M. Mineck, E. Seeholtzer, S.A. Fulton, B.D. Hamilton, and C.S. Hirsch.** 1997. Modulation of IL-12 by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in Mycobacterium tuberculosis-infected mononuclear phagocytes and in patients with active tuberculosis. *J. Clin. Lab. Immunol.* 42:59-75.
- Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 76:282-285.
- Trinchieri, G.** 1994. Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T helper cells type I and cytotoxic lymphocytes. *Blood.* 84:4008-4027.
- Trinchieri, G.** 1998. IL-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv. Immunol.* 70:83-243.
- Turk, B., I. Dolenc, V. Turk and J.G. Bieth.** 1993. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry.* 32:375-380.
- Ulevitch, R.J.** 1999. Toll gates for pathogen selection. *Nature.* 401:755-756.
- Van der Poux Kraan, T.C.T.M., L.C.M. Boeije, R.J.T. Smeenk, J. Wijdenes, and L.A. Aarden.** 1995. Prostaglandin-E is a potent inhibitor of human interleukin-12 production. *J. Exp. Med.* 181:775-779.
- Vidard, L., K.L. Rock, and B. Benacerraf.** 1991. The generation of immunogenic peptides can be selectively increased or decreased by proteolytic enzyme inhibitors. *J. Immunol.* 147:1786-1791.
- Villadangos, J.A., R.A.R. Bryant, J. Deussing, A. Lennon-Dumenil, R.J. Riese, W. Roth, P. Saftig, G. Shi, H.A. Chapman, C. Peters, and H.L. Ploegh.** 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 172:109-120.

- Wanidworanun, C., and W. Strober.** 1993. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J. Immunol.* 151:6853-6861.
- Ward, D.J., T.B. Nutman, G. Zea-Flores, C. Portocarrero, A. Lujan, and E.A. Ottesen.** 1988. Onchocerciasis and Immunity in Humans: Enhanced T Cell Responsiveness to Parasite Antigen in Putatively Immune Individuals. *J. Infect. Dis.* 157:536-543.
- Ware, C.F., P.D. Crowe, M.H. Grayson, M.J. Androlewicz, and J.L. Browning.** 1992. Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J. Immunol.* 149:3881-3888.
- Watts, C.** 1997. Capture and Processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Ann. Rev. Immunol.* 15:821-850.
- Westerndorf, J.M., P.N. Rao, and L. Gerace.** 1994. Cloning of cDNAs for M-phase phosphoproteins recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:714-718.
- WHO.** 1995. Onchocerciasis and its control. World Health Organ Tech Rep Ser. 852.
- Willenbucher, J., W. Hofle, and R. Lucius.** 1993. The filarial antigens Av33/Ov33-3 show striking similarities to the major pepsin inhibitor from *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57:349-351.
- Williams, F., A. Marchant, J.P. Delville, C. Gerard, A. Delvaux, T. Velu, M. de Boer, and M. Goldman.** 1994. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 24:1007-1009.
- Williams, M.A., S.M. Kelsey, and A.C. Newland.** 1999. GM-CSF and Stimulation of Monocyte/Macrophage Function In Vivo Relevance and In Vivo Observations. *Eur. J. Cancer.* 35:18-22.
- Wolf, P.R., and H.L. Ploegh.** 1995. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:267-306.
- Wolk, K., W.D. Docke, V. von Baehr, H.-D. Volk, and R. Sabat.** 2000. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood.* 96:218-223.
- Wright, S.D.** 1995. CD14 and innate recognition of bacteria. *J. Immunol.* 155:6-8.
- Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, and J.C. Mathison.** 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 149:1431-1433.

- Yamaoka, K.A., J.P. Kolb, N. Miyasaka, G. Inuo, and K. Fujita.** 1994. Purified excretory-secretory component of filarial parasite enhances Fc epsilon RII/CD23 Expression on human splenic B and T cells and IgE synthesis while potentiating T-helper type 2-related cytokine generation from T cells. *Immunology.* 81:507-512.
- Yang, R.B., M.R. Mark, A. Gray, A. Huang, M.H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W.I. Wood, A.L. Gurney, and P.J. Godowski.** 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature.* 395:284-288.
- Yang, Y., and J.M. Wilson.** 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science.* 273:1862-1864.
- Yin, D., L. Zhang, R. Wang, L. Radvanyi, C. Haudenschild, Q. Fang, M.R. Kehry, and Y. Shi.** 1999. Ligation of CD28 in vivo induces CD40 ligand expression and promotes B cell survival. *J. Immunol.* 163:4328-4334.
- Yokozeki, H., I. Katayama, O. Ohki, M. Arimura, K. Takayama, T. Matsunaga, T. Satoh, T. Umeda, M. Azuma, K. Okumura, and K. Nishioka.** 1997. Interferon-gamma differentially regulates CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) expression on human Langerhans cells. *Br. J. Dermatol.* 136:831-837.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen:

Schönemeyer, A., R. Lucius, B. Sonnenburg, N. Brattig, U. Rathjens, R. Sabat, K. Schilling, J. Bradley and S. Hartmann. 2000. Downregulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. Zur Publikation eingereicht.

Hartmann, S., A. Schönemeyer, B. Sonneburg, B. Vray and R. Lucius. Cystatins of filarial nematodes upregulate the nitric oxide production if interferon- γ -activated murine macrophages through production of TNF- α and IL-10. Zur Publikation eingereicht.

Vorträge und Poster

Vorträge:

Schönemeyer, A., B. Sonnenburg, R. Lucius and S. Hartmann. Immunomodulation of human T cell responses by *Onchocerca volvulus* cystatin.
Spring Meeting. British Society for Parasitology
Warwick, Großbritannien, 11.-14. April 1999.

Schönemeyer, A., B. Sonnenburg, N. Brattig, R. Lucius and S. Hartmann.
Ein Cysteinproteasen Inhibitor der humanpathogenen Filarie *Onchocerca volvulus* supprimiert die T-Zell Proliferation und moduliert Monozytenfunktionen
5. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“
Burg Rothenfels, Deutschland, 19.-21. November 1999

Schönemeyer, A., B. Sonnenburg, N. Brattig, R. Lucius and S. Hartmann. *Onchocerca volvulus* cystatin: role in the induction of cellular hyporeactivity.
19. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie.
Stuttgart-Hohenheim, Deutschland, 28. März-1. April 2000.

Poster:

Schönemeyer, A., B. Sonnenburg, R. Lucius and S. Hartmann. Vergleichende Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung des *A. viteae*- und *O. volvulus* Cystatins. 18. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie. Dresden, Deutschland, 24. März-28. März 1998.

Schönemeyer, A., B. Sonnenburg, R. Lucius and S. Hartmann. In vitro modulation of human and murine T cell responses by filarial cystatins. Bundesministerium für Bildung und Forschung. European Conference. Perspectives on Infectious Disease Research Dresden, Deutschland, 1. Februar-3. Februar 1999.

Buchbesprechung:

Nahrungsketten-Risiken durch Krankheitserreger, Produkte der Gentechnologie und Zusatzstoffe?. Leopoldina-Symposium vom 8.-10. Mai 1998 in Jena. Wissenschaftliche Leitung: Th. Hiepe, J. Eckert, H. Gürtler, W. Köhler, D. Schimmel. Nova Acta Leopoldina ; N.F., Nr. 309: Bd. 79. ISBN 3-335-00610-0. (245 S., 36 Abb., 86 Tab., Literaturverzeichnis zum Abschluß jeden Beitrags.)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Annett Schönemeyer
Geburtsdatum: 17. August 1970
Geburtsort: Teterow
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung

1077-1985 Polytechnische Oberschule Gnoien
1985-1989 Erweiterte Oberschule Neubrandenburg; Abschluß: Abitur

Hochschulausbildung

1989-1996
1989-1990 Praktisches Jahr am Institut für Lebensmittelhygiene der veterinärmedizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
1990-1996 Studium der Veterinärmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin (seit 1993 Freie Universität, Standort Berlin Mitte)
Abschluß: approbierte Tierärztin

Promotion

seit 1996 Arbeit an der Promotion am Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin
Betreuerin: Dr. Susanne Hartmann
Thema: „Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung eines Cysteinproteasen-Inhibitors der humanpathogenen Filarie *Onchocerca volvulus*“

Ich erkläre an Eides Statt, daß ich die Dissertation „Charakterisierung der immunmodulierenden Wirkung eines Cysteinproteasen-Inhibitors der humanpathogenen Filarie *Onchocerca volvulus*“ selbst verfaßt habe, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, Juli 2000

Annett Schönemeyer