Charakterisierung und Identifizierung von immundominanten Bereichen der L3-Chitinase von *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

DIPL.-BIOL. BIRGIT DRABNER

05.08.1969 in Kiel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. J. Rabe

Gutachter: 1. Prof. Lucius
2.Prof. Schmidt
3. Prof. Schneider-Mergener

Datum der Promotion: 08.05.2000

Abstract

Chemotherapeutic treatment of filarial infections has rendered difficult and still insufficient. Therefore, the identification of potentially protective molecules which can be used for vaccine development is desirable. The chitinase of larvae stage three of *Onchocerca volvulus* constitutes a promising antigen. Immunological characterization of this protein and the identification of immunodominat regions was performed in this study. The complete sequence (OvL3-chitinase) and the C-terminal end responsible for the binding of chitin (OvL3-CBD) were cloned in an expression vector, overexpressed in *E. coli* and subsequently purified. Recombinant chitinase was enzymatically active. The OvL3-chitinase and the OvL3-CBD were used for immunization studies using the rodent filaria *A. viteae* in the animal model *M. unguiculatus.* No decreased number of adult worms was observed after immunization with OvL3-CBD in the present of Alum as adjuvans, while chitinase together with STP resulted in the reduction the worm burden to 40 % (first trial) and to 17,7 % (second trial).

Additional immunization studies using BALB/c-mice were performed with OvL3-chitinase in the absence or the presence of two different adjuvans. Spleen cells isolated from mice immunized with chitinase in the absence of adjuvans were devoid of proliferative capacity after *in vitro* antigenic restimulation. Antigen-specific IgG1 antibodies were the only subtype detectable in sera from mice. These results suggested that a Th2 response was induced after immunization with chitinase under these conditions. Including STP or Alum in the immunization protocol a polarization of the obtained immune response was found. Immunization with chitinase together with Alum elicited strong IgG1 response followed by slightly increase of IgG2a and IgG2b. Co-administration of chitinase and STP evoked increased IgG2a and IgG2b antibodies in addition to the observed IgG1 response. Good proliferative responses were observed for spleen cells from mice immunized with chitinase in the present of both adjuvans after *in vitro* restimulation with chitinase. Furthermore stronger T-cell reactivity was found in the group immunized with chitinase/STP. Also chitinase was expressed in Salmonella and oral immunization of mice with this construct enforced the T-cell reactivity, however antigen specific antibodies were undetectable. To further characterize T cell reactivity against OvL3-chitinase T cell epitopes using the Rothbard and Taylor algorithm (1988), Humphreys prediction and the MHC-II-binding motifs from Rammmensee (1995) were identified. All predicted epitopes were synthesized and tested in T-cell proliferation assays. Additional synthetic L3-chitinase-derived overlapping peptides were also used in T-cell proliferation assays. The sensitivity and specificity of the algorithms was evaluated by comparing the predicted epitopes with the epitopes determined by overlapping peptides. Using this approach, prediction based on MHC-II-binding motifs showed the highest sensitivity (0,47) and specificity (0,7). A further increase of the predictive power was obtained

by a combining MHC-II-binding motifs and Rothbard and Taylor algorithm, resulting in increased sensitivity (0,67) but lower specificity (0,33). Five immunodominant regions were identified by all algorithm and four of them were confirmed as T-cell epitopes in T-cell assays. PBMCs isolated from patients affected with *Onchocerca volvulus* from Cameroon were also tested for their reactivity against OvL3-chitinase and the OvL3 CBD in T-cell proliferation assays. After *in vitro* restimulation with OvL3-chitinase and CBD only marginal T-cell response was observed accompanied by release of Th2-like cytokines such as IL-10 when stimulated with chitinase and IL-4, IL-5 and IL-10 when stimulated with CBD. Strong antibody responses of the IgG4 isotype were detected in the serum of 77% of the patients against chitinase and only in 20% of the patients against CBD.

Keywords: chitinase, filariae, T-cell epitopes, adjuvans

Zusammenfassung

Da Filarieninfektionen noch immer chemotherapeutisch schwer bekämpfbar sind, ist die Aufklärung von potentiell protektiven Molekülen, die zur Impfstoffentwicklung von Nutzen sein könnten, von Bedeutung. Ein vielversprechendes Antigen stellt in diesem Zusammenhang die Chitinase von infektiösen Drittlarven von *Onchocerca volvulus* dar. In dieser Arbeit sollte deshalb dieses Protein immunologisch charakterisiert und immundominante Bereiche identifiziert werden. Dazu wurde die cDNA des gesamten Proteins (OvL3-Chitinase) und die cDNA der Domäne, die für die Chitin-Bindung verantwortlich ist (OvL3-CBD), in einen Expressionsvektor kloniert, in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die aufgereinigte OvL3-Chitinase zeigte enzymatische Aktivität. Die OvL3-Chitinase und die OvL3-CBD wurden in Immunisierungsstudien im Tiermodel der Nagetierfilarie *A. viteae* und *M. unguiculatus* eingesetzt. Während die Immunisierung mit OvL3-CBD mit dem Adjuvans Alum zu keiner Reduzierung der Adultwurmlast führte, war nach Gabe der OvL3-Chitinase die Anzahl der Adultwürmer um 40 % bzw. um 17,7% reduziert.

Zusätzlich wurde die OvL3-Chitinase allein und in Kombination mit zwei verschiedenen Adjuvantien (STP und Alum) in Immunisierungsstudien von BALB/c-Mäusen eingesetzt, deren Immunantworten anschließend charakterisiert wurden. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß die Chitinase ohne zusätzliche Gabe eines Adjuvans unter den getesteten Bedingungen eine TH2-Immunantwort induziert. Dies wurde durch die Anwesenheit von Antikörpern der Subklasse IgG_1 deutlich. Außerdem waren Milzzellen dieser Mäuse nicht in der Lage, nach Restimulation mit Chitinase mit Proliferation zu reagieren. Durch den Einsatz der Adjuvantien STP und Alum konnte eine Polarisation der Immunantworten erfolgen. Während die Immunisierung mit Chitinase und Alum zur deutlichen Bildung von IgG_1-Antikörpern und zu einer leichten Erhöhung der Antikörper IgG_{2a} und IgG_{2b} führte, konnte nach Immunisierung mit Chitinase und STP neben Antikörpern der Subklasse IgG_1 deutliche erhöhte OD-Werte von IgG_{2a} und IgG_{2b} gemessen werden. In beiden Gruppen reagierten Milzzellen nach Restimulation mit Chitinase, wobei die Proliferationswerte der STP/Chitinase-Gruppe über denen der Alum/Chitinase-Gruppe lagen.

Durch den Einsatz von Salmonellen, die Chitinase exprimierten, konnten die T-Zell-Antworten verstärkt werden. Es konnten jedoch keine antigen-spezifischen Antikörper gefunden werden.

Mit Hilfe von drei verschiedenen T-Zell-Algorithmen (Algorithmus nach Rothbard und Taylor, nach Humphreys und die MHC-II-Bindungs-Motive nach Rammensee) wurden T-Zell-Epitope innerhalb der OvL3-Chitinase identifiziert. Alle vorhergesagten Epitope wurden als synthetische Peptide hergestellt und in T-Zell-Proliferationstests eingesetzt. Hierzu wurden Milzzellen von Mäusen

verwendet, die dreimal mit rekombinanter Chitinase und dem Adjuvans STP immunisiert worden waren. Um möglichst viele T-Zell-Epitope innerhalb der Chitinase zu ermitteln, wurden überlappende Peptide (Pepscan), die die Gesamtheit der Chitinase umfaßten, in T-Zell-Tests eingesetzt. Die verwendeten Algorithmen wurde auf ihre Sensitivität und Spezifität überprüft, indem die vorhergesagten Epitope mit den ermittelten T-Zell-Epitopen des Pepscans verglichen wurden. Dabei konnte der Algorithmus von Rammensee den besten Index an Sensitivität (0,47) und Spezifität (0,7) erzielen. Eine Kombination der Algorithmen ergab, daß die Verknüpfung des Algorithmus nach Rothbard und Taylor mit den MHC-Bindungs-Motiven nach Rammensee die Sensitivität auf 0,67 erhöhen konnte, doch die Spezifität sank durch die hohe Anzahl der vorhergesagten Epitope auf 0,33. Die Anwendung der Algorithmen auf die Sequenz der OvL3-Chitinase führte zu der Identifizierung von fünf Bereichen, die von allen Algorithmen vorhergesagt wurden, und von denen vier in T-Zell-Proliferationstests deutliche Proliferationswerte erzielten.

Zusätzlich wurde die OvL3-Chitinase und die OvL3-CBD in Kamerun hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, PBMC von Onchozerkose-Patienten zu restimulieren, die aus einem hyperendemischen Onchozerkose-Gebiet stammten. Diese Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse aus den Immunisierungsstudien mit BALB/c-Mäusen, in denen Chitinase eine TH2-Immunantwort hervorrief. Die PBMC der Onchozerkose-Patienten zeigten nur eine sehr geringe Proliferation nach Stimulation mit OvL3-Chitinase und OvL3-CBD. Begleitet wurde diese Proliferation von Ausschüttung typischer TH2-Zytokine wie IL-10 (Chitinase) bzw. IL-4, IL-5 und IL-10 (CBD). Die Untersuchung der Antikörperantworten der Onchozerkose-Patienten zeigte, daß bei 77% der untersuchten Patienten IgG_4-Antikörper gegen die Chitinase und bei 20% gegen die OvL3-CBD im Serum nachgewiesen werden konnten.

Schlagworte: Chitinase, Filarien, T-Zell-Epitope, Adjuvantien

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 6

1. Einleitung 10

1.1 Die Immunantwort bei Filariosen 10

1.2 Die Nagetierfilarie Acanthocheilonema viteae 11

1.3 Rolle der Chitinase im Infektionsverlauf 12

1.4 L3-Chitinase als potentieller Impfstoffkandidat 13

1.5. Ziele der Arbeit 15

2. MATERIAL und METHODEN 16

2.1. Molekularbiologische Methoden 16

2.1.1. Polymerase Ketten Reaktion (PCR) 16

2.1.2. Klonierung der *O. volvulus*-L3-Chitinase und der *O. volvulus*-L3-Chitin-Binde-Domäne in den Expressionsvektor pQE 30 17

2.1.3. Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase und der Chitin-Binde-Domäne in *E. coli* 18

2.1.4. Aufreinigung der *O. volvulus*-L3 Chitinase aus *E. coli*-Lysat 18

2.1.5. Aufreinigung der *O. volvulus*-L3-Chitin-Binde-Domäne (CBD) aus *E. coli*-Lysat 18

2.1.6. Klonierung der *O. volvulus*-L3-Chitinase in den Salmonellenvektor pTECH 19

2.1.7. Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase in *Salmonella typhimurium* 19

2.1.8. Lebendkeimzahlbestimmung von *Salmonella typhimurium* 19

2.1.9. Nachweis von Salmonellen in Kot- und Organproben 20

2.1.10. Herstellung eines *O. volvulus*-Gesamtextraktes (OvAg) 21

2.1.11. Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen 21

2.1.12. Auftrennung von Proteinen in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) 22

2.1.13. Herstellung transformationskompetenter *E. coli* 22

2.1.14. Lagerung und Kultivierung von Bakterien 22

2.1.15. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen 23

2.1.16. Dephosphorylierung von Vektor-DNA 23

2.1.17. Agarose-Gelelektrophorese 23

2.1.18 DNA-Elution aus Agarosegelen 24

2.1.19. Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA 24

2.1.20. Ligation von DNA 24

2.1.21. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* 25

2.2.2. Experimenteller Lebenszyklus der Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae* 26

2.2.3. Immunisierungsversuche mit *O. volvulus*-L3-Chitinase und *O. volvulus*-L3-Chitin-Binde-Domäne in *Meriones unguiculatus* 26

2.2.4. Gewinnung der L3 aus *Ornithodoros moubata* und Infektion der *Meriones unguiculatus* 27

2.2.5. Blutentnahmen 27
2.2.6. Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut *A. viteae*-infizierter *Meriones unguiculatus* 27
2.2.7. Sektion und Isolation von Adultwürmern 28

2.3. Immunologische Methoden 28
2.3.1. Immunisierungsstudien mit verschiedenen Adjuvantien im Mausmodell 28
2.3.2. Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit Salmonellen 29
2.3.3. Isolierung von Maus-Milzzellen 30
2.3.4. Immunblot 30
2.3.5. Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Bestimmung der *O. volvulus*-spezifischen IgG bei der Maus 31
2.3.6. Nachweis spezifischer mRNA mittels reverser Transkription (RT) 32
2.3.7. Isolierung von mRNA für RT-PCR 32
2.3.8. Umschreibung von mRNA in cDNA 32
2.3.9. Amplifikation von Maus-Zytokinen 33

2.4. Charakterisierung von T-Zell-Epitopen innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase 34
2.4.1. Algorithmus von Rothbard und Taylor 35
2.4.2. MHC-II-Bindungs-Motive nach der Vorhersage von Rammensee 35
2.4.3. Algorithmus nach Humphreys 36
2.4.4. Beurteilung der Sensitivität und Spezifität der Algorithmen 36
2.4.5. Herstellung der vorhergesagten T-Zell-Epitope als synthetische Peptide 36

2.5. Aktivitätstest der *O. volvulus-L3-Chitinase* 37

2.6. Charakterisierung der T-Zell-Reaktivität von rekombinanten Proteinen und Peptiden in Feldstudien in Kamerun 37
2.6.1. Lage des Projektgebietes 38
2.6.2. Parasitologische Untersuchungen des Patientenkollektives 38
2.6.3. Isolierung mononukleärer Blutzellen (PBMC) von Onchozerkose-Patienten 38
2.6.4. Zellkultur und Stimulierung von mononukleären Blutzellen 39
2.6.5. Zytokinproduktion von PBMC nach *in vitro*-Stimulation 40
2.6.6. Zytokinnachweis aus Kulturüberständen mononukleärer Blutzellen 40
2.6.7. ELISA zur Bestimmung der *O. volvulus*-spezifischen IgG beim Menschen 41

2.7. Datenverarbeitung 43

2.8. Material 43
2.8.1. Verwendete Tiere für parasitologische Arbeiten 43
Tiere 43
2.8.2. Material für immunologische Arbeiten 43
ELISA 43
Antikörper-Konjugate für ELISA 43
Isolierung von Milzzellen 44

2.8.3. Material für molekularbiologische Arbeiten 45
SDS-PAGE 45
Agarose-Gelelektrophorese 46
Plasmid-Vektoren: 47
Aufreinigung rekombinanter Proteine aus E.coli-Lysat 48
Kultivierung von Bakterien 49
Transformation kompetenter Bakterien 50
Aktivitätstest 50
Isolation von Plasmid-DNA 50
Isolation von DNA aus Agarosegelen 51
Polymerase Kettenreaktion (PCR) 52
2.8.4. Kits und Enzyme 52
2.8.5. Verbrauchsmaterial 52
2.8.6. Laborgeräte 53

***3. Ergebnisse* 55**

***3.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen* 55**

3.1.1. Klonierung der *O. volvulus*-L3-Chitinase in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE 30 55
3.1.2. Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase in pQE30 56
3.1.3. Klonierung der Chitin-Binde-Domäne in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE 30 58
3.1.4. Expression der *O. volvulus*-L3-Chitin-Binde-Domäne in pQE 30 58
3.1.5. Klonierung und Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase in *Salmonella typhimurium* 59

3.2. Strukturanalyse der *O. volvulus*-L3-Chitinase 61

3.3. Überprüfung der Aktivität der rekombinanten *O. volvulus*-L3-Chitinase 61

3.4. Immunisierungsstudien mit rekombinanten Proteinen 62

3.4.1. Studien zur protektiven Immunisierung im Tiermodell der Nagetierfilarie *Achanthoceilonema viteae* 62

3.5. Immunisierung von BALB/c-Mäusen zur Analyse von Immunantworten 66

3.5.1. T-Zell-Antworten gegen die rekombinante *O. volvulus*-L3-Chitinase in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien 66
3.5.2. Antikörperantworten gegen die rekombinante *O. volvulus*-L3-Chitinase in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien 68
3.5.3. Nachweis der Zytokine IL-4, IL-10 und INF-γ von Mäusen mittels RT-PCR 70

3.6. Charakterisierung von T-Zell-Epitopen innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase 75

3.6.1. T-Zell-Epitope nach der Vorhersage von Rothbard und Taylor 75
3.6.2. Vorhersage der MHC-Bindungs-Motive nach Rammensee 76
3.6.3. T-Zell-Epitope nach der Vorhersage von Humphreys 76
3.6.4. Kombination der Algorithmen 77
3.6.5. Vergleich der vorhergesagten T-Zell-Epitope 79

3.7. Einsatz der vorhergesagten Epitope in T-Zell-Proliferationstests 80

3.7.1. T-Zell-Proliferationstests mit Rothbard und Taylor-Peptiden 80

3.7.2. T-Zell-Proliferationstests mit Rammensee-Peptiden 81

3.7.3. T-Zell-Proliferationstests mit Humphreys-Peptiden 81

3.7.4. Proliferationstests mit überlappenden Peptiden der *O. volvulus*-L3-Chitinase (Pepscan) 84

3.8. Einsatz der rekombinanten Proteine und Peptide in Feldstudien in 87

Kamerun 88

3.8.1. Parasitologische Untersuchungen des Patientenkollektives 88

3.8.2 Antikörperantworten der Onchozerkose-Patienten 89

3.8.3. T-Zell-Reaktivität der Patienten gegen rekombinante Proteine und synthetische Peptide 91

3.8.4 Zytokinexpression nach Stimulation mit rekombinanter OvL3-Chitinase und OvL3-CBD 93

4. DISKUSSION 93

4.1. Klonierung der Chitinase und der Chitin-Binde-Domäne 94

4.2. Einsatz der Chitinase in Immunisierungsstudien 95

4.2.1. Einsatz der Chitinase und der Chitin-Binde-Domäne im *A. viteae-Meriones*-Modell 95

4.2.2. Untersuchungen im Mausmodell 97

4.3. Identifizierung von T-Zell-Epitopen innerhalb der OvL3-Chitinase 101

4.3.1. Beurteilung der verwendeten Algorithmen 101

4.3.2. T-Zell-Reaktivität der vorhergesagten Epitopen 104

4.4. Einsatz der rekombinanten Proteine und Peptide in Feldstudien in Kamerun 107

Tagungsbeiträge und Publikationen 124

1. Einleitung

Die Ordnung der Filariida besteht aus fadenförmigen, ovoviviparen, getrenntgeschlechtlichen, gewebe- oder körperhöhlenbewohnenden Würmern mit indirekter Entwicklung. Wichtige Erreger von Parasitosen des Menschen gehören in diese Gruppe: *Wuchereria bancrofti und Brugia malayi* (Erreger der Elephantiasis), *Loa loa* (Erreger der Kamerunbeule) und *Onchocerca volvulus* (Erreger der Flußblindheit oder Onchozerkose). Weltweit sind 18 Million Menschen in den Ländern West- und Ostafrikas, in Mittelamerika und Jemen an Onchozerkose erkrankt. Dabei verläuft die Krankheit nicht tödlich, sondern führt durch den chronischen Verlauf zu degenerativen Veränderungen und zu Blindheit. Dies hat große sozio-ökonomische Folgen für die betroffenen Regionen.

Die Immunantwort bei Filariosen

Die Bewohner in Endemiegebieten entwickeln trotz ähnlicher Exposition gegenüber den Vektoren sehr unterschiedliche Infektionsverläufe und Krankheitsbilder. King und Nutman (1991) teilten die Bevölkerung gemäß ihrer Pathologie und ihres Immunstatus in verschiedene Gruppen ein.

Die meisten Menschen in afrikanischen Endemiegebieten leiden an einer generalisierten Onchozerkose. Die Patienten zeigen eine abgeschwächte oder kaum sichtbare Pathologie, obwohl sich Mikrofilarien in ihrer Haut nachweisen lassen. Untersucht man ihre peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), so zeigen sie eine deutlich verminderte parasitenspezifische Zellproliferation, verbunden mit einer abgeschwächten IL-2- und INF-γ-Produktion (Greene et al. 1985, Gallin et al. 1988, Ward et al. 1988). Auch die Proliferation auf Bakterienantigene ist eingeschränkt. Bartlett et al. (1978) konnte beobachten, daß die Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ (DTH) *in vivo* abgeschwächt ist oder völlig fehlt. Alle diese Anzeichen lassen auf eine generalisierte Immunsuppression schließen.

Dem gegenüber stehen Patienten, bei denen man keine oder nur sehr wenig Mikrofilarien in der Haut nachweisen kann. Sie zeigen aber eine sehr starke zelluläre und humorale Reaktivität auf parasitenspezifische Antigene (Greene et al. 1983, Piessens et al. 1980) und reagieren bei *in vivo*-Hauttest mit *O. volvulus*-Antigen mit einer zellulären Überempfindlichkeitsreaktion (Bartlett et al. 1978). Da die spezifische humorale und zelluläre Immunantwort dieser Patienten hyperreaktiv ist, kommt es zu starken Hautveränderungen, meist an den Extremitäten (lokalisierte Onchozerkose) (Ngu 1978, Brattig et al. 1987).

Es lassen sich in den Endemiegebieten aber auch Menschen finden, die keine Mikrofilarien in der Haut haben und auch keinerlei Pathologie zeigen. Bei der Untersuchung der PBMC dieser Gruppe konnte von Nutman et al. (1987) eine sehr starke Reaktivität auf parasitenspezifisches Antigen gefunden werden. Zusätzlich produzierten sie nach Stimulation mit *O. volvulus*-Antigen signifikant mehr IL-2 (Ward et al. 1988), und in ihren Seren konnten nur verminderte parasitenspezifische IgG- und IgE-Titer nachgewiesen werden.
Diese Menschen scheinen eine ädäquate Immunantwort gegen den Parasiten auszubilden und werden daher als „putative immunes" (vermeintlich Immune) bezeichnet (WHO 1987).

Die Nagetierfilarie Acanthocheilonema viteae

Untersuchungen über die Mechanismen von Immunität, Toleranz und Pathologie der Onchozerkose sind auf Grund der strengen Primaten-Spezifität nur eingeschränkt möglich, so daß auf Tiermodelle ausgewichen werden muß, die Rückschlüsse auf die humanpathogenen Arten erlauben. Hier eignet sich der natürliche Zyklus der Nagetierfilarie *A. viteae* in der Wüstenrennmaus *Meriones unguiculatus* (Abb.1). In diesem Zyklus dient die Lederzecke *Ornithodoros moubata* als Zwischenwirt, die bei der Blutmahlzeit Mikrofilarien (Mf) aufnimmt. Diese können sich dann innerhalb von 6 Wochen durch zweimaliges Häuten zu infektiösen Drittlarven (L3) entwickeln. Bei einer erneuten Blutmahlzeit werden diese L3 auf den Endwirt (*M. unguiculatus*) übertragen, wo sie sich über das L4-Stadium zu Adulten entwickeln. Die Männchen (1,5-3cm) und Weibchen (3-7cm) halten sich im subkutanen Bindegewebe auf, wo es zur Befruchtung der Weibchen kommt. Diese entlassen ungescheidete Mikrofilarien, die im Blut zirkulieren. Dabei verursachen die Filarien nicht die typischen Haut- und Augenveränderungen wie *O. volvulus*, sondern werden von *M. unguiculatus* gut toleriert. Trotzdem können gefundene Ergebnisse wichtige Hinweise für die humane Parasitose liefern, da sich die Adultwürmer wie bei der Onchozerkose im subkutanen Bindegewebe aufhalten. Zudem konnten hohe Homologien von Antigenen auf molekularer Ebene zwischen *O. volvulus* und *A. viteae* gefunden werden (Willenbücher et al. 1993, Adam et al. 1996).

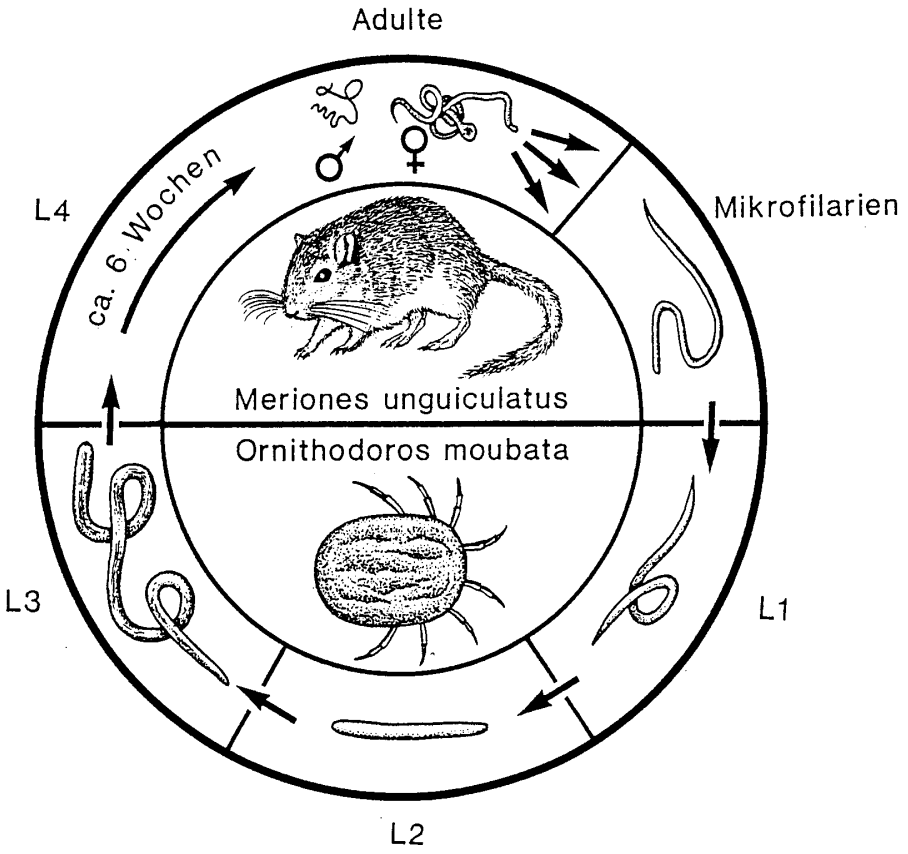


Abb 1. Entwicklungszyklus von Acanthocheilonema viteae (Zeichnung aus dem Archiv des Lehrstuhls für Molekulare Parasitologie)

Rolle der Chitinase im Infektionsverlauf

Chitinasen treten an zwei essentiellen Punkten des Filarienzyklus auf: Während des Eischlupfes und bei der Häutung von L3 zu L4. Filarien sind lebendgebärend, dabei ist das erste Larvenstadium (Mikrofilarien) bei manchen Arten von der Eihülle umgeben (sog. „gescheidete Mikrofilarien“), während bei anderen Arten die Mikrofilarien nur bis zur Geburt von der Eihülle geschützt werden („ungescheidete Mikrofilarien“). Da nachgewiesen werden konnte, daß Eihüllen von Filarien Chitin besitzen (Brydon et al. 1987), liegt eine Beteiligung der Chitinase während des Eischlupfes nahe. Färbungen mit immungoldmarkierten Antikörpern konnten Chitinase bei *Onchocerca spp*. und *A.viteae* in uterinen Stadien nachweisen (Brydon et al. 1987, Adam et al. 1996), während bei gescheideten Arten Chitinase auf der Oberfläche der Mikrofilarien im Blut gefunden werden konnte (Fuhrman et al. 1995). Untersuchungen von Kaltman (1990) konnten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der die *A. viteae*-Chitinase in Immunblots von L3-Antigenen und im L3-Kulturüberständen erkannte, zeigen, daß die Produktion von Chitinase durch Kulturbedingungen von

Wirbeltieren (Wirbeltier-Zellkulturmedium und 37°C) ausgelöst wird. Eine Reduktion der Temperatur auf 28 °C schränkte die Produktion der Chitinase ein, während nach Kultivierung der Chitinase in Insektenmedium und bei 28°C keine Chitinase nachgewiesen werden konnte. Diese Befunde werden durch die Ergebnisse von Wu et al. (1996) unterstützt, die eine Produktion von Chitinase 3-6 Tage unter Kulturbedingungen für Wirbeltiere während der Häutung von L3 zu L4 finden konnten. Durch weitere Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern konnte die Chitinase im zellulären Zytoplasma und im glandulären Ösophagus der L3 lokalisiert werden (Adam et al. 1996). Welche Rolle die Chitinase während der Häutung von L3 zu L4 spielt, ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Eine Möglichkeit wäre der Beitrag der Chitinase, die chitinhaltigen Mundwerkzeuge der Vektoren zu durchbrechen, damit die L3 in das Blut des Wirtes gelangen. Hierzu sind aber keine weiteren Studien durchgeführt worden. Eine andere denkbare Aufgabe der Chitinase könnte in der Interaktion mit Wirtsmolekülen in der frühen Phase der Infektion bestehen. Dabei könnten Moleküle der extrazellulären Matrix mögliche Angriffspunkte darstellen, so daß die Migration durch das Wirtsgewebe erleichtert wird. Diese These wird durch das Vorhandensein von chitinaseähnlichen Vertebraten-Molekülen (z.B. HC gp-39) unterstützt, denen eine Rolle bei der Degradierung von Vertebraten-Gewebe zugeschrieben wird (Hakala et al. 1993). Die dritte Möglichkeit ist die Beteiligung der Chitinase beim Häutungsprozeß der L3 zu L4. Während der Häutungsphase wird der Inhalt des glandulären Ösophagus vollständig in die Zwischenräume ausgeschüttet (Strote und Bonow 1991). Hier könnte die Chitinase bei der Degradierung der L3-Kutikula mitwirken, so daß das Schlüpfen der L4 erleichtert wird.

L3-Chitinase als potentieller Impfstoffkandidat

Das Auftreten von Chitinase wurde immer im Zusammenhang mit Protektion beschrieben. Die ersten Hinweise lieferten die Untersuchungen von Canlas et al. (1984), die durch die passive Immunisierung von *M. unguiculatus* mit dem monoklonalen Antikörper MF1 die Anzahl der zirkulierenden *B. malayi*-Mikrofilarien verringern konnten. Später konnten Fuhrman et al. (1992) das Zielantigen des MF1 als *B. malayi*-Mf-Chitinase identifizieren. Immunisierungen mit rekombinanter Chitinase, die als Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungs-Protein (MBP) in *Escherichia coli* exprimiert wurde, erzielte in *M. unguiculatus* eine Reduzierung der Mikrofilarienlast nicht jedoch der Adultwurmlast (Wang et al. 1997). Einen weiteren Hinweis auf die protektiven Eigenschaften der Chitinase lieferten Analysen der Antikörperantworten von immunisierten *M. unguiculatus*. Dabei stellt die

Immunisierung der *M. unguiculatus* mit strahlungsattenuierten L3 den effektivsten Weg dar, die Tiere vor einer Belastungsinfektion zu schützen (Lucius et al. 1991). Vergleicht man nun die Seren der geschützten Tiere mit denen infizierter Tiere, so erkennen Antikörper geschützter Tiere differentiell eine Bande bei 205 kDa und 67 kDa im Immunblot. Adam et al. (1996) identifizierten diese Proteine als Monomer und Trimer der L3-Chitinase. Gestützt werden diese Ergebnisse von Untersuchungen im Humansystem. Hier konnte ein chitinaseähnliches Protein von Antikörpern der vermeintlich Immunen erkannt werden, während *W. bancrofti*-infizierte Patienten keine Antikörper gegen dieses Protein im Serum enthielten. Dieses 43 kDa große Protein wurde aus der genomischen Expressionsbibliothek von *W. bancrofti* isoliert. Durch Sequenzvergleiche konnte das Protein als ein Chitinase-ähnliches Protein identifiziert werden (Raghavan et al. 1994).

Erste Immunisierungsversuche im *A.viteae-Meriones*-Modell mit der L3-Chitinase von *A. viteae* und *O. volvulus* konnten einen Trend zur Protektion zeigen. Während die Applikation der *A. viteae*-L3-Chitinase mit dem Adjuvans STP in zwei Versuchen zu keiner signifikanten Reduktion der Wurmlast führte, konnte die Gabe von Salmonellen, die *A. viteae*-L3-Chitinase exprimierten, einen signifikanten Schutz vor einer Belastungsinfektion bewirken, der jedoch nicht reproduzierbar war (Adam pers. Mitteilung). Der Einsatz der *O. volvulus*-L3-Chitinase mit komplettem Freund Adjuvans (Wu et al., pers. Mitteilung) konnte die Tiere nicht vor einer Belastungsinfektion schützen. Die Immunisierung mit cDNA, die für Chitinase codierte, konnte in einem Experiment einen signifikanten Schutz erzielen, während in einem zweiten Versuch die Wurmbürde nicht signifikant vermindert war (Harrison et al. 1999). Durch diese Versuche wird deutlich, daß nach Immunisierungen mit L3-Chitinase ein Trend zur Protektion besteht. Optimierungsschritte sind notwendig, die gefundenen Ergebnisse zu bestätigen.

In diesen Studien wurden nur die Antikörperantworten der Tiere untersucht. Die immunologische Charakterisierung der putativ Immunen hat gezeigt, daß diese Gruppe sich durch eine erhöhte T-Zell-Reaktivität (Nutman et al. 1987), verbunden mit einer erhöhten IL-2-Produktion (Ward et al. 1988) auszeichnet. Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung der zellulären Immunantwort lieferten Untersuchungen von Soboslay et al. (1992), die einen Anstieg der T-Zell-Reaktivität bei PBMC von Patienten mit generalisierter Onchozerkose nach Behandlung mit dem Medikament Ivermectin® beobachteten.

Ob und wie T-Zell-Antworten bei der Eliminierung der Krankheit eine Rolle spielen, müssen weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet zeigen. Dabei könnten neben der zellulären Reaktivität von Gesamt-Proteinen auch T-Zell-Epitope, die durch Algorithmen innerhalb des Proteins vorhergesagt werden, eingesetzt und untersucht werden.

1.5. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte das protektive Potential der L3-Chitinase von *O. volvulus* untersucht werden. Dazu sollte die cDNA der Chitinase in einen prokaryotischen Expressionsvektor kloniert und exprimiert werden, um anschließend das Protein mittels Affinitätschromathographie aufzureinigen. Zusätzlich sollte das C-terminale Ende des Moleküls, das für die Chitin-Bindung verantwortlich ist (Tellam et al. 1996), in gleicher Weise bearbeitet werden. Durch diese Domäne sollte das protektive Potential der Chitinase näher charakterisiert und immundominante Bereiche innerhalb des Proteins lokalisiert werden. Die Überprüfung des protektiven Potentials der OvL3-CBD und der OvL3-Chitinase sollte in dem Tiermodell *A. viteae-Meriones* durch die Rückfindungsrate von adulten Würmern erfolgen. Dabei sollte nicht nur die Schutzrate der immunisierten Tiere ermittelt werden, sondern die Analyse der Antikörperantworten sollte Hinweise auf die Ausprägung einer bestimmten Immunantwort der Tiere liefern.

Da für den Immunisierungserfolg nicht nur das Antigen von entscheidender Bedeutung ist, sollten Immunisierungsstudien mit verschiedenen Adjuvantien durchgeführt werden. Dabei sollte neben der Reaktivität der Chitinase ohne Adjuvans der Einfluß und die Fähigkeit von Adjuvantien geprüft werden, Immunantworten in bestimmte Richtungen zu verschieben.

Zusätzlich sollte die Charakterisierung und Identifizierung von T-Zell-Epitopen innerhalb der Chitinase erfolgen. Dazu sollten drei verschiedene T-Zell-Algorithmen verwendet werden. Die vorhergesagten T-Zell-Epitope sollten synthetisch hergestellt und in T-Zell-Proliferationsassays eingesetzt werden. Ein Set überlappender Peptide, die die Gesamtheit der Chitinase umfaßten, sollte gewährleisten, daß möglichst viele T-Zell-Epitope innerhalb der Chitinase entdeckt werden. Die Algorithmen sollten außerdem auf ihre Genauigkeit und Zuverlässigkeit geprüft werden. Dies sollte durch die Beurteilung von Sensitivität und Spezifität der einzelnen Algorithmen und der Kombination der Algorithmen erfolgen, um Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit der Algorithmen auf große Datenbanken ziehen zu können.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR dient zur enzymatischen Vermehrung spezifischer DNA-Sequenzen. Hierfür ist es notwendig, vom 5‘- und vom 3‘-Ende der zu amplifizierenden Sequenz DNA-Abschnitte zu kennen, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren.

Die PCR ist in drei Schritte unterteilt, die sich in genau definierten Zyklen wiederholen.

(1) Zuerst erfolgt die Denaturierung der DNA, (2) gefolgt von der Anlagerung spezifischer Primer (annealing) und (3) schließlich die Verlängerung der einsträngigen DNA (extension). Hierbei werden die Primer durch die DNA-Polymerase in 3‘-Richtung verlängert. Durch erneutes Erhitzen wird die doppelsträngige DNA getrennt und es kann sich ein neuer Zyklus anschließen.

Für die Amplifikation der *O. volvulus*-L3-Chitinase und der Chitin-Binde-Domäne (CBD) wurden Primer verwendet, bei denen eine Schnittstelle (in der Sequenz fett dargestellt) eingefügt wurde. Dies diente dazu, die amplifizierte DNA über die Schnittstellen in einen anderen Vektor setzen zu können.

5‘-Primer mit BamHI-Schnittstelle für die *O. volvulus*-L3-Chitinase: 5‘ > CC**G GAT CC**T ATG TTC GAG GAT GCT ATT ATA C < 3‘

5‘-Primer mit BamHI-Schnittstelle für die *O. volvulus*-Chitin-Binde-Domäne: 5‘>AT**G GAT CC**A CGA CAA CGA TTG CTG TTG<3‘

3‘-Primer mit HindIII Schnittstelle für die *O. volvulus*-L3-Chitinase und die Chitin-Binde-Domäne: 5‘> TTT **AAG CTT** TTC ATC GCA TTC ACC AAA<3‘

Für die Amplifikation wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet:

DNA: 1-5µl (je nach Konzentration)

5‘-Primer: 1µl (10pmol)

3‘-Primer: 1µl (10pmol)

$MgCl_2$: 2µl (50mM)

10x PCR Puffer: 5µl

Taq: 0,2µl (5U/µl)

ddH_2O: ad 50µl

Zur Amplifikation der Chitinase und der CBD wurde folgender Zyklus verwendet:
Die Proben wurden zunächst 10min bei 94°C denaturiert und die DNA in 30 Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus einer 15sec. Denaturierungsphase bei 94°C, gefolgt von einer 30sec. Annealingphase bei 57°C und einer 2minütigen Extensionsphase bei 72°C. Im Anschluß an den 30. Zyklus wurde die PCR bei 72°C für 5min beendet, gefolgt von einer Kühlphase bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung.

2.1.2. Klonierung der *O. volvulus*-L3-Chitinase und der *O. volvulus*-L3-Chitin-Binde-Domäne in den Expressionsvektor pQE 30

Um die *O. volvulus*-L3-Chitinase in den Expressionsvektor pQE 30 (Qiagen, Hilden, Deutschland) klonieren zu können, war es notwendig, die DNA der *O. volvulus*-L3-Chitinase mit Primern, die eine Schnittstelle beinhalteten, zu amplifizieren. In den 5‘-Primer wurde eine BamHI-Schnittstelle und in den 3‘-Primer eine HindIII-Schnittstelle integriert. Das generierte PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel herausgeschnitten und eluiert (Kitsystem der Firma Qiagen). Die so gewonnene DNA wurde in einen T-overhang Vektor (pGEM-T, Promega, Mannheim) ligiert und in kompetente Bakterien transformiert. Positive Klone wurden anhand von Blau-Weiß-Screening identifiziert. Von diesen Klonen wurden Kulturen, die über Nacht bei 37°C kultiviert wurden (Ü/N-Kultur), angelegt. Am nächsten Tag wurde die DNA mittels Minipräparation (Kitsystem der Firma Qiagen) gewonnen. Es erfolgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI/ HindIII und eine Auftrennung im Agarosegel. Konnte ein Insert aus diesem Vektor herausverdaut und im Gel detektiert werden, wurde die Bande herausgeschnitten und die DNA des Inserts aus dem Gel eluiert. Dieses Produkt wurde in den Expressionsvektor pQE 30 ligiert, der zuvor mit den Enzymen BamHI/ HindIII linearisiert und mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (SAP = Shrimps alkalische Phosphatase, Boehringer Mannheim, Deutschland) dephosphoryliert worden war. Die Ligationsansätze wurden zu einer Transformation von kompetenten *Escherichia coli* des Stammes XL-1 blue eingesetzt. 200µl von jedem Ansatz wurden auf Agar-Platten ausgestrichen, denen Ampicilin mit einer Endkonzentration von 50µg/ml zugesetzt worden war. Am nächsten Tag wurden gewachsene Kolonien über das oben genannte Verfahren (Ü/N-Kultur, Minipräparation, Restriktionsverdau) auf Einbau des Inserts überprüft. Ebenso wurde mit der cDNA der Chitin-Binde-Domäne verfahren.

2.1.3. Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase und der Chitin-Binde-Domäne in *E. coli*

Für die Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase und der Chitin-Binde-Domäne wurden je 10ml LB-Amp. mit einer Einzelkolonie der Plasmid tragenden Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd (220rpm) inkubiert. Die Ü/N-Kultur wurde auf zwei 500ml LB-Amp.-Kulturen aufgeteilt und weiter bei 37°C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD_{600} = 0,4-0,5 wurde die Expression mit 5mM IPTG bei der Chitinase bzw. 1mM IPTG bei der CBD induziert und die Bakterien wurden für weitere 3-4h kultiviert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert (6000g, 15min, 4°C), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.

2.1.4. Aufreinigung der *O. volvulus*-L3 Chitinase aus *E. coli*-Lysat

Das eingefrorene Bakterienpellet wurde in 20ml 8M Harnstoffpuffer (pH 8,0) aufgenommen und für eine Stunde lysiert. Anschließend wurden die Bakterien zweimal für eine Minute bei 30% Leistung (60W) auf Eis mit einem Ultraschallgerät beschallt (Heinemann, Schwäbisch-Gmünd, Deutschland).
Die Suspension wurde bei 10 000g, 4°C für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde zu einer Nickel-Matrix-Agarose (Quiagen) gegeben, die zuvor mit 8M Harnstoffpuffer (pH 8,0) äquilibiert wurde. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Matrix in eine Säule gegeben, die an ein Chromatographie System (Biorad, München, Deutschland) angeschlossen war. Es folgten Waschschritte mit 8M Harnstoff-Puffern, die einen absteigenden pH-Wert besaßen. Bei pH 4,5 wurde das Protein eluiert und in 1ml Fraktionen aufgefangen. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen. Es schloß sich eine Dialyse an, bei der die Proteine über eine ein-molare Harnstofflösung bis in PBS/0,5M NaH_2PO_4 /1M Tris/2% Glycerin dialysiert wurden. Teile des Proteins wurden nur gegen 1M Harnstoff dialysiert. Ein anderer Teil des Proteins wurde durch Passage über einen Membranfilter mit 0,22µm Porengröße sterilfiltriert. Anschließend wurde es in 1ml-Fraktionen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20ºC gelagert.

2.1.5. Aufreinigung der *O. volvulus*-L3-Chitin-Binde-Domäne (CBD) aus *E. coli*-Lysat

Das Bakterienpellet wurde in 20ml Bindungs-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von Lysozym (100µg/ml; Sigma, Deisenhofen, Deutschland), DNase (70U/µl; Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und 0,1% Triton-X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland) erfolgte eine Inkubation bei 30ºC für 30min. Anschließend wurden die Bakterien sechsmal für 10sec. bei 30% Leistung (60W) auf Eis ultrabeschallt. Die Suspension wurde bei 10 000g, 4°C für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde zu einer Nickel-Matrix-Agarose (Quiagen) gegeben, die zuvor mit 20ml Bindungspuffer äquilibriert worden war. Es folgten Waschschritte mit Bindungspuffer und mit Waschpuffer. Das Protein wurde mit Elutionspuffer von der Matrix verdrängt und in 1ml-Fraktionen aufgefangen. Ein Aliquot wurde zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen. Es schloß sich eine Dialyse gegen PBS/0,05% Triton-X-100 an. Dann wurde ein Teil des Proteins durch Passage über einen Membranfilter mit 0,22µm sterilfiltriert, in 1ml-Fraktionen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20 º C gelagert.

2.1.6. Klonierung der *O. volvulus*-L3-Chitinase in den Salmonellenvektor pTECH

Das PCR-Produkt mit den eingefügten BamHI- und HindIII-Schnittstellen wurde zusätzlich in den Salmonellenvektor pTECH kloniert. Dazu wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII linearisiert und mit SAP dephosphoryliert. Es erfolgte die Ligation des gereinigten PCR-Produktes in den vorbereiteten Vektor mit Hilfe der T_4-Ligase (New England Biolabs, Niederlande) über Nacht bei 4°C.

2.1.7. Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase in *Salmonella typhimurium*

Die Klonierung der Chitinase in den Vektor pTECH führte zu einer Fusion mit dem hochimmunogenen, aber atoxischen TetC-Fragment. Dieses 50kDa große Fragment und das Fremdprotein sind durch eine Hinge-Region mit einander verbunden, um eine optimale Faltung zu ermöglichen. Eine kontinuierliche Expression dieses Fusionsproteins erfolgt unter anaeroben Bedingungen ohne externe Induktion (Oxer et al. 1991). Nach erfolgreicher Ligation wurde das Konstrukt in den Salmonellenstamm SL 3261 transformiert und die Klone auf Expression untersucht. Dazu wurde eine Einzelkolonie in 2ml LB-Amp. angeimpft und Ü/N bei 37°C und 150rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 µl der Übernachtkultur in weitere 2ml LB-Amp. überführt und bei 37°C und 150rpm bis zu einer OD_{650} von 0,5 kultiviert. Die Ansätze wurden für 20min auf Eis inkubiert und

nachfolgend abzentrifugiert (20800g, 15min, 4°C). Die Expression wurde durch einen Immunblot mit einem monospefizischen Mausserum gegen OvL3-Chitinase nachgewiesen.

2.1.8. Lebendkeimzahlbestimmung von *Salmonella typhimurium*

Die Immunisierung der BALB/c-Mäuse erfolgte mit ca. 10^7-10^9 CFU/0,2ml über eine Schlundsonde. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde die Korrelation zwischen optischer Dichte der Bakterienkultur und der Anzahl von Salmonellen herangezogen. Dazu wurden je 7ml LB-Amp. mit Chitinase/pTECH bzw. pTECH angeimpft und Ü/N bei 37°C und 150rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde von der Ü/N-Kultur eine 1:100 Verdünnung hergestellt und weiter inkubiert. Jede Stunde wurde die OD_{650} gemessen, Verdünnungen hergestellt (10^{-5}-10^{-8}) und 50µl davon auf LB-Amp.-Platten ausgestrichen. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und die CFU wie folgt berechnet: Anzahl der Kolonien x Verdünnung x Aliquot = CFU/Volumen

2.1.9. Nachweis von Salmonellen in Kot- und Organproben

Für den Nachweis der Salmonellen wurde der Kot der immunisierten Mäusen fünf Tage lang nach der ersten Immunisierung gesammelt. 0,5g Kot je Käfig wurden mit einem Mörser zerrieben und in 5ml autoklaviertem 1% gepufferten Peptonwasser aufgeschwemmt. Anschließend wurde Material aus jedem Ansatz direkt mit der Impföse auf je eine LB-Amp.-Platte, eine XLD-Platte und eine BPLA-Platte ausgestrichen. Der restliche Ansatz wurde Ü/N bei 37°C und 150rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Ausstrich direkt aus der Kultur und aus einer Verdünnung 10^{-3} auf die oben aufgeführten Platten.

Zudem erfolgte die Überimpfung von 50µl Kultur in 5ml Salmonellenanreicherungsmedium nach Rappaport und eine weitere Inkubation bei 42°C, 150rpm für 20-24h. Anschließend erfolgte ein Ausstrich direkt aus der Kultur und aus einer Verdünnung 10^{-3} auf die oben aufgeführten Platten. Für den Nachweis von Salmonellen aus den Organen wurden Milz und Leber 2 Tage nach der letzten Immunisierung steril entnommen und gewogen. Anschließend erfolgte die Homogenisation der Gewebe mittels Passagierung durch ein engmaschiges Sieb. Ein Teil des Homogenates wurde mit neun Teilen 1% gepufferten Peptonwasser versetzt, aufgeschwemmt und abzentrifugiert (1200g, 10min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 9 Teilen Peptonwasser resuspendiert. Hieraus erfolgte ein direkter Ausstrich auf LB-Amp.-Platten, XLD-Platten und auf BPLA-Platten. Der restliche Ansatz wurde für 20-24h bei 37°C und 150rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte erneut

ein Ausstrich direkt aus der Kultur und aus einer Verdünnung 10^{-3} auf die oben aufgeführten Platten. Zudem wurden 100µl der Ü/N-Kultur in 10ml Anreicherungsmedium nach Rappaport überführt und für 20-24h bei 42°C und 150rpm inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte der direkte Ausstrich auf LB-Amp.-Platten, XLD-Platten und auf BPLA-Platten. Ausgewertet wurde der Habitus und die Stoffwechselleistungen der Kolonien, die durch eine Verfärbung des Agars sichtbar wurden.

2.1.10. Herstellung eines *O. volvulus*-Gesamtextraktes (OvAg)

Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten, die zur Bestimmung der *O. volvulus*-spezifischen Antikörper eingesetzt wurden, sowie für die spezifische Antigenstimulierung von isolierten PBMC wurde ein *O. volvulus*-Gesamtextrakt benötigt. Als Ausgangsmaterial dienten hierfür 20 adulte *O. volvulus*-Würmer, die von Patienten aus Kamerun stammten. Diesen Patienten wurden unter lokaler Betäubung die Onchozerkoseknoten operativ entfernt. Die Würmer wurden anschließend nach der Methode von Schulz-Key et al. (1977) aus den Knoten isoliert. Dazu wurden die Knoten 1-3 Tage in Zellkulturmedium (RPMI 1640), das mit 5mg/ml Kollagenase, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin versetzt war, inkubiert. Anschließend wurden die noch lebenden Würmer mit PBS pH 7,4 gewaschen, um das anhaftende Wirtsgewebe und die Kollagenase zu entfernen. Für den Transport wurden die Würmer bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

Zur Präparation des *O. volvulus*-Gesamtextraktes wurden die Würmer aufgetaut, vom Restmedium befreit und 3x in 1x PBS pH 7,4 gewaschen, in einen Gewebehomogenisator überführt und nach Zugabe von ca. 5ml PBS auf Eis mechanisch homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat in ein Röhrchen überführt und der Gewebehomogenisator mit PBS gespült, um anhaftendes Material nicht zu verlieren. Das Homogenisat wurde zweimal 10sec., mit einer 30sec. Pause, mit 30% Leistung (60W) auf Eis ultrabeschallt (Branson Sonifier 250, Heinemann, Schwäbisch-Gmünd).

Das Rohantigen wurde zuerst 5min bei 4000g und 4°C zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes wurde dieser erneut 25min 16000g und bei 4°C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde aliquotiert und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt. Dieser Überstand wird im folgenden als *O. volvulus*-Gesamtextrakt (OvAg) bezeichnet.

2.1.11. Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen

Rekombinante Proteine in Lösung wurden mit der BCA-Methode (Pierce, Rockford, USA) quantifiziert. Als erstes wurde ein Proteinstandard (RSA, Rinderserumalbumin mit 2000µg/ml) geometrisch verdünnt. Auf einer Mikrotiterplatte (Greiner, Solingen, Deutschland) wurden die Standardverdünnungen und die Verdünnungen der Proben mit je 25µl aufgetragen. Dann wurden 200µl einer Arbeitsverdünnung (50 Teile Reagenz A, 1 Teil Reagenz B) zugegeben, die Platte geschüttelt und 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei 570nm im Spektralphotometer (Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bestimmt. Die Konzentration der Proteine wurde durch Extrapolation aus einer Regressionsgraden des Proteinstandards ermittelt.

2.1.12. Auftrennung von Proteinen in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht in der SDS-PAGE aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffer versetzt und 3min bei 95°C gekocht. Das Gel bestand aus einem 4% Sammelgel und einem 14% Trenngel. Für die Auftrennung wurde eine Spannung von 140V angelegt. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein Proteinstandard (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) aufgetragen. Direkt nach der Elektrophorese erfolgte die Färbung des Gels in Coomassie-Färbelösung. Nachfolgend wurde mit Entfärbelösung (10% Eisessig, 20% Ethanol) schwächer gebundenes Coomassie wieder herausgelöst.

2.1.13. Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

Die Herstellung kompetenter *E. coli* erfolgte nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990). Mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes wurden 250ml SOB-Medium angeimpft und bei 18°C über Nacht bis zur OD_{600} = 0,6 auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Die Kultur wurde 10min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (10min, 4°C, 2500g) und in 16ml eiskaltem TB resuspendiert. Es folgte eine zehnminütige Inkubation auf Eis und eine erneute Zentrifugation. Die Bakterien wurden dann in 4ml kaltem TB aufgenommen. Unter leichtem Schütteln wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu einer Endkonzentration von 7% dazugegeben. Nach weiteren 10min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in 1ml Fraktionen aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Bakterien bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.1.14. Lagerung und Kultivierung von Bakterien

Langzeitlagerung (Stocks): 0,5ml einer 5ml Ü/N-Kultur eines gewünschten Bakterienstammes wurde mit 0,5ml Glyzerin versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurden die Bakterien bei –80°C gelagert.
Lagerung bei Raumtemperatur (Stabs): zur Anfertigung von Stab-Kulturen wurde 500µl Agar in ein Glasschraubdeckelgefäß gefüllt und autoklaviert. Nach Erkalten des Agars wurden die Röhrchen mit einer sterilen Platinöse mit dem gewünschten Bakterienstamm beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Stab-Kulturen bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt und waren für 6-12 Monate lebensfähig.

2.1.15. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Für Klonierungsschritte oder zur Überprüfung eines eingebauten Inserts war es notwendig, DNA mit bestimmten Restriktionsenzymen zu spalten. Dafür wurde die vom Hersteller (AGS, Heidelberg, Deutschland) angegebenen Einheiten des benötigten Enzyms zu der entsprechenden Menge an DNA gegeben und die DNA für ein bis zwei Stunden bei optimaler Temperatur und optimalem Puffer inkubiert.

2.1.16. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Religation des linearisierten Vektors zu verhindern wurden die terminalen Phophatgruppen durch SAP abgespalten. Dazu wurde eine Einheit SAP mit 1-5µg DNA in dem entsprechenden Puffer in einem Reaktionsvolumen von 10µl für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C innerhalb von 15min inaktiviert.

2.1.17. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglichte es, DNA auf Grund ihrer unterschiedlichen Länge und dadurch bedingt ihrer Wanderungsgeschwindigkeit aufzutrennen.
Die als Anionen vorliegenden DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Durch den fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid, der sich zwischen die Basen der DNA einlagert, können die aufgetrennten DNA-Moleküle sichtbar gemacht werden. Die Anregung erfolgt

mit UV-Licht von 500-590nm Wellenlänge. Dazu wurde die DNA im Verhältnis 1:6 mit Proben-Puffer vermischt und auf ein 0,8-1,0%iges Agarosegel aufgetragen, das Ethidiumbromid (0,5µg/ml) enthielt. Der Elektrophoresepuffer, in dem auch der Agar gelöst wurde, bestand aus 0,5x TAE-Puffer. Anschließend wurde eine Spannung von 60-100V angelegt. Neben den Proben wurden DNA-Längenstandard (Biosizer I+IV, AGS) aufgetragen, so daß eine Größenbestimmung der Produkte erfolgen konnte.

2.1.18 DNA-Elution aus Agarosegelen

DNA wurde aus Agarosegelen mit Hilfe des Kit-Systems Qiaex (Qiagen) herauseluiert. Dazu wurde die entsprechende Bande aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten. Es folgte die Auflösung der Agarose durch Temperaturerhöhung (10min bei 50°C) und in Gegenwart von Natriumjodid. Die freie DNA konnte dann an eine Glasmilchsuspension binden, die in dem Reaktionsansatz zugegeben wurde. Nach 30sec. Zentrifugation mit der Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) erfolgte einmaliges Waschen mit dem Natriumjodid Puffer, an das sich wieder eine Zentrifugation anschloß. Nach zweimaligem Waschen mit einem Ethanol-haltigen Puffer konnte die DNA mittels H_2O oder TE-Puffer von der Matrix heruntereluiert werden.

2.1.19. Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten mRNA und DNA wurde im Photometer (Hitachi, Japan) bestimmt. Dazu wurde die Probe 1:50 ddH_20 verdünnt und die optische Dichte (OD) gegen ddH_20 bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm gemessen. Einem OD-Wert von eins bei 260nm entsprechen etwa 40µg/ml RNA oder 50µg/ml DNA. Für die Reinheitsbestimmung wurde der Quotient von OD_{260}/OD_{280} gebildet. Reine mRNA/DNA ergibt einen Quotienten von 2,0. Durch Proteinverunreinigungen verringert sich dieser Quotient.

2.1.20. Ligation von DNA

Die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen benachbarten 5‘-Phosphatgruppen und gegenüberliegenden 3‘-Hydroxylgruppen wird durch das Enzym Ligase katalysiert. Dies macht man sich bei der Klonierung von Fremd-DNA in einen Vektor zu Nutze. Dazu wurden 50ng Vektor-DNA mit verschieden Konzentrationen des Insert (molares Verhältnis von 1:1, 1:3, 3:1) in Gegenwart von 100mM ATP, 10x Ligase-Puffer und der T_4-Ligase (3Einheiten/µl) in einem Reaktionsvolumen von 10µl bei 4°C Ü/N inkubiert. Eine Negativkontrolle, die anstatt von Insert-DNA Wasser enthielt, und eine Positivkontrolle, die linearisierte, phosphorylierte Plasmid-DNA beinhaltete, wurden bei jedem Ansatz mitgeführt.

2.1.21. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*

Kompetente *E. coli* wurden bei RT aufgetaut und je 100µl pro Reaktionsansatz in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt. 1-5µl des Ligationsansatzes wurden zu den Bakterien gegeben, der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Es schloß sich ein Hitzeschock für 30-45sec. bei 42°C an, um die Bakterienwände durchlässig für die Plasmid-DNA zu machen. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für weitere 2min auf Eis gehalten, bevor 900µl SOC-Medium zu dem Reaktionsansatz gegeben wurde. Es schloß sich eine Inkubation von 60-90min bei 37°C an. Je 100µl eines Ansatzes wurden auf Agarplatten ausgestrichen, die das benötigte Antibiotikum enthielten. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und die gebildeten Kolonien am nächsten Tag auf Einbau des Inserts hin untersucht.

2.1.22. Plasmidpräparation aus *E. coli*-Kulturen

Alle Plasmid-Isolationen wurden mit Kit-Systemen der Firma Qiagen durchgeführt. Dabei wurde gemäß den Protokollen der Hersteller vorgegangen. Dieses Verfahren beruht auf den unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von Plasmid- und Bakterien-DNA. Es gibt einen kleinen pH-Bereich, bei dem nicht-überspiralisierte DNA denaturiert wird. Das Bakterienpellet wird in einem Natriumhydroxid-Puffer aufgenommen, so daß sich ein pH-Wert von 12-12,5 einstellt. Dadurch wird die Doppelhelix der Bakterien-DNA entwunden und die DNA-Stränge trennen sich. Nach Zugabe von stark saurem Puffer lagern sich die denaturierten Stränge zu einem Aggregat zusammen, das unlöslich ist. Es erfolgt die Neutralisation mit einem Natriumacetat-haltigen Puffer. Eine anschließende

Zentrifugation ermöglicht es, die Plasmid-DNA von der Bakterien-DNA zu trennen. Der Plasmid-haltige Überstand wird auf eine Säule gegeben, wo die DNA an eine Matrix gebunden wird. Es erfolgt zweimaliges Waschen mit einem Waschpuffer. Der letzte Waschschritt wird mit Ethanol-haltigem Puffer durchgeführt, bevor die DNA durch H_2O oder TE-Puffer von der Matrix eluiert wird. Bei Plasmidpräparationen aus großen Kulturvolumina wird das Eluat durch eine Ethanol-Fällung konzentriert.

2.2. Parasitologische Arbeitsmethoden

2.2.1. Versuchstiere

Für die Immunisierungsversuche wurden BALB/c-Mäuse verwendet, die in der Regel acht Wochen alt waren. Diese Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Für die Infektionsversuche wurden im Institut gezüchtete Wüstenrennmäuse der Art *Meriones unguiculatus* des Inzucht-Stammes Tumblebrook verwendet. Für den Versuch wurden ausschließlich Männchen eingesetzt, die nicht älter als 6 Monate waren.

2.2.2. Experimenteller Lebenszyklus der Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae*

Das Nymphenstadien IV der Lederzecke *Ornithodoros moubata* wurde durch Saugen von Hammelblut mit definiertem Mikrofilariengehalt (6000 Mikrofilarien/ml) durch Membranfütterung (Lucius & Textor, 1995) ernährt und infiziert. Es erfolgt die Entwicklung zur infektiösen Drittlarven (L3). Nach zwei Monaten wurden die L3 aus den Zecken isoliert. 70 oder 75 L3 wurden unter die Nackenhaut von männlichen *Meriones unguiculatus* injiziert.

2.2.3. Immunisierungsversuche mit *O. volvulus*-L3-Chitinase und *O. volvulus*-L3-Chitin-Binde-Domäne in *Meriones unguiculatus*

Die *O. volvulus*-L3-Chitinase und die Chitin-Binde-Domäne (CBD) wurden in Immunisierungsstudien eingesetzt. Sechs bis Acht Wochen alte männliche Meriones wurden durch Inhalation von Narkosemittel Methophane® (Janssen GmbH, Neuss, Deutschland) betäubt und mit einer Dosis von 25µg Antigen subkutan an vier verschiedenen Stellen immunisiert.

Zuvor wurde die Chitinase 1:1 mit dem Adjuvans STP gemischt. Die Chitin-Binde-Domäne wurde mit dem Adjuvans Alum verabreicht. Für die Applikation des Antigens mit Alum war es notwendig, eine 1:20 Verdünnung herzustellen, die für 30min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. So wurde eine

Bindung des Antigens an Alum ermöglicht. Die zweite Immunisierung mit identischem Ansatz erfolgte zwei Wochen später. Nach weiteren zwei Wochen wurde eine Belastungsinfektion mit 75 L3 (bzw. mit 70 L3 bei dem Versuch der OvL3-CBD mit Alum) gesetzt.
Zudem erfolgte eine Blutabnahme und die Bestimmung der Mf-Dichte an verschiedenen Zeitpunkten. Elf Wochen nach der Belastungsinfektion wurden die Tiere getötet und auf Adultwürmer hin untersucht.

2.2.4. Gewinnung der L3 aus *Ornithodoros moubata* und Infektion der *Meriones unguiculatus*

L3 wurden aus Zecken gewonnen, die zwei Monate zuvor mit Mikrofilarien infiziert worden waren. Die Zecken wurden sagittal im RPMI-Medium aufgeschnitten, grob von Darminhalt und Resten der Blutmahlzeit gereinigt. Die ausgewanderten L3 wurden unter einem Binokular einzeln mit einer Pasteurpipette aufgesaugt. Nach zweimaligem Zählen wurden die L3 (75/Tier bzw. 70/Tier) in eine 1ml Spritze überführt und sofort unter die Nackenhaut von betäubten *M. unguiculatus* injiziert. Anschließend wurde mit 0,2ml RPMI nachgespült.

2.2.5. Blutentnahmen

Um den Verlauf der Immunisierung und der Infektion charakterisieren zu können, wurden in regelmäßigen Abständen Blutentnahmen durchgeführt. Die erste Blutentnahme erfolgte vor der ersten Immunisierung, die zweite am Infektionstag. Die Tiere wurden jeweils vier, acht und elf Wochen (Sektion) nach der Infektion geblutet, um die Mikrofilariendichte festzustellen und um Serum zu gewinnen. Die Wüstenrennmäuse wurden zuerst durch Inhalation von Narkosemittel Methophan® (Janssen GmbH) betäubt. Die Blutentnahme wurde durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus mit einer Mikro-Hämatokritkapillare durchgeführt. Entnommen wurden ca. 500µl Blut, das zur Koagulation eine Stunde bei 4°C aufbewahrt und anschließend zentrifugiert (10600g, 10min, 4°C) wurde. Das so gewonnen Serum (≈ 200µl) wurde abgenommen, in Eppendorfgefäße überführt und bei –20°C gelagert.

2.2.6. Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut *A. viteae*-infizierter *Meriones unguiculatus*

Die Blutabnahme wurde mit Hilfe einer heparinisierten Einmal-Mikropipette durchgeführt, die in den retroorbitalen Venenplexus eingeführt wurde. 44,7µl des Blutes wurde mit 100µl 10% Teepol 610 (Serva, Heidelberg, Deutschland) gründlich gemischt und in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer gezählt. Die Mikrofilarienzahl wurde acht Wochen und elf Wochen nach der Infektion bei der Sektion bestimmt.

2.2.7. Sektion und Isolation von Adultwürmern

Elf Wochen nach der Belastungsinfektion wurden die infizierten *M. unguiculatus* durch Inhalation von Narkosemittel Methophan® (Janssen GmbH) betäubt und zur Serumgewinnung über den retroorbitalen Plexus ausgeblutet. Anschließend wurden sie durch Chloroform-Inhalation getötet und seziert. In der Muskulatur, den Geweben und zwischen den Organen wurden nach Adultwürmern von *A. viteae* gesucht. Das Geschlecht und die Länge der Würmer wurde protokolliert. Männchen und Weibchen wurden getrennt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C aufbewahrt. Nach der Sektion wurden die Körper und die Häute der Wüstenrennmäuse in mit 0,9% NaCl gefüllte Bechergläser über Nacht eingelegt. Am Morgen danach wurden die aus den Körpern ausgewanderten Adulten ausgezählt und deren Geschlecht bestimmt. Die Länge der ausgewanderten Filarien wurde nicht ausgewertet, da die Würmer sich in NaCl strecken.

2.3. Immunologische Methoden

2.3.1. Immunisierungsstudien mit verschiedenen Adjuvantien im Mausmodell

Um den Einfluß von verschiedenen Adjuvantien zu testen, wurden Immunisierungsstudien in der Maus durchgeführt. Dazu wurden je 25µg Chitinase ohne Adjuvans, mit STP und mit Alum dreimal 6 Tieren pro Gruppe verabreicht (siehe unten). Die Kontrollgruppen erhielten nur STP, Alum oder PBS/1M Harnstoff. Der Abstand zwischen den Immunisierungen betrug zehn Tage. Den Tieren wurde vor jeder Immunisierung Blut über den retroorbitalen Plexus abgenommen, um anschließend die Antikörperantwort charakterisieren zu können. Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurden zwei Tiere ausgeblutet. Die Milzzellen der verbleibenden Tiere wurden in T-Zell Proliferationstests

und Zytokintests eingesetzt. Dazu wurden die Milzen von zwei Tieren aus jeder Gruppe entnommen und die Milzzellen gemäß dem Standardprotokoll (Bradley et al. 1980) isoliert. 4x 10^5 Zellen/Vertiefung wurden für T-Zell-Proliferationstests eingesetzt. Die Milzzellen wurden mit rekombinanter *O. volvulus*-L3-Chitinase oder ohne Antigen inkubiert. Nach vier Tagen erfolgte die Zugabe von ^{3}H-Thymidin für weitere 18 Stunden. Anhand von eingebautem Thymidin konnte die Proliferationsrate ermittelt werden. Dabei wurde die spontane Proliferation aus dem Ansatz ohne Antigen von den Werten der Ansätze mit Antigen abgezogen, so daß in den Graphiken Netto-Werte dargestellt sind.

Antigene, die jeweils 6 Mäusen pro Gruppe verabreicht wurden:
Gruppe 1. 25µg Chitinase in 1M Harnstoff
Gruppe 2: PBS/1M Harnstoff
Gruppe 3: 25µg Chitinase/STP
Gruppe 4 STP
Gruppe 5. 25µg Chitinase/Alum
Gruppe 6: Alum

Für die Bestimmung des Zytokinmusters mittels RT-PCR wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 2x 10^6 Zellen/Vertiefung in 48-Vertiefung-Zellkulturplatten (Corning Costar, Bodenheim, Deutschland) eingesät. Es erfolgte eine Inkubation in Gegenwart von 20µg/Vertiefung, Chitinase oder ohne Antigen für maximal drei Tage. Nach 8h, 24h, 48h und 72h wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in RNA-Isolierungsreagenz (Tristar®, AGS) aufgenommen und bei -70°C bis zur Weiterverwendung eingefroren.

2.3.2. Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit Salmonellen

Es erfolgte die Immunisierung von je 6 BALB/c-Mäusen mit Salmonellen, die Chitinase exprimierten, und mit Salmonellen, die nur den Vektor pTECH enthielten. Den Tiere wurden zweimal oral die unten aufgeführten Mengen an Salmonellen verabreicht. Der Abstand zwischen den Immunisierungen betrug 10 Tage. Nach 2 Tagen wurde jeweils ein Tier aus jeder Gruppe getötet und es erfolgte der Nachweis von Salmonellen in Leber und Milz (Kapt.2.1.9). 10 Tage nach der letzten Immunisierung wurden jeweils 2 Tieren aus jeder Gruppe die Milzen entnommen und die Milzzellen isoliert, so daß sie in Proliferationsstudien und in Zytokinuntersuchungen eingesetzt werden konnten.

Gruppe 7: Chitinase/pTECH (5-8 x 10^7 CFU bei der 1. Immunisierung; 2-5 x 10^8 CFU bei der 2. Immunisierung

Gruppe 8: pTECH (5-20 x 10^9 CFU bei der 1. Immunisierung; 1,5 x 10^9 CFU bei der 2. Immunisierung)

2.3.3. Isolierung von Maus-Milzzellen

Für die Gewinnung der Milzzellen von immunisierten und naiven Mäusen wurden die Tiere mittels CO_2-Inhalation getötet. Anschließend wurden ihnen unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen. Alle Schritte wurden zügig und auf Eis durchgeführt, um die einsetzende Apoptose zu verzögern. Das Organ wurde mit Hilfe eines Stempels durch ein engmaschiges Netz passiert, um so Einzelzellen zu gewinnen. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen aus ihren Zellverbänden gelöst und anschließend in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Zu den Zellen wurde 30ml kaltes RPMI gegeben und die Suspension wurde für 5min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung der groben Bestandteile wurde der Überstand mit den Zellen in ein neues Röhrchen überführt und bei 1200rpm für 10min bei 8°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und das Zellsediment aufgemischt. Es erfolgte die Zugabe von 11ml Erythrozyten-Lyse-Puffer und eine Inkubation für 7min auf Eis. Nach der folgenden Zentrifugation (1200rpm, 10min bei 8°C) wurden die Zellen zweimal mit kaltem RPMI gewaschen. Die Zellen wurden dann in 3-5ml RPMI aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt. Dafür wurde eine 1:20 Verdünnung mit Trypanblau hergestellt und die lebenden Zellen, die keinen Farbstoff aufgenommen hatten, in einem Großquadrat in der Neubauerkammer bestimmt. Die Zellzahl wurde auf eine Konzentration von 4x 10^6/ml eingestellt. Je 100µl dieser Suspension wurde in jede Vertiefung der 96-Vertiefung-Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zugabe der Antigene bzw. der Mitogene wurde mit RPMI auf ein Gesamtvolumen von 200µl aufgefüllt.

2.3.4. Immunblot

Der Nachweis von Proteinen erfolgte nach Auftrennung in der SDS-Gelelektrophorese mit Hilfe spezifischer Antikörper. Dazu wurden die Proteine nach der Auftrennung auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,45µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) über Nacht bei 70mA oder bei 400mA in 4h transferiert. Es schloß sich eine Inkubation von 30min bei RT oder bei 4°C über Nacht in 5% Milchpulver in TBS-Lösung an, um freie Proteinbindungskapazitäten zu blockieren. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen für 10min mit TBS-Lösung. Die Inkubation mit

monospezifischen Mausserum gegen OvL3-Chitinase (Verdünnung 1:100 in 3%RSA/TBS) erfolgte für 2h bei RT unter ständiger Bewegung. Das nachfolgende Waschen mit TBS-Lösung diente zum Entfernen ungebundener primärer Antikörper. Der sekundäre mit Peroxidase konjugierte Antikörper (AP-Ziege-anti-Maus-IgG; Dianova, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:1000 in 3%RSA/TBS) wurde für eine Stunde mit der NC-Folie inkubiert. Nach erneuten dreimaligen Waschen mit TBS-Lösung erfolgte die Zugabe der Substratlösung. Als Substratlösung wurde das Chromogen 4-Chloro-1-Naphtol (Lösung von 50ml TBS, 400µl 0,4% Chlornaphtol und 40µl H_2O_2) verwendet. Die Reaktion wurde mit fließendem H_2O abgestoppt, die NC-Folie wurde getrocknet und vor Licht geschützt aufbewahrt. Je nach Verwendung anderer Antikörper wurden andere Verdünnungen eingesetzt.

2.3.5. Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Bestimmung der *O. volvulus*-spezifischen IgG bei der Maus

Polysorb Mikrotiterplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit 1µg/ml *O. volvulus*-Chitinase in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten zweimal mit PBS/0,025% Tween-20 gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C zwischengelagert.
Für den ELISA wurden die Platten zweimal mit PBS/0,025% Tween-20 gewaschen. Anschließend wurde mit je 100µl 1x PBS/3% RSA die unspezifischen Bindungsstellen eine Stunde lang bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach Waschen mit PBS/0,025% Tween-20 wurden 50µl der zu testenden Seren in einer 1:100 Verdünnung (in PBS/3% RSA) aufgetragen und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Es folgte 3maliges Waschen mit PBS/0,025% Tween-20 bevor 50µl der subklassenspezifischen Alkalische Phosphatase gekoppelten Kaninchen anti-Maus Antikörper (Rockland, Gilbertsville, USA) auf die Platten gegeben wurden. Dabei wurden die verschiedenen Antikörper in den folgenden Verdünnungen eingesetzt (alle in 3% RSA/TBS verdünnt):
IgG 1:3000
IgG_1 1:2000
$IgG2_a$ 1:200
$IgG2_b$ 1:100
IgG_3 1:100

Die Platten wurden bei 37°C 1h inkubiert. Danach wurde mit PBS/Tween-20 gewaschen. Es wurde 50µl der Substratlösung (1 Tablette p-Nitrophenyl-phosphat (Sigma) in 10ml Carbonatpuffer und 1mM $MgCl_2$ gelöst) zugegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Mit 25µl einer 100mM EDTA-Lösung

wurde die Reaktion abgestoppt. Die optische Dichte wurde bei 405nm im ELISA-Reader (Dynatech) gemessen.

2.3.6. Nachweis spezifischer mRNA mittels reverser Transkription (RT)

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von spezifischer mRNA wurde die RT-PCR eingesetzt. Bei dieser Methode werden vier Abschnitte unterschieden:
Isolierung von RNA, reverse Transkription, Polymerase-Kettenreaktion, Agarose-Gelelektrophorese. Durchgeführt wurde die RT-PCR gemäß den Anweisungen von Sambrook et al. (1989).

2.3.7. Isolierung von mRNA für RT-PCR

2x 10^6 Milzzellen /Vertiefung wurde nach Inkubation mit Chitinase oder ohne Antigen in 400µl des RNA-Isolierungsreagenz Tristar® aufgenommen und bis zur Weiterverwendung bei -70 °C gelagert. Nachdem die Proben aufgetaut waren, schloß sich eine Inkubation von 5min bei Raumtemperatur an. Ein Fünftel Volumen Chloroform wurde zu jedem Ansatz gegeben und für 15sec. stark geschüttelt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz nochmals für 3-10min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (12000g, 5min, 4°C) erfolgte die Abtrennung der RNA und DNA von den Proteinen. Die obere, wäßrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 2ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und mit einem halben Volumen Isopropanol versetzt. Es schloß sich eine Inkubation für 5-15min bei Raumtemperatur an, bevor erneut für 10min bei 12000g und 4°C zentrifugiert wurde. Das Isopropanol wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet zweimal mit einem Volumen 75% Ethanol (in DMDC-H_2O) gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 20-40µl DMDC-H_2O aufgenommen. Es erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA bei $OD_{260/280}$ im Photometer.

2.3.8. Umschreibung von mRNA in cDNA

Ein bis fünf µg der isolierten RNA wurden mit 1µl oligo-DT (0,5µg/ml) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit ddH_2O auf ein Volumen von 12µl aufgefüllt. Es erfolgte eine 10minütige Inkubation bei 70°C, die durch schnelles Überführen auf Eis abgestoppt wurde. Zu jedem Ansatz wurden 4µl 5xFirst Strang Buffer (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 2µl 0,1 M DTT und 1µl 10 mM dNTP (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) gegeben und 2min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl

(200 Einheiten) Reverse Transkriptase (SuperScript® Gibco) zugegeben und für weitere 50min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde für 15min bei 70°C inaktiviert. Um RNase vollständig zu entfernen, wurde 1µl (4 Einheiten) RNase Inhibitor (Gibco) für 20min bei 37°C zugeführt. Die so gewonnene cDNA konnte in die PCR Reaktion eingesetzt werden.

2.3.9. Amplifikation von Maus-Zytokinen

Die erhaltene cDNA konnte nun in einer Polymerase-Kettenreaktion auf die Transkripte der Zytokine IL-4, IL-10, INF-γ und TNF-α untersucht werden.
Als Positivkontrolle und zur Qualitätskontrolle der cDNA wurde $ß_2$-Mikroglobulin amplifiziert, das in allen Eukaryotenzellen in hohem Maße exprimiert wird. Um eine semiquantitative Aussage über die Stärke der Zytokinexpression zu erhalten, schloß sich nach der ersten Amplifikation von $ß_2$-Mikroglobulin eine Titration an, bei der alle eingesetzten Proben auf die gleiche Menge des Amplifikates eingestellt wurden. Die Auswertung der Bandenstärke erfolgte mit Hilfe eines Videodokumentationsgerätes (Herolab, Wiesloch, Deutschland) und dem Auswertungsprogramm E.A.S.Y.
Die Menge an DNA, die für eine gleich starke Bande von $ß_2$-Mikroglobulin in allen Proben benötigt wurde, wurden für die Amplifikation der anderen Zytokine eingesetzt. So konnten Aussagen über die mRNA-Menge der Zytokine erfolgen.

Die Proben wurden in den folgenden Reaktionsansatz eingesetzt:
DNA: 1-5 µl
5‘-Primer: 1µl (10pmol)
3‘-Primer: 1µl (10pmol)
$MgCl_2$: 2µl (50mM)
10x PCR Puffer: 5µl
Taq: 0,2µl (5U/µl)
ddH_2O: ad 50µl

Zur Amplifikation der Zytokine wurde der folgende Zyklus verwendet:
Die Proben wurden zunächst 10min bei 94°C denaturiert und die DNA in 40-50 Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus einer 1minütigen Denaturierungsphase bei 94°C, gefolgt von einer 1minütigen Annealingphase bei 55°C und einer 1minütigen Extensionsphase bei 72°C. Im Anschluß

an den 40. oder 50. Zyklus wurde die PCR bei 72°C für 5min beendet, gefolgt von einer Kühlphase bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung.

Für die Amplifikation der cDNA der Zytokine wurden 2,5 Einheiten Gold-Taq® (PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden 10 min bei 94°C erhitzt, bevor die Taq zugegeben wurde und der oben beschriebene Zyklus gestartet wurde.

Zytokin	Länge des cDNA Amplifikates (bp)	Primersequenzen
$ß_2$-Mikroglobulin	222	sense : 5‘-TGACCGGCTTGTATGCTATC-3‘ antisense:5‘-CAGTGTGAGCCAGGATATAG-3‘
IL-4	216	sense: 5‘-TCGGCATTTTGAACGAGGTC-3‘ antisense: 5‘-GAAAAGCCCGAAAGAGTCTC-3‘
IL-10	254	sense: 5‘-ATGCAGGACTTTAAGGGTTACTTG-3‘ antisense:5‘-TAGACACCTTGGTCTTGGAGCTTA-3‘
TNF-α	212	sense: 5‘-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3‘ antisense:5‘-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3‘
INF-γ	227	sense:5‘- GCTCTGAGACAATGAACGCT-3‘ antisense: 5‘-AAAGAGATAATCTGGCTCTGC-3‘

2.4. Charakterisierung von T-Zell-Epitopen innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase

Um die immunologischen Eigenschaften der Chitinase näher zu charakterisieren, wurde mit Hilfe von drei verschiedenen Algorithmen T-Zell-Epitope innerhalb des Proteins identifiziert. Dabei kamen die folgenden Algorithmen zur Anwendung:

der Algorithmus von Rothbard und Taylor (1988)

die MHC-II-Bindungs-Motive nach Rammensee (Rammensee et al. 1995)

der Algorithmus nach Humphreys (Modifikation des Stille-Algorithmus, 1987)

2.4.1. Algorithmus von Rothbard und Taylor

Der Algorithmus von Rothbard und Taylor (1988) findet seine Anwendung innerhalb der linearen Sequenz eines Proteins. Diese Epitop-Vorhersage identifiziert Bereiche mit fünf Aminosäuren, an deren ersten Stelle eine geladene Aminosäure oder Glycin steht, gefolgt von zwei hydrophoben Aminosäuren. Die dritte Stelle erfordert ein Prolin oder eine hydrophobe Aminosäure, während an der letzten Position eine polare Aminosäure oder Glycin steht. Diese Abfolge von Aminosäuren ist jedoch nicht ausreichend für die Stimulierung von T-Zellen. Erst Peptide mit einer Länge von 8-12 Aminosäuren können mit MHC-Molekülen interagieren, so daß synthetische Peptide mit einer Länge von 15 Aminosäuren hergestellt und eingesetzt wurden. Dieser Algorithmus wurde mit Hilfe des Computerprogrammes HUSAR (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) auf die OvL3-Chitinase angewendet.

2.4.2. MHC-II-Bindungs-Motive nach der Vorhersage von Rammensee

Die Vorhersage von Rammensee (Rammensee et al. 1995) über die MHC-Bindungs-Motive von Peptiden wurde durch Sequenzierung von natürlichen Liganden ermittelt. Dabei wurden gebundene Peptide von MHC-II-Molekülen eluiert, über HPLC getrennt und anschließend sequenziert. Die so erhaltenen Daten zeigten, daß besonders die Positionen P1, P4, P6 und P9 entscheidend für die Bindung der Peptide an die Bindungsgruben von MHC-Molekülen sind.
Dabei kommt es jedoch zwischen den einzelnen MHC-II-Allelen zu einem unterschiedlichen Bindungsverhalten der einzelnen Positionen. So ist für die Position P1 bei dem murinen H2-E^k eine aliphatische Aminosäure gefordert, während das homologe H2-E^d an dieser Stelle eine aromatische Aminosäure verlangt (Schild et al. 1995). Deshalb ist es notwendig, für jedes MHC-II-Allel eine gesonderte Vorhersage über das Bindungsverhalten und somit über die AS-Abfolge zu treffen. Uns wurde die Vorhersage von MHC-Bindung-Motiven innerhalb der OvL3-Chitinase für BALB/c-Mäuse mit dem genetischen Hintergrund H2-E^d von der Arbeitsgruppe Rammensee zur Verfügung gestellt.

2.4.3. Algorithmus nach Humphreys

Der Algorithmus nach Humphreys basiert auf der Arbeit von Stille et al. (1988), dessen Grundlage die Untersuchungen von DeLisi und Berzofsky (1985) ist. Hier werden amphipathische Strukturen und die damit verbundene mögliche T-Zell-Antigenität innerhalb eines Proteins erkannt. Das von Humphreys

entwickelte Programm identifiziert die mittlere Hydrophobizität einer Aminosäuregruppe auf einem axialen Abschnitt einer Helix mit 3-6 Windungen. Dabei sollen sich die Aminosäuren in Position n, n + 4, n+7, n+11, n+14 oder n+18 befinden.

Mit Hilfe dieses Programmes werden Abschnitte mit 12-19 Aminosäuren innerhalb 4-6 Windungen auf einer α-Helix bestimmt. Diese Abschnitte weisen durch ihre Seitenketten hohe Hydrophobizität auf, wobei Prolin nicht berücksichtigt wird. Angrenzend befindet sich ein mäßig hydrophiler Bereich. Die so charakterisierten Bereiche stellen potentielle T-Zell-Epitope dar, die in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen T-Zellen präsentiert werden.

Dieser Algorithmus wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Humphreys auf die OvL3-Chitinase angewendet.

2.4.4. Beurteilung der Sensitivität und Spezifität der Algorithmen

Um Aussagen über die Genauigkeit und die Zuverlässigkeit der Algorithmen machen zu können, wurden die Begriffe Sensitivität und Spezifität verwendet (Deavin et al. 1996). Dabei wurde die Sensitivität wie folgt definiert:

Sensitivität = Anzahl der AS der korrekt vorhergesagten Epitope/
Gesamtanzahl der AS aller bekannten Epitope

Spezifität = Anzahl der AS der korrekt vorhergesagten Epitope
Gesamtanzahl der AS der vorhergesagten Epitope

2.4.5. Herstellung der vorhergesagten T-Zell-Epitope als synthetische Peptide

Die vorhergesagten T-Zell-Epitope wurden von der Arbeitsgruppe Schneider-Mergener (Institut für Immunologie, Charitè, Berlin) als synthetische Peptide nach dem Standard Spot-Synthese-Protokoll (Frank 1992) mit einer automatischen Syntheseapparatur (Abimed GmbH, Langenfeld, Deutschland) hergestellt (Kramer et al. 1994, Kramer und Schneider-Mergener 1998). Nach der Synthese und Abspaltung der Schutzgruppen wurden die Peptide von der Zellulose durch Ammoniak-Dampf abgelöst. Die noch an der Membran heftenden Peptide wurden ausgestanzt und in 96-Vertiefung-Mikrotiterplatten überführt. Jeder Spot enthielt ca. 50nmol Peptid. Jedes 20ste Peptid wurde als Duplikat hergestellt und im HPLC (Hewlett Packard, Waldborn, Deutschland) auf seine Reinheit (>70%) überprüft.

2.5. Aktivitätstest der *O. volvulus-L3-Chitinase*

Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität des Proteins wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Dabei wurde das Substrat N-Acetyl-Glucosamin verwendet, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Methylumbellyferyl (4-methylumbelliferyl-N,N,N,-triacetylchito-triose; Sigma) gekoppelt war. Die Endkonzentration des Substrates betrug 5µM in 2ml 50mM $NaPO_4$. Der Start erfolgte durch die Zugabe der Probe (Endkonzentration zwischen 0,2-5µg) und anschließender Inkubation bei 37°C. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde in einem Zeitraum von 40min alle 5min im Fluoreszenzphotometer (Contron, Neufahn, Deutschland) gemessen. Als Positivkontrolle diente eine käufliche Chitinase des Bakteriums *Serratia marcescens*, die in Konzentrationen zwischen 0,2µg/ml und 10µg/ml eingesetzt wurde. Zudem wurde neben PBS als Negativkontrolle ein rekombinantes Filarienprotein (das Cystatin der Filarie *A. viteae*; Hartmann et al. 1997) mitgeführt, um unspezifische Reaktionen auszuschließen.

2.6. Charakterisierung der T-Zell-Reaktivität von rekombinanten Proteinen und Peptiden in Feldstudien in Kamerun

2.6.1. Lage des Projektgebietes

Alle Patienten dieser Studie stammten aus der Provinz Centré, einem Feuchtsavannengebiet mit meso- bis hyperendemischer Onchozerkose aus den Dörfern um Mbangassina (Distrikt Mbam, nahe dem Fluß Mbam) und aus der Hauptstadt Yaoundé.

2.6.2. Parasitologische Untersuchungen des Patientenkollektives

Alle Patienten wurden mit Namen, Alter und Herkunft registriert. Die Hautveränderungen, die Anzahl und die Lokalisation von Knoten, in denen sich Würmer befinden (Onchozerkome), wurde protokolliert. Zudem wurde die Häufigkeit der vorangegangenen Einnahme von Ivermectin® (Merk, Sharp und Dohme, USA) vermerkt. Den Patienten wurden je nach Diagnose Medikamente gegen Durchfall, Malaria und Vitaminmangel verabreicht. In Mitarbeit mit dem örtlichen Basisgesundheitsdienst wurden 73 Patienten die Onchozerkome operativ entfernt. Von den 350 behandelten Patienten wurden 61 Personen ausgewählt, die in die Studie aufgenommen wurden.

Diesen Patienten wurde zusätzlich Blut abgenommen, Stuhlproben gewonnen und zur Bestimmung der Hautmikrofilariendichte von *O. volvulus* mit Hilfe eines Skalpells an beiden Schulterblättern eine Hautbiopsie entnommen ("Skin Snip"). Die Hautbiopsien wurden auf einer Torsionswaage (Bereich 0,1 bis 10mg/) gewogen (nachträglich in Berlin), in 1x PBS inkubiert und am folgenden Tag wurde die Anzahl der ausgewanderten Mikrofilarien bestimmt. Die Mikrofilariendichte eines Patienten wurde als arithmetisches Mittel der Mikrofilarienzahl pro mg Haut beider Hautbiopsien berechnet.
Aus den Blutproben wurden Blutausstriche angefertigt und ein Differentialblutbild erstellt. Zudem erfolgte die Isolierung von PBMC, die in Proliferationstests eingesetzt wurden. Die Stuhlprobe wurden mit Lugol-Lösung (eine 1% Lösung, die aus der Stammlösung: 1g Jod und 2g Jodkalium auf 100ml dd H_2O hergestellt wurde) vermischt und mikroskopisch auf Wurmeier, und -larven, sowie auf Amöben- und Lamblienzysten untersucht.

2.6.3. Isolierung mononukleärer Blutzellen (PBMC) von Onchozerkose-Patienten

Humane mononukleäre Blutzellen (T-und B-Lymphozyten, Monozyten) wurden über die Ficoll-Paque-Dichtegradientenzentrifugation isoliert (Boyum 1968). Als Ausgangsmaterial für die Isolierung diente venöses Blut, das in heparinisierte Röhrchen abgenommen wurde.
Das Blut wurde zunächst 1:2 mit Zellkulturmedium (RPMI 1640) verdünnt, anschließend auf Ficoll-Paque überschichtet und 35min bei 140g zentrifugiert. Dies diente dazu, das Blut in seine zellulären Bestandteile zu trennen. Die obere Phase enthielt das Plasma, die Interphase bestand aus mononukleären Blutzellen, die sich durch ihre geringere Dichte auf der mittleren Ficoll-Paque-Phase auflagerten, während die Granulozyten und die Erythrozyten im Sediment zu finden waren.
Nach der Zentrifugation wurden die PBMC mit Hilfe einer Transferpipette vorsichtig entnommen und in ein neues 50ml Plastikröhrchen (Greiner) überführt und anschließend dreimal mit RPMI 1640 gewaschen (1100rpm, 10min, 15°C). Der Anteil der lebenden Zellen wurde mit Hilfe der Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die PBMC wurden auf eine Zellzahl von 1x 10^7Zellen/ml eingestellt und je 100µl je Vertiefung in Zellkulturplatten eingesät.

2.6.4. Zellkultur und Stimulierung von mononukleären Blutzellen

Die Teilungsrate der PBMC wurde durch den Einbau von ^{3}H-Thymidin in die zelluläre DNA gemessen. Die Höhe der Radioaktivität in der Gesamt-DNA einer Zellkultur erlaubte Rückschlüsse auf die Proliferationsrate.

Die PBMC wurden mit Zellkulturmedium, das mit 25mM Hepes, 100U/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin und 10% hitzeinaktiviertem foetalem Kälberserum (FCS) versetzt war, auf eine Zelldichte von $1x10^7$ Zellen/ml eingestellt.

In 96-Vertiefung-Rundboden-Zellkulturplatten (Corning Costar, Bodenheim, Deutschland) wurden 100µl dieser Suspension in jede Vertiefung pipettiert und verschiedene Antigene oder Mitogene in die Ansätze gegeben. Dabei wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Mitogene wurden Concanavalin A (ConA 2µg/Vertiefung) und Phytohämagglutinin (PHA 1:100/Vertiefung) verwendet. Für die Antigenstimulation wurden 18 verschiedene rekombinante *A. viteae*- und *O. volvulus*-Antigene (Endkonzentration 1-10µg/Vertiefung) eingesetzt. Zudem wurden auf jeder Platte eine Negativkontrolle, die nur Zellen in RPMI enthielt, und zwei Positivkontrollen mitgeführt. Zu einem wurde eine Stimulation mit dem ubiquitären Antigen Streptolysin-O von *Streptococcus pyrogenes* (unverdünnt), zum anderen eine spezifische Stimulation mit *O. volvulus*-Gesamtextrakt-Antigen (20µg/Vertiefung) vorgenommen. Die Zellkulturen wurden bei 37°C, 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Den mit Mitogen stimulierten Zellansätzen wurde nach zwei Tagen, den mit Antigen stimulierten Zellen nach vier Tagen 0,5µC ^{3}H-Thymidin pro Vertiefung zugegeben und die Ansätze für weitere 18 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem automatischen Zellerntegerät (Wallac, Turku, Finnland) auf Filtermatten übertragen und das in die DNA eingebaute ^{3}H-Thymidin über Szintillations-Spektroskopie (Trilux 1450, Wallac) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Stimulationsindices angegeben. Dazu wurden die Impulse pro Minute (cpm) der Ansätze mit Antigenstimulation durch die Impulse pro Minute der Ansätze ohne Antigenstimulation geteilt.

2.6.5. Zytokinproduktion von PBMC nach *in vitro*-Stimulation

Die Zytokinproduktion der isolierten PBMC wurde untersucht. Dafür wurden die isolierten PBMC (3x 10^6 Zellen/Vertiefung) mit 2% FCS in 48-Vertiefung-Zellkulturplatten (Corning Costar) bei 37°C, 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Stimulation wurden die OvL3-Chitinase bzw. OvL3-CBD (beide mit je 10µg/Vertiefung) verwendet. Dabei wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation (14h, 24h und 48h) die Zellen abzentrifugiert (400g, 2min, 4°C), die Zellkulturüberstände in sterile Kryoröhrchen überführt und bei -70°C bis zum Zytokinnachweis eingefroren.

Das Zellsediment wurde für die RNA-Isolierung in 100-150µl 4M Guanidin-Thiocyanat, 25mM Natriumcitrat, 0,5% Sarcosyl, 0,1M 2-Mercaptoethanol (Solution D) gelöst und bis zur Aufarbeitung bei -70°C gelagert.

2.6.6. Zytokinnachweis aus Kulturüberständen mononukleärer Blutzellen

Die Konzentrationen der in die Zellkulturüberstände abgegebenen Zytokine (IL-4, IL-5, IL-10 und INF-γ) wurden mit Hilfe eines "sandwich"-ELISA (Genzyme, Rüsselsheim, Deutschland) bestimmt. Hierbei wird ein monoklonaler zytokinspezifischer Antikörper an die feste Phase von Mikrotiterplatten bei 4°C über Nacht adsorbiert. Die unspezifischen Bindungen werden durch PBS mit 4% Rinderserumalbumin (Sigma,) bei 37°C für zwei Stunden blockiert. Anschließend werden die Zellkulturüberstände in die Vertiefungen gegeben und 1h oder 2h (je nach Zytokinbestimmung) bei 37°C inkubiert. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen Zytokine wird mit einem biotinylierten Antikörper für 30-60min (je nach Zytokinbestimmung) bei 37°C inkubiert. Anschließend wird enzymgekoppeltes (Merrettichperoxidase) Streptavidin zugegeben. Durch Zugabe der Substratlösung Teramethylbenzidine (TMB) und H_2O_2 kommt es zu einer blauen Farbreaktion, deren Intensität proportional zu der Konzentration der zu messenden Zytokine ist. Gestoppt wird die Reaktion mit 2N H_2SO_4, die einen Farbumschlag nach Gelb bewirkt, so daß die Farbintensität im Photometer bei OD_{405nm} gemessen werden kann. Mit Hilfe einer Standardkurve kann anschließend die Zytokinkonzentration ermittelt werden.

Zur Konzentrationsbestimmung von IL-4 wurden pro Vertiefung 50µl maus-anti-human IL-4 mAk (Konzentration: 2,5µg/ml) bzw. anti human INF-γ mAk, maus-anti human IL-5 mAk, anti human IL-10 mAk über Nacht bei 4°C an Flachbodenplatten (Corning Costar) gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS/0,05% Tween 20 wurden die Mikrotiterplatten bis zu ihrer Weiterverwendung bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die freien Bindungsstellen mit je 100µl 1x PBS/3% RSA bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde zweimal mit je 75µl 1x PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und 50µl Zellkulturüberstand bzw. der zugehörige Zytokinstandard (Konzentrationsbereich 16-2000pg/ml) in die Vertiefungen gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach weiteren vier Waschschritten erfolgte 45min lang die Inkubation mit je 50µl des biotinylierten zweiten Antikörpers (Konzentration 1,25µg/ml) bei Raumtemperatur. Danach wurde zwölfmal gewaschen und anschließend wurde 50µl Substratlösung zugegeben. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 405_{nm} alle 3 min im ELISA-Reader (Dynatech).

2.6.7. ELISA zur Bestimmung der *O. volvulus*-spezifischen IgG beim Menschen

Mit Hilfe des ELISA wurden Antikörper der Onchozerkose-Patienten gegen *O. volvulus*, Chitinase und die CBD bestimmt. Polysorb Mikrotiterplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit 2,5µg/ml OvAg oder 2 µg/ml *O. volvulus*-L3-Chitinase bzw. OvL3-CBD in Beschichtungspuffer über Nacht bei

4°C inkubiert. Danach wurden die Platten zweimal mit 1x PBS/0,025% Tween-20 gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C zwischengelagert.
Die Platten wurden zweimal mit PBS/Tween-20 gewaschen, und die unspezifischen Bindungsstellen mit PBS/3% RSA zwei Stunden lang bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach Waschen mit PBS/Tween-20 wurden die zu testenden Seren in einer 1:100 Verdünnung (in PBS/3% RSA) aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgte Waschen mit PBS/Tween-20, bevor 50µl der subklassenspezifischen biotinylierten Maus-anti-human Antikörper auf die Platten gegeben wurden. Dabei wurden die Antikörper in folgenden Verdünnungen verwendet (alle in PBS/3% RSA verdünnt):

IgG 1:2000
IgG_1 1:3000
IgG_3 1:3000
IgG_4 1:1000

Diese wurden bei 37°C 3h inkubiert. Danach wurde mit PBS/Tween-20 gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit 50µl Alkalischer-Phosphatase-konjugiertem Ziege-anti-Maus IgG+IgM Antikörper (1:3000 in PBS/3% RSA verdünnt) eine Stunde lang bei 37°C. Nach Waschen mit PBS/Tween-20 wurden 50µl der Substratlösung (1 Tablette p-Nitrophenyl-phosphat (Sigma) in 20ml Substratpuffer und 1mM $MgCl_2$ gelöst) zugegeben und die optische Dichte bei 405nm im ELISA-Reader (Dynatech) gemessen.
.

2.7. Datenverarbeitung

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe des SPSS-Programms. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Student-t-Test für unabhängige Stichproben. Unterschiede zwischen den Gruppen, die $p<0,05$ waren, wurden als signifikante Unterschiede bewertet. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms EXCEL.

2.8. Material

2.8.1. Verwendete Tiere für parasitologische Arbeiten

Tiere

BALB/c-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Meriones unguiculatus	eigene Nachzucht des Inzuchtstammes von Tumblebrook Farms, West Brookfield, MA (USA)
Lederzecke *Ornithodoros moubata*	Eigene Zucht
Filarien *Acanthocheilonema viteae*	aus eigener Haltung
Onchocerca volvulus	Kamerun, Westafrika

2.8.2. Material für immunologische Arbeiten

ELISA

Beschichtungspuffer (pH 9,6)	0,14g	$NaCO_3$
	0,3g	$NaHCO_3$
10x PBS (pH 7,4)	80g	NaCl
	2g	KCl
	11,5g	Na_2HPO_4
	2g	KH_2PO_4
PBS/RSA	3% Rinderserumalbumin in 1x PBS	
Waschlösung	1x PBS	
	0,025% Tween 20	
Substratlösung	1 Substrat-Tablette (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	
	10ml Carbonatpuffer	
	1mM $MgCl_2$	

Stopplösung	100mM EDTA
TCA-LPS aus *S. typhimurium*	(Sigma, München, Deutschland)
RSA (Rinderserumalbumin)	(AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

Antikörper-Konjugate für ELISA

Ziege-anti Maus IgG (Fc Fragment, AP konjugiert)	(Dianova, Hamburg, Deutschland)
Kaninchen-anti Maus IgG_1 (AP konjugiert)	(Biotrend, Köln, Deutschland)
Kaninchen-anti Maus IgG_{2a} (AP konjugiert)	(Biotrend, Köln, Deutschland)
Kaninchen-anti Maus IgG_{2b} (AP konjugiert)	(Biotrend, Köln, Deutschland)
Kaninchen-anti Maus IgG_3 (AP konjugiert)	(Biotrend, Köln, Deutschland)

Immunblot

Transferpuffer	25mM	Tris
	192mM	Glycin
	10%	Methanol
10x TBS	1M	NaCl
	50mM	Tris pH 7,4
Substratlösung	50ml	TBS
	400µl	0,4% Chlornaphtol
	40µl	H_2O_2

Antikörper-Konjugate für Immunblot

Monospezifisches anti OvL3-Chitinase-Serum (Maus)

Anti-6His-Antikörper (Maus-IgG_1 Isotyp) (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Kaninchen-Anti-TetC Dr. A. Khan, Division of Microbiology and Parasitology, Department of Pathology, University of Cambridge

Isolierung von Milzzellen

Medium:	RPMI 1641 (Gibco, Deutschland) mit Hepes,
	10 U Penicillin (Gibco,Karlsruhe, Deutschland)
	10mg/ml Streptomycin (Gibco, Deutschland)
	10% foetales Kälberserum (Gibco, Deutschland)
	200mM L-Glutamin (Gibco, Deutschland)
Erytrozytenlyselösung	90ml 160mm NH_4Cl
	10ml 170 mM Tris, pH 7,6
Trypanblau	(Gibco, Deutschland)
Mitogen	Concanavalin A (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)
Radioaktivität	^{3}H-Thymidin (NCI, Eschwege, Deutschland)
Zellerntesystem	Filtermatten (Wallac, Turku, Finnland)
	Meltilex-Filter (Wallac, Turku, Finnland)

zusätzlich wurde die Isolierung der PBMC benötigt:

Ficoll-Paque	(Pharmacia, Freiburg, Deutschland)
PHA	Phytohämagglutinin (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)
SL-O	Streptolysin-O (Fisher Scientific, USA)

2.8.3. Material für molekularbiologische Arbeiten

SDS-PAGE

5x SDS-Laufpuffer	12,4mM	Tris gepuffert
	325mM	Glycin
	0,1%	SDS

2x Probenpuffer	62,5mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	8%	ß-Mercaptoethanol
	3%	SDS
	20 %	Glyzerin
	0,02%	Bromphenolblau

Ammoniumpersulfat (APS) 10% in H_2O

Coomassie-Färbelösung	10%	Essigsäure
	20%	Ethanol
	0,1%	Coomassie R250

Coomassie-Entfärbelösung	10%	Essigsäure
	20%	Ethanol

Trenngel (12,5%)

Acrylamid	16,7ml (30%)
H_2O	12,7ml
Tris-HCl pH 8,8	10ml
TEMED	20µl
SDS 10%	400µl
APS	200µl

Sammelgel (4%)

Acrylamid	2,7ml (30%)
H_2O	12ml
Tris-HCl pH 6,8	5ml
TEMED	20µl
SDS 10%	200µl
APS 10%	200µl

Proteinmarker: Prestained (Sigma, München, Deutschland)

Mit den folgenden Komponenten: α-Makroglobulin 205 000 Da

β-Galaktosidase 112 000 Da

Fruktose-6-Phosphat Kinase 87 000 Da

Pyruvat Kinase 69 000 Da

Fumarase 56 000 Da

Laktat Dehydrogenase 38 500 Da

Triosephosphat Isomerase 33 500 Da

Agarose-Gelelektrophorese

10x TAE	48,4g	Tris
	11,42ml	Essigsäure
	20ml	EDTA pH 8,0
	ad 1l	H_2O

DNA-Ladepuffer (6x)	0,25%	Bromphenolblau
	40%	Sucrose in H_2O

Ethidiumbromid-Stammlösung 10mg/ml in H_2O

Farbmarker für DNA-Proben: Bio-Sizer II+V (AGS, Heidelberg, Deutschland)

Bakterien:

E.coli-Stämme:

XL1-Blue Qiagen, Hilden, Deutschland

JM 109 Qiagen, Hilden, Deutschland

Salmonella typhimurium-Stämme

SL3261 Die Salmonellen wurden uns von Dr. A. Khan, Division of Microbiology and Parasitology, Department of Pathology, University of Cambridge, freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Plasmid-Vektoren:

pGEM-T

T-overhang Vektor der Firma Promega, Mannheim, Deutschland

pQE-30

Expressionsvektor mit einer Kassette, die für 6-Histidine codiert und sich am N-Terminus der Multi Cloning Site (MCS) befindet. Qiagen, Hilden, Deutschland

pTECH

Vektor für Salmonellen, bei dem das Fremdprotein als Fusionsprotein mit dem TetC exprimiert wird. Das Plasmid wurde uns von Dr. A. Khan, Division of Microbiology and Parasitology, Department of Pathology, University of Cambridge, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Aufreinigung rekombinanter Proteine aus E.coli-Lysat

IPTG Stammlösung	1M	in H_2O
(BIOMOL, Hamburg, Deutschland)		

native Aufreinigung

Bindungspuffer	5mM	Imidazol
	500mM	NaCl
	20mM	Tris HCl, pH 7,9
Waschpuffer	60mM	Imidazol
	500mM	NaCl
	20mM	Tris HCl, pH 7,9
Elutionspuffer	1M	Imidazol
	500mM	NaCl
	20mM	Tris HCl, pH 7,9
Beladungspuffer	400mM	$NiSO_4$

Denaturiende Aufreinigung

Puffer B-E: 8M Harnstoff
0,1 M NaH_2PO_4
0,01 M Tris
Puffer B: pH 8,0
Puffer C: pH 6,3
Puffer D. pH 5,9
Puffer E: pH 4,5

Kultivierung von Bakterien

LB-Medium 10g NaCl
5g Hefeextrakt (Difco, USA)
10g Trypton (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
ad 1l H_2O

LB-Platten 10g NaCl
5g Hefeextrakt (Difco, USA)
10g Trypton (AppliChem, Darmstadt, Deutschland
15g Bacto-Agar (AppliChem, Darmstadt, Deutschland
ad 1l H_2O

Ampicillin Stammlösung 50mg/ml (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Gebrauchslösung 50µg/ml

Kanamycin Stammlösung 25mg/ml (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland)
Gebrauchslösung 25µg/ml

Salmonellen-Anreicherungs-Medien:
BPLS-Agar 51g (Merk, Darmstadt, Deutschland) ad 1l ddH_2O

XLD-Agar	55g (Merk, Darmstadt, Deutschland) ad 1l ddH_2O
1% Peptonwasser, gepuffert	10g Pepton 5g NaCl 3,5g Na_2HPO4 1,5 g K_2HPO_4 ad 1l ddH_2O

Transformation kompetenter Bakterien

SOB-Medium	2g Trypton 0,5g Hefeextrakt 0,05g NaCl 250µl KCl 20µl NaOH ad 100ml H_2O autoklavieren 0,5ml $MgCl_2$ (steril)
SOC-Medium	SOB-Medium 20mM Glucose sterilfiltrieren (Filter mit 0,45µm Porengröße)
TB	10mM Pipes 55 mM $MnCl_2$ 15 mM $CaCl_2$ 250 mM KCl

alles ohne $MnCl_2$ mit KOH auf pH 6,7 stellen, $MnCl_2$ dazu, und sterilfiltrieren (Filter mit 0,45µm Porengröße)

Aktivitätstest

50 mM Phosphatpuffer, pH 6,4

4-Methylumbelliferyl-N-N-N-triacetylchitotriose Sigma, München, Deutschland

Chitinase von *Serratia marcescens* Sigma, München, Deutschland

Isolation von Plasmid-DNA

Minipräparation

QIAGEN-Säulen: Tip 20 der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland

Puffer P1	50mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10mM	EDTA
	1µg/ml	RNase A
Puffer P2	200mM	NaOH
	1%	SDS
Puffer P3	3M	K-Acetat, pH 4,8

TE-Puffer	10mM	Tris HCl, pH 8,0
	1mM	EDTA

Maxipräparation

QIAGEN-Säulen: Tip 500 der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland

Puffer QBT	750mM	NaCl
	50mM	MOPS, pH 7,0
	15%	Isopropanol
	0,15%	Triton X-100
Puffer QC	1.0M	NaCl
	50mM	MOPS, pH 7,0
	15%	Isopropanol
Puffer QF	1,25M	NaCl
	50mM	Tris HCl, pH 8,5
	15%	Isopropanol

Isolation von DNA aus Agarosegelen

Es wurde das QIAEX II Kit-System der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland gemäß der Herstellerangaben verwendet.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Taq-Polymerase (Gibco, Karlsruhe, Deutschland),
Gold®-Tag-Polymerase (PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)
Deoxynukleotid-Triphosphate (Promega, Heidelberg, Deutschland)
mitgelieferter 10-fach PCR-Puffer und $MgCl_2$ gemäß der Herstellerangaben

Synthetische Oligonukleotide
Alle verwendeten Oligonukleotide wurde bei der Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland hergestellt.

2.8.4. Kits und Enzyme

Zytokin-ELISA (IL-4, IL-5, IL-10 und INF-γ)	Genzyme, Rüsselsheim, Deutschland
QIAGEN Plasmid-Kit (Mini, Maxi)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAEX II-Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Chromatographie Ni-NTA-Matrix	QIAGEN, Hilden, Deutschland
BCA-Bestimmungskit	Pierce, Rockford, USA
Geltrockner-Kit	Promega, Heidelberg, Deutschland
Lysozym	Sigma, München, Deutschland
Restriktionsenzyme	AGS, Heidelberg, Deutschland
T_4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Niederlande
DNase	AGS, Heidelberg, Deutschland
SAP	Boehringer Mannheim, Deutschland
Alkalische Phosphatase-Tabletten	Sigma, München, Deutschland

2.8.5. Verbrauchsmaterial

0,2 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Oldendorf, Deutschland
0,5 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Oldendorf, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße	Greiner, Nürtingen, Deutschland

2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polypropylenröhrchen 15,5,50 ml	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Stülpdeckelröhrchen	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Pipettenspitzen 10,1000 µl	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nitrozellulosemembran 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
ELISA-Platten (Maxisorb)	Corning Costar, USA
Einwegkanülen, -spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Mikro-Hämatokritkapillaren	Brand, Wertheim, Deutschland
Einmal-Sterilfilter 0,2µm	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Einmal-Sterilfilter 0,45 µm	Corning Costar, USA
Falten-Filter	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Dialysemembranen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sterile Einwegpipetten 10, 25 ml	Costar, USA
Einwegküvetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Quarzküvetten	Hellma, Mühlheim, Deutschland

Alle Chemikalien wurden, so weit nicht anders angegeben, von Sigma (München, Deutschland) bezogen

2.8.6. Laborgeräte

Analytische Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Elektrophoreseapparaturen	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
ELISA Reader MR 5000	Dynatech, Denkendorf, Deutschland
ELISA-Waschgerät	Dynatech, Denkendorf, Deutschland
ELISA-Drucker	NEC, Ismaning, Japan
Feinwaage BP1105	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Geltrockner	Biorad, München, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Großraumkühlzentrifuge	Beckman. München, Deutschland
Minigelapparatur	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Multikanalpipette	Brandt, Wertheim, Deutschland
Netzgerät EPS 200	Pharmacia, Freiburg, Deutschland

pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
PCR-Thermocycler	Perkin Elmer, Konstanz, Deutschland
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Proteinelutionsapparatur:	
(Pumpe, UV-Monitor, Fraktionssammler)	Biorad, München, Deutschland
Videodokumentationsgerät	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Spektralphotometer,	Hitachi, Japan
Ultraschall-Desintegrator “Sonifier W-250“	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd, Deutschland
Zellerntegerät	Wallac, Turku, Finnland
Szintillations-Spektroskop Trilux 1450	Wallac, Turku, Finnland
Fluoreszenzphotometer	Contron, Neufahn, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

3.1.1. Klonierung der *O. volvulus*-L3-Chitinase in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE 30

Die cDNA der *O. volvulus*-L3-Chitinase wurde uns von Prof. A. E. Bianco (Glasgow, UK) in einem T-overhang Vektor (pCR II, Invitrogen, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Da ein direktes Klonieren in einen Expressionsvektor nicht möglich war, wurde die cDNA mittels PCR und spezifischen Primern, in die eine BamHI (Forward-Primer) bzw. HindIII (Reverse-Primer)-Schnittstelle eingefügt wurde, amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 2) und das Amplifikat von 1500bp aus dem Gel herausgeschnitten und eluiert. Die so gewonnene DNA wurde in eine Ligation mit dem T-overhang Vektor pGEM-T (Promega, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Nach erfolgreicher Transformation in den kompetenten *E. coli* Stamm JM 109 konnte eine Selektion von positiven Transformanten mittels blau-weiß Screening erfolgen. Anschließend wurde das Insert mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII aus dem T-overhang-Vektor herausverdaut. Die Trennung von Plasmid und Insert erfolgte durch die Auftrennung der Fragmente im Agarosegel und nachfolgender Gelelution. Dieser Schritt war notwendig, um ein Produkt zu erhalten, das tatsächlich eine BamHI bzw. HindIII-Schnittstelle am C- bzw. N-Terminus besitzt.

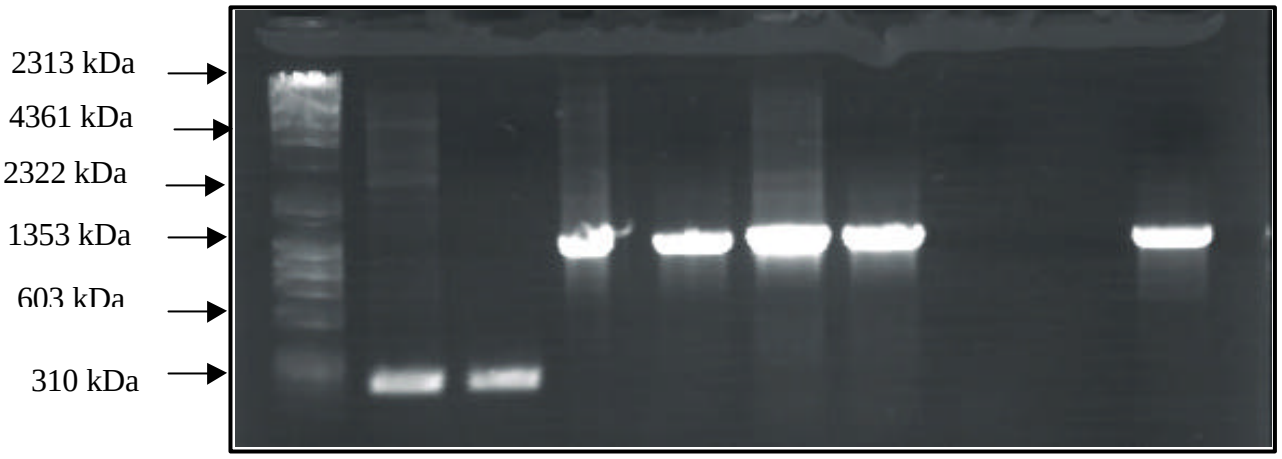


Abb. 2. Amplifikation der O. volvulus-L3-Chitinase und Chitin-Binde-Domäne (CBD) mittels PCR und spezifischen Primern. Spur 1: DNA-Größenstandard in bp; Spur 2-3: Amplifikation der cDNA der CBD mit 200bp, Spur 4-7: Amplifikation der cDNA der Chitinase mit 1500bp; Spur 8-9: Negativkontrolle, Spur 10: Positivkontrolle

Dieses Produkt wurde nun in den vorbereiteten Expressionsvektor pQE-30 (Abb. 3) ligiert. Dazu wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII linearisiert und durch das Enzym SAP dephosphoryliert. Nach erfolgreicher Ligation schloß sich eine Transformation in den kompetenten *E. coli* Stamm XL-1 blue an. Auf Selektionsagar gewachsene Kolonien wurden mittels Restriktionsverdau auf den korrekten Einbau des Inserts hin untersucht. Anschließend wurden Expressionsversuche in kleinen Volumina durchgeführt und Klone, die eine gute Expression zeigten, ausgewählt.

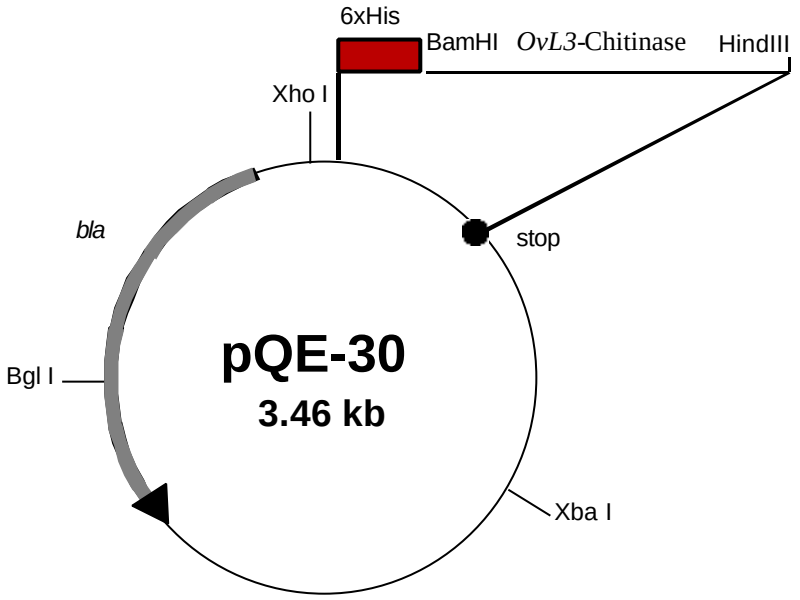


Abb. 3 :Klonierung der OvL3-Chitinase und der OvL3-CBD in den bakteriellen Expressionsvektor pQE 30

3.1.2. Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase in pQE30

Für die Induktion und Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase wurde ein Liter LB-Amp. mit 10ml einer Ü/N-Kultur angeimpft und den transformierten Bakterien XL-1 blue ein Wachstum bis zu einer OD_{600} von 0,4 erlaubt. Die Expression des Proteins wurde mit 5mM IPTG induziert. Nach 3-4 Stunden Wachstumsphase wurden die Bakterien zentrifugiert (15 000g, 20 min, 4°C) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Zur Überprüfung der Proteinexpression wurde das Pellet von 1ml der Bakterienkultur im SDS-Gel aufgetrennt. Hier konnte eine Bande von 56kDa detektiert werden (Abb. 4), die nur von induzierten Bakterien gebildet wurde.

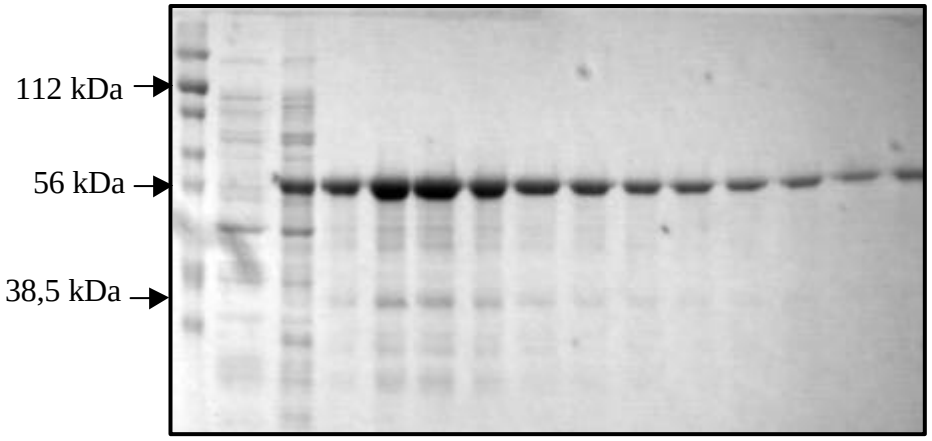


Abb. 4.: SDS-Gel mit aufgereinigten Proteinfraktionen der OvL3-Chitinase. Spur 1: MG-Marker, Spur 2: ohne Induktion; Spur 3: nach Induktion mit 5mM IPTG, Spur 4-15: Aufreinigungsfraktionen

Die Aufreinigung erfolgte mittels Ni-Chelat-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen (8M Harnstoff). Es schloß sich eine Dialyse an, in der Harnstoff schrittweise herauseluiert wurde, bis das Protein in 1 M Harnstoff bzw. PBS/0,5M NaH_2PO_4/1M Tris/2% Glyzerin vorlag. Ein Immunblot mit einem monospezifischen Mausserum gegen die rekombinante *O. volvulus*-L3-Chitinase erkannte die aufgereinigte Bande bei 56kDa (Abb. 5)

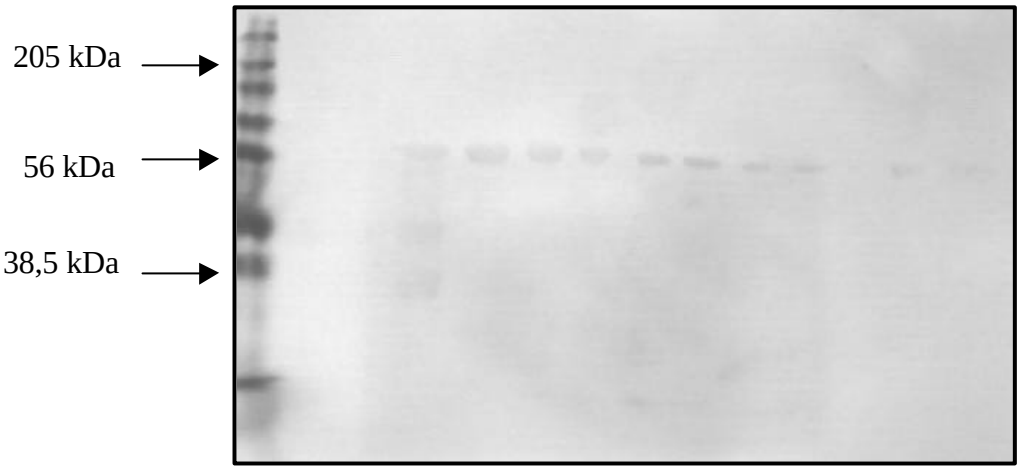


Abb 5. :Immunblot: Aufgereinigte Fraktionen der OvL3-Chitinase konnten mit Hilfe eines Mausserum gegen OvL3-Chitinase (Verdünnung1:100 in 3%RSA/TBS) bei 56 kDa detektiert werden.

3.1.3. Klonierung der Chitin-Binde-Domäne in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE 30

Aus der cDNA der OvL3-Chitinase wurde mittels PCR und spezifischen Primern, in die eine BamHI (Forward-Primer) bzw. eine HindIII (Reverse-Primer) eingefügt wurde, die cDNA amplifiziert, die für die Chitin-Binde Domäne kodiert. Das PCR-Produkt wurde im Agarosegel aufgetrennt (Abb. 2) und das Amplifikat von 220bp aus dem Gel eluiert. Es schloß sich ein Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und HindIII an. Das so vorbereitete Insert wurde in den Expressionsvektor pQE 30 ligiert, der zuvor mit BamHI und HindIII linearisiert und mit SAP dephosphoryliert worden war. Anschließend wurde das Plasmid in kompetente *E. coli* des Stammes XL-1 blue transformiert und auf Selektionsagar (LB-Amp.) ausgestrichen. Die gewachsenen Kolonien wurden durch Restriktionsverdau der DNA und durch Induktionstests auf den korrekten Einbau des Inserts hin untersucht.

3.1.4. Expression der *O. volvulus*-L3-Chitin-Binde-Domäne in pQE 30

Ein Klon, der das Insert korrekt eingebaut hatte, wurde ausgewählt und zur Expression eingesetzt. Eine Großkultur wurde mit einer Ü/N-Kultur von *O. volvulus*-L3-CBD angeimpft und bis zu einer Dichte OD_{600} von 0,4 kultiviert. Die Expression des Proteins wurde mit 1mM IPTG induziert und es schloß sich eine Wachstumsphase für 3-4 Stunden an. Die Aufreinigung erfolgte unter Verwendung von Imidazol durch Ni-Chelat-Affinitätschromatographie (Abb. 6). In hohen Konzentrationen verdrängt das Imidazol das gebundene Protein von der Nickelmatrix. Das aufgereinigte Protein wurde gegen PBS/0,05% Triton-X 100 dialysiert, um restliches Imidazol zu entfernen. So aufgereinigtes Protein mit einem Molekulargewicht von 20kDa konnte mit Hilfe eines Mausserum gegen OvL3-Chitinase nachgewiesen werden (Abb. 7).

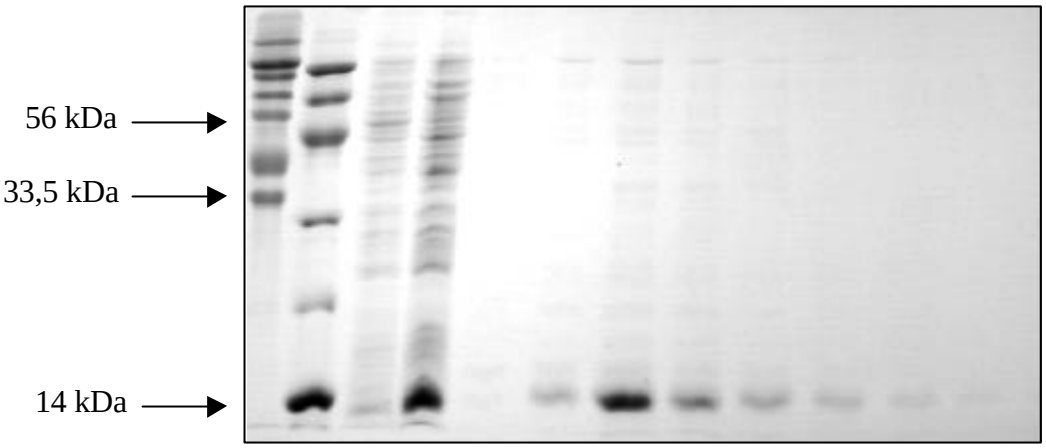


Abb. 6: Aufreinigung der OvL3-CBD unter nativen Bedingungen. Spur 1: MG-Marker in bp, Spur 2: Low-Molekular-Weigt-Marker, Spur 3: ohne Induktion, Spur 4: nach Induktion mit 1mM IPTG, Spur 5-8: Aufreinigungsfraktionen

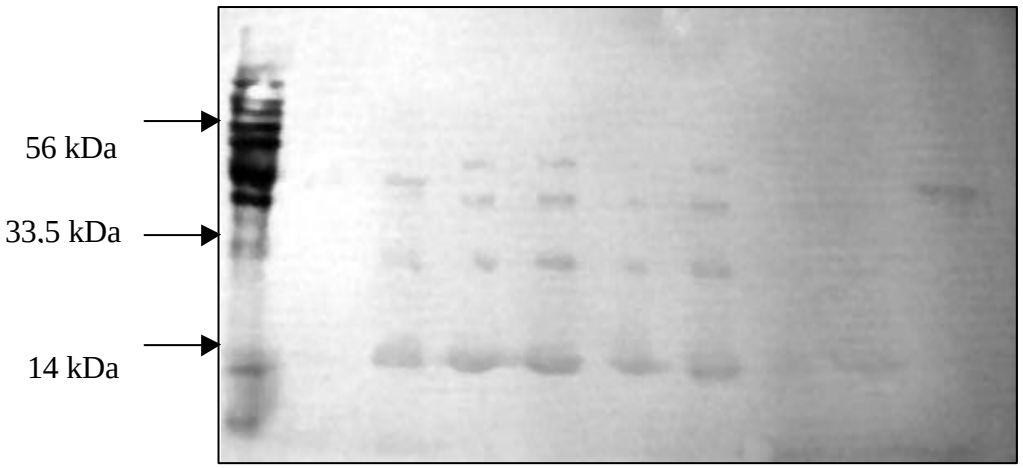


Abb. 7: Nachweis von aufgereinigten Proteinfraktionen der OvL3-CBD durch Immunblot mit einem Mausserum gegen OvL3-Chitinase. Neben den aufgereinigten Fraktionen bei 14 kDa erkannte das Serum noch Multimere der OvL3-CBD bei 30 kDa und 56 kDa.

3.1.5. Klonierung und Expression der *O. volvulus*-L3-Chitinase in *Salmonella typhimurium*

Zusätzlich wurde die cDNA der *O. volvulus*-L3-Chitinase in den Salmonellenvektor pTECH (Abb. 8) kloniert. Dazu wurde der Vektor pTECH mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII linearisiert und durch SAP dephosphoryliert. Anschließend wurde die cDNA der OvL3-Chitinase in den Vektor ligiert. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau und nachfolgender Auftrennung im Agarosegel überprüft. Es schloß sich eine Transformation in den Salmonellenstamm SL3261 an. Die auf Selektionsagar gewachsenen Kolonien wurde auf den korrekten Einbau des Insert durch Restriktionsverdau überprüft. Anschließend wurden positive Klone ausgewählt und Expressionversuche unter anaeroben Kulturbedingungen in kleinen Volumina durchgeführt. Da jedoch im SDS-Gel keine Expressionsbande sichtbar war, wurde ein Immunblot mit Kannichenserum gegen das TetC-Fragment durchgeführt. Mit Hilfe dieses Serum konnte das Fusionspotein von TetC und Chitinase bei 110kDa detektiert werden. Zusätzlich erkannte das Serum Abbauprodukte bei 56kDa und bei 38kDa (Abb. 9).

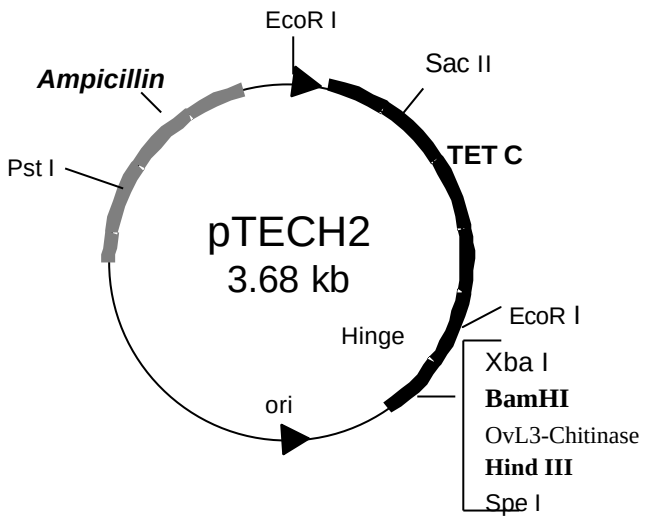


Abb. 8. Klonierung der OvL3-Chitinase in den Salmonellen-Vektor pTECH.

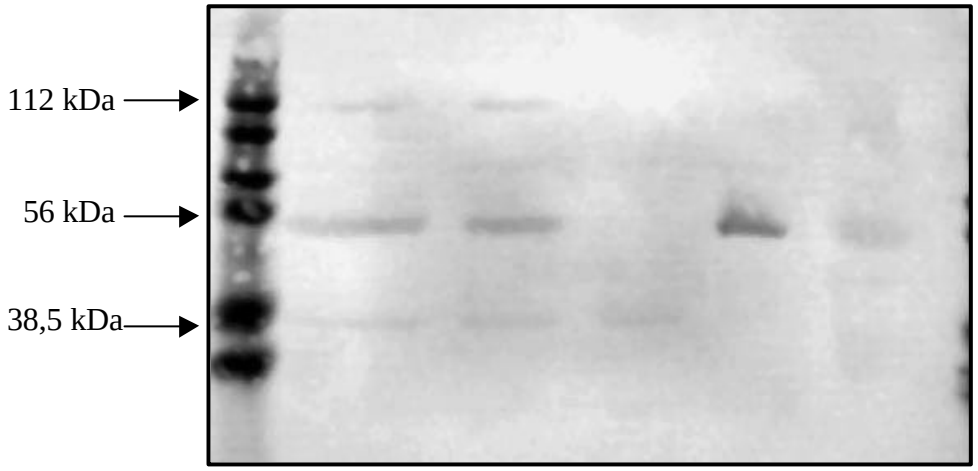


Abb. 9. Nachweis der Expression der OvL3-Chitinase im Salmonellen-Vektor pTECH. Die OvL3-Chitinase konnten mit Hilfe eines Kanninchenserums gegen das TetC-Fragment detektiert werden. Es konnte sowohl das Fusionsprotein mit dem TetC-Fragment bei 96kDa, als auch Abbauprodukte der Chitinase mit dem Tet C-Anteil bei 56kDa und 38,5kDa nachgewiesen werden. Spur 1,2+4: Klon von SL3261 mit Chitinase/pTECH, Spur 3: Negativkontrolle: SL3261 ohne Insert

3.2. Strukturanalyse der *O. volvulus*-L3-Chitinase

Die *O. volvulus*-L3-Chitinase gehört in die Gruppe der Familie 18 Gykosyl Hydrolasen, die die Spaltung von ß-1-4-N-Acetyl-D-Glucosaminbausteinen katalysieren. Dabei entstehen 2-6 Chito-Oligomere, die wahrscheinlich von parasiteneigenen ß-N-Acetylglucosaminidasen weiter zu Monomeren degradiert werden. Die Enzyme der Gruppe 18 besitzen ein konserviertes aktives Zentrum bestehend aus folgendem Motiv: LIVMFY-DN-G-LIVMF-DN-LIVMF-DN-X-E (Watanabe et al. 1994, Henrissat 1990). Lokalisiert ist dieses aktive Zentrum im vorderen Bereich der katalytischen Domäne, die einer 17-22 Aminosäuren langen Signalsequenz folgt. An die katalytische Domäne schließt sich ein Serin/Threonin reicher Bereich an, der vermutlich Ort einer extensiven O-Glykosilierung ist (Kuranda und Robbins 1991). Zudem befinden sich in diesem Bereich eine große Anzahl an Prolinen, durch die sterisch eine flexible Verbindung zu dem C-terminalen Ende entsteht. Am C-terminalen Ende der Chitinase ist die Chitin-Bindung lokalisiert und sie ist gekennzeichnet durch das Vorhanden sein von 6 Cysteinen. Dieses Motiv läßt sich auch bei Insekten Chitinase wiederfinden, und ihnen wird eine mögliche Rolle bei der Zuführung des gebundenen Substrates zu dem aktiven Zentrum zugeschrieben (Tellam et al. 1996). Insgesamt sind die Chitinase der Filarien untereinander relativ homolog. Sequenzabgleiche der *O. volvulus*-L3 Chitinase mit der L3-Chitinase von *A. viteae* oder mit der Mf-Chitinase von *B. malayi* zeigten 75% Identität auf DNA-Ebene und 70-80% Identität auf Proteinebene. Es konnte jedoch nur 42% Identität auf DNA- und Proteinebene mit der Chitinase des freilebenden Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Swiss Prot Q11174) gefunden werden.

3.3. Überprüfung der Aktivität der rekombinanten *O. volvulus*-L3-Chitinase

Zur Überprüfung der enzymatischen Tätigkeit des Proteins wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Dabei wurde das Substrat N-Acetyl-Glukosamin verwendet, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Methylumbellyferyl gekoppelt war. Die rekombinante *O. volvulus*-L3-Chitinase (eingesetzte Konzentration: 0,5-5µg) war in der Lage, das Substrat zu spalten. Dies konnte durch die Zunahme der Fluoreszenz im Fluoreszenzphotometer (Contron, Neufan, Deutschland) verfolgt werden. Als Positivkontrolle diente eine käufliche Chitinase von *Serratia marcescens* (eingesetzte Konzentration 0,2-2µg). Bei der Negativkontrolle (ein rekombinantes Cystatin der Nagetierfilarie *Achanthoceilonema viteae* mit 17kDa) konnte keine Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 10).

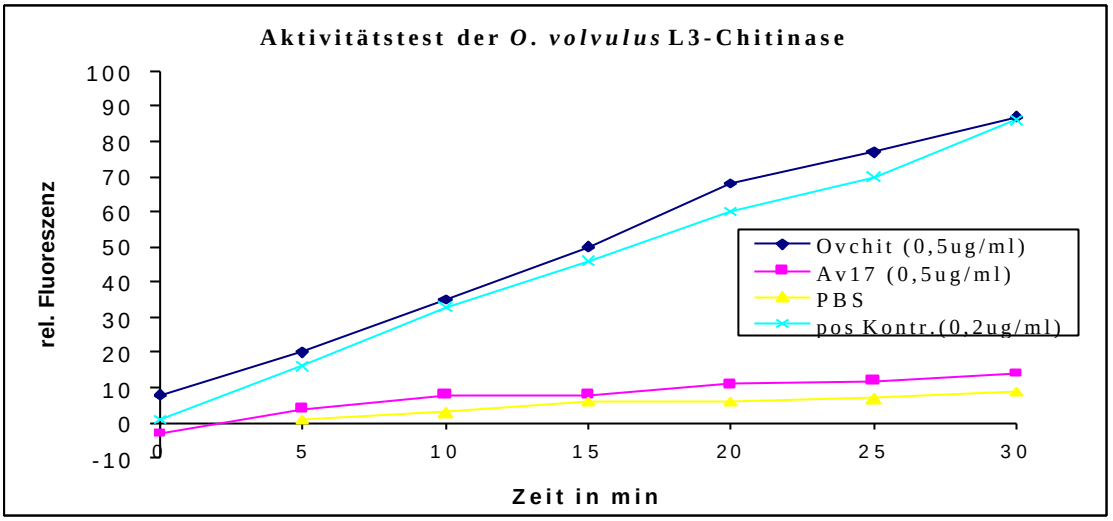


Abb. 10: Enzymatische Aktivität der *O. volvulus*-L3-Chitinase. Dargestellt ist die Zunahme des Chromogens 4-Methylumbellyferyl, das durch die Chitinase (0,5µg) vom Substrat GlucNac3 abgespalten wurde. Positivkontrolle: Chitinase von Serratia marcescens (0,2µg), Negativkontrolle: Cystatin von *A. viteae* mit 17kDa und PBS.

3.4. Immunisierungsstudien mit rekombinanten Proteinen

3.4.1. Studien zur protektiven Immunisierung im Tiermodell der Nagetierfilarie *Achanthoceilonema viteae*

Die OvL3-Chitinase und die OvL3-CBD wurden im Tierversuch mit der Nagetierfilarie *A. viteae* eingesetzt. Das Tiermodell mit der Filarie *A. viteae* und den Wüstenrennmäusen *M. unguiculatus* erlaubt es, das protektive Potential von Antigenen gegen eine Belastungsinfektion mit 75 bzw. 70 Infektionslarven (L3) zu ermitteln.

Die rekombinante OvL3-Chitinase wurde in Kombination mit dem Adjuvans STP verabreicht. In einem ersten Versuchsansatz konnte das rekombinante Protein eine Reduzierung der Adultwurmlast von 41,2% (n.s.) gegenüber der Kontrollgruppe STP erzielen (Abb. 11a). Dies zeigte sich auch in der Mikrofilarienlast nach 8 und nach 11 Wochen. Bei Chitinase immunisierten Tieren konnte eine mittlere Mf-Last/µl von 0,37 (8 Wochen) bzw. 4,1 Mf/µl (11 Wochen) gefunden werden. Die Kontrollgruppe, die nur das Adjuvans STP verabreicht bekam, enthielt durchschnittlich 1,19 Mf/µl nach 8 Wochen und 8,1 Mf/µl nach 11 Wochen. Die Länge der Würmer und die Verteilung der Geschlechter unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Während die Weibchen bei der

immunisierten Gruppe eine Länge von 4,8 cm und die Männchen von 2,3 cm aufwiesen, betrug die Länge der Würmer aus der Kontrollgruppe bei Weibchen 4,4 cm
und bei Männchen 2,1 cm.

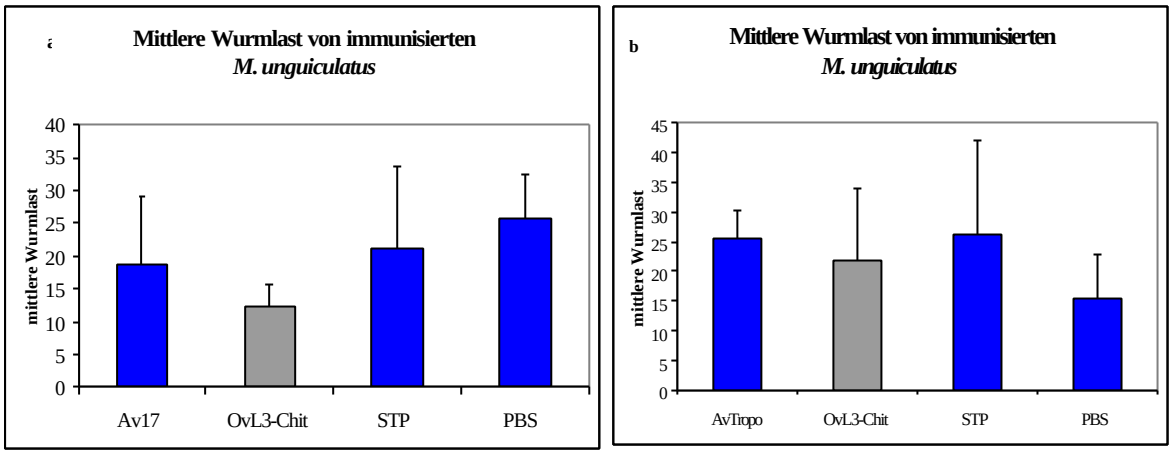


Abb 11a und b: Mittlere Wurmlast+Standardabweichung von immunisierten Wüstenrennmäusen nach Belastungsinfektion mit 75 L3. In diesem Versuch wurden neben der Chitinase die rekombinanten Proteine *A. viteae* 17 (Av17) bzw. *A. viteae* Tropomyosin (AvTropo) gegen die Kontrollgruppe STP und PBS getestet.

Untersucht man die Antikörperantworten der einzelnen Wüstenrennmäuse in dem ersten Experiment, so konnte eine Erhöhung der Antikörper-Subklasse IgG_3 beobachtet werden. Zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion lag der OD Wert für die Subklasse IgG_3 mit 0,62 deutlich über den Werten von IgG_{2a} und IgG_{2b} (OD 0,19; bzw. 0,16). Diese Unterschiede zwischen den Gruppen verringerten sich im Laufe der Infektion, doch auch zum Zeitpunkt der Sektion konnten die höchsten OD-Werte bei der Subklasse IgG_3 gemessen werden (IgG_3: 0,19; IgG_{2a}: 0,14; IgG_{2b}: 0,06).
Man konnte eine negative Korrelation zwischen der Wurmlast und dem IgG_3-Gehalt im Serum dieser Tiere finden. Diese Korrelation wurde im Laufe der Infektion immer deutlicher. Zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion lag der Korrelationskoeffizient bei r = –0,2. Nach 8 Wochen stieg die Korrelation auf einen Koeffizienten von r = -0,7 und zum Zeitpunkt der Sektion lag der Korrelationskoeffizient bei r = -0,8. Zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion konnte bei allen anderen Antikörper-Subklassen ein Anstieg verzeichnet werden. Besonders deutlich war dies bei der Subklasse IgG_1. Während die OD-Werte bei IgG_{2a} bei 0,19 und bei IgG_{2b} bei 0,16 lagen, konnten bei IgG_1 ein OD-Wert von 0,43 gemessen werden. Danach verringerte sich der Gehalt von allen Antikörpern im Laufe der Infektion (2. und der 3. Blutabnahme) bis hin zur Sektion und die Werte von IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG_1 glichen sich wieder an (Abb. 12a).
In einem weiteren Versuch führte die Immunisierung mit Chitinase nur zu einer Reduzierung der Wurmlast um 17,7% (n.s.) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb.12b). Während sich die Wurmlänge

der Weibchen und Männchen zwischen immunisierten Tieren und Kontrolltieren nicht unterschied, konnten bei der Mikrofilarienlast nach 8 Wochen deutliche Unterschiede gefunden werden. Tiere, die mit Chitinase immunisiert wurden, enthielten 2,7 Mf/µl, während die Kontrollgruppe eine durchschnittliche Mikrofilarienlast von 4,8 Mf/µl aufwies. Diese Werte glichen sich jedoch im Laufe der Infektion an. Nach 11 Wochen enthielt die Kontrollgruppe 24,7 Mf/µl und immunisierte Gruppe 22,9 Mf/µl.

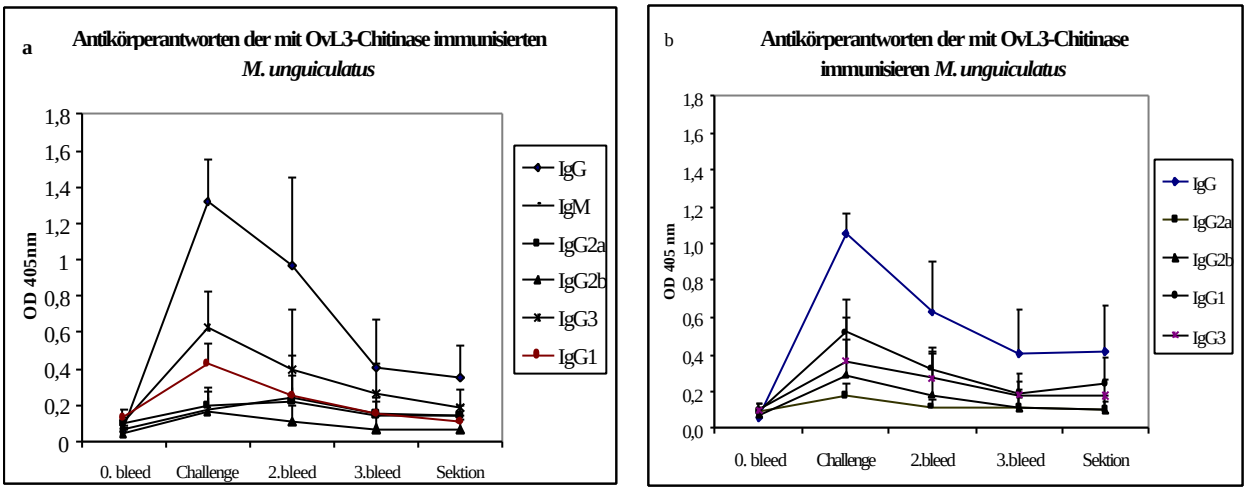


Abb. 12a und b: Antikörperantworten der mit OvL3-Chitinase immunisierten *M. unguiculatus*. Dargestellt sind die OD-Werte von IgG, den IgG-Subklassen und IgM (Versuch a) gegen Chitinase während des Infektionsverlaufes.

Untersucht man hier die Wurmbürde im Zusammenhang mit den IgG_3-Antikörpern zu den verschiedenen Zeitpunkten, so können die Ergebnisse des ersten Versuches nicht bestätigt werden. Lag der Korrelationskoeffizient zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion noch bei r = -0,62, so fiel dieser Wert im Laufe der Infektion immer weiter ab. Nach 8 Wochen lag dieser Wert bei r = -0,42 und nach 11 Wochen war keine Korrelation mehr zu finden (r = -0,07). Bei diesem Versuch zeigte die Antikörper-Subklasse IgG_1 die höchsten OD-Werte. Zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion konnten bei IgG_1 ein OD-Wert von 0,52 gemessen werden. Die Subklasse IgG_3 lag mit einer OD von 0,37 deutlich unter dem Wert von IgG_1, jedoch über den Werten von IgG_{2a} (0,17) und IgG_{2b} (0,29). Im Laufe der Infektion senkte sich der Gehalt aller Antikörpern, dennoch blieb IgG_1 die stärkste Subklasse mit 0,24 gegenüber IgG_3 mit 0,17, IgG_{2a} und IgG_{2b} mit je 0, 1.

In einem weiteren Versuch wurde die rekombinante *O. volvulus*-L3-CBD mit dem Adjuvans Alum verabreicht. Die Belastungsinfektion erfolgte bei diesem Versuch mit 70 L3. In diesem Versuch konnte kein Schutz gegen eine Belastungsinfektion erzielt werden. Die Rückfindungsrate der Würmer lag bei der Gruppe, die OvL3-CBD in Kombination mit Alum erhielten, bei 45. Bei Tieren, die nur Alum verabreicht bekamen, konnten durchschnittlich 42 Würmer wiedergefunden werden. Die Wurmlänge und Mikrofilarienlast zeigten vergleichbare Werte in den Gruppen. Während die Wurmlängen der Gruppen identisch war (Weibchen: 4,6 cm, Männchen 2,2 cm), wiesen die Tiere, die mit OvL3-CBD und Alum immunisiert wurden, eine leicht erhöhte Mikrofilarienlast auf. Nach 8 Wochen konnten bei den Kontrolltieren 4,7 Mf/µl und nach 11 Wochen 19,5 Mf/µl gefunden werden.

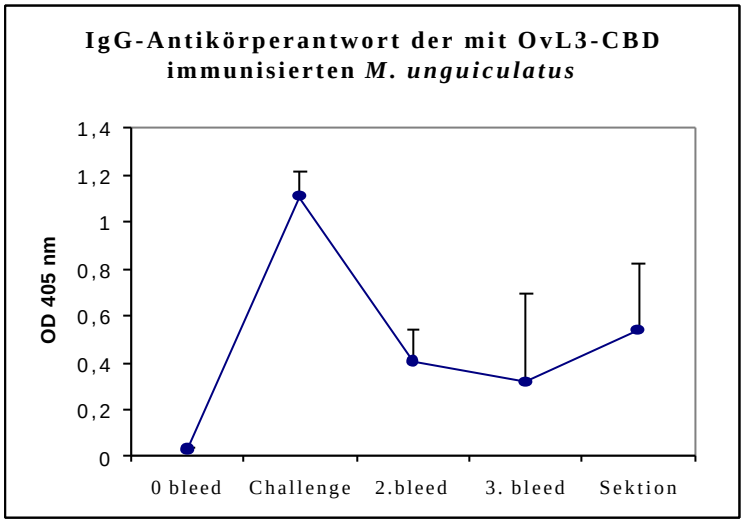


Abb. 13: IgG-Antikörperantwort der mit OvL3-CBD immunisierten *M. unguiculatus*. Dargestellt sind die OD Werte der IgG-Antikörper und die Standardabweichung während des Infektionsverlaufes.

Immunisierte Tiere hatten nach 8 Wochen durchschnittlich 5,34 Mf/µl und nach 11 Wochen 20,8 Mf/µl im Blut. Bei diesem Versuch wurde nur der Gehalt an IgG-Antikörpern und nicht der Subklassen bestimmt. Nach Belastungsinfektion konnte ein starker Anstieg von IgG-Antikörpern (OD_{405}: 1,1) beobachtet werden, der sich im Laufe der Infektion (2. und 3. bleed) wieder absenkte. Zum Zeitpunkt der Sektion hingegen stieg der Gehalt an Antikörpern wieder an (3. bleed: 0,31; Sektion: 0,54) (Abb.13).

3.5. Immunisierung von BALB/c-Mäusen zur Analyse von Immunantworten

Um die Immunantwort gegen die Chitinase näher zu untersuchen, wurden Immunisierungsstudien mit Chitinase und verschiedenen Adjuvantien im Mausmodell durchgeführt. Dazu wurden BALB/c-Mäuse verwendet, da für immunologische Untersuchungen von *M. unguiculatus* nicht ausreichend käufliche Reagenzien zu Verfügung stehen. Bei diesen Untersuchungen wurde neben der humoralen Immunantwort auch die zelluläre Reaktivität mittels T-Zell-Proliferationstests untersucht. Zudem sollte die Evaluierung der Zytokine IL-4, IL-10 und INF-γ auf mRNA-Ebene Aufschluß über eine mögliche Polarisierung der T-Zell-Antwort geben.

3.5.1. T-Zell-Antworten gegen die rekombinante *O. volvulus*-L3-Chitinase in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien

In dieser Versuchsreihe wurden je 6 BALB/c-Mäuse jeweils 3 x im Abstand von je 10 Tagen mit den folgenden Adjuvantien immunisiert: Chitinase ohne Adjuvans, Chitinase mit STP, Chitinase mit Alum oder mit Salmonellen, die Chitinase exprimierten. Die Kontrollgruppen erhielten jeweils nur PBS/1M Harnstoff, STP, Alum oder Salmonellen mit dem Vektor ohne Fremd-DNA.

Die Milzen von je zwei Tieren pro Gruppe wurden 10 Tage nach der letzten Immunisierung entnommen, aufgearbeitet und die Milzzellen in T-Zell-Proliferationstests eingesetzt. Die Wiederholung des Versuches erfolgte 10 Tage später, jedoch konnte der Test wegen technischer Schwierigkeiten nicht ausgewertet werden.

Die höchsten (3000cpm) erzielten Milzzellen von Tieren, die Chitinase in Kombination mit STP verabreicht bekamen (Abb. 14). Die T-Zell-Reaktivität von Mäusen, denen Chitinase mit Alum appliziert wurde, lag mit 1500cpm knapp unter den Ergebnissen der Chitinase/STP-Gruppe, aber deutlich über den Werten der Kontrollgruppen. Milzzellen der Kontrolltiere zeigten nach Stimulation mit OvL3-Chitinase keinerlei Aktivität, so daß eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen gegen Chitinase ausgeschlossen werden konnte.

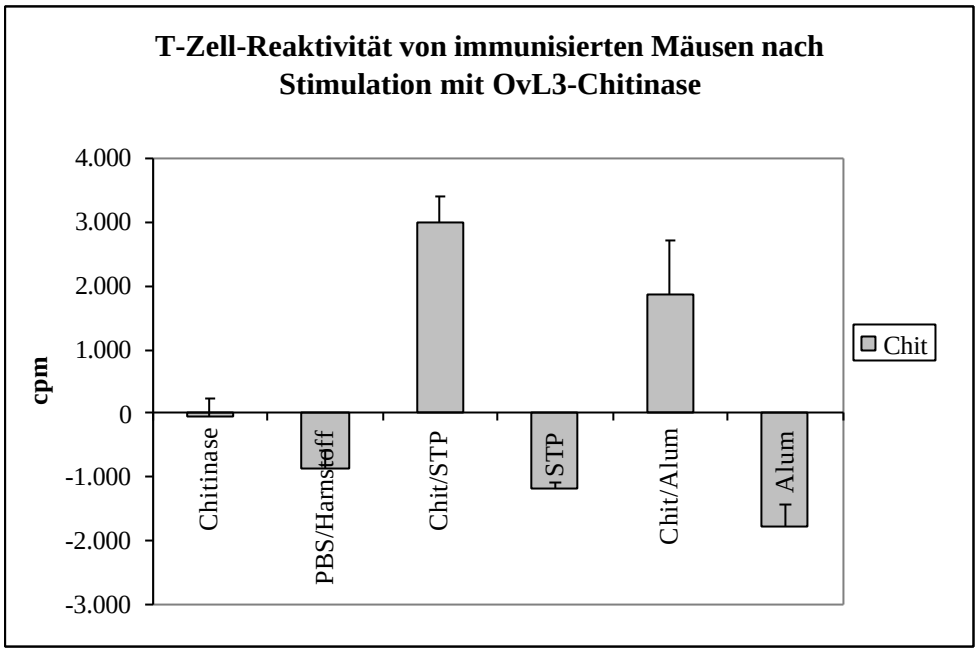


Abb 14. :T-Zell-Reaktivität von BALB/c-Mäusen, die mit Chitinase in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien immunisiert wurden. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der netto cpm + Standardabweichung

Die Immunisierung mit Salmonellen, die Chitinase exprimierten, erfolgte durch die orale Gabe von $5x10^7$-$20x10^9$ CFU. In diesem Versuchsansatz wurde zweimal im Abstand von 10 Tagen immunisiert. Im Laufe des Versuches verstarben zwei Tiere aus der pTECH Gruppe und ein Tier aus der Chitinase/pTECH Gruppe. Bei diesen Tieren konnte deutliche Anzeichen einer systemischen Salmonelleninfektion beobachtet werden. Von den verbleibenden Tieren wurde fünf Tage lang Kot gesammelt, aufgearbeitet und mit Hilfe von Selektionsagar Salmonellen nachgewiesen. Zudem wurde je einem Tier pro Gruppe Milz und Leber entnommen, um in den Organen Salmonellen nachweisen zu können. Während bei den Tieren, die nur die Salmonellen mit dem Vektor pTECH erhielten, Salmonellen in Leber, Milz und im Kot nachgewiesen werden konnten, ließen sich Salmonellen, die Chitinase exprimierten, nur in der Leber des immunisierten Tieres finden. In dieser Gruppe konnten keine Salmonellen im Kot detektiert werden.

10 Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte die Entnahme der Milzen von je 2 Tieren aus jeder Gruppe. Auffällig waren stark (bis 10 fach) vergrößerte Leber und Milzen dieser Tiere. Bei diesem Versuchsansatz konnte keine T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit Chitinase bei den immunisierten Tieren und den Tieren aus der Kontrollgruppe gefunden werden. Erst Tiere, denen 30 Tage nach der letzten Immunisierung die Milzen entnommen und Milzzellen isoliert worden waren, waren in der Lage, nach Stimulation mit Chitinase zu reagieren.

Dabei konnte man ähnliche Werte wie nach Gabe von Chitinase/STP ermitteln. Hier konnten netto Proliferationswerte von 3700cpm gemessen werden. Tiere, die nur den Vektor pTECH erhalten hatten, reagieren nach Stimulation mit OvL3-Chitinase nicht mit einer Aktivierung und Teilung der Milzzellen (Abb. 15).

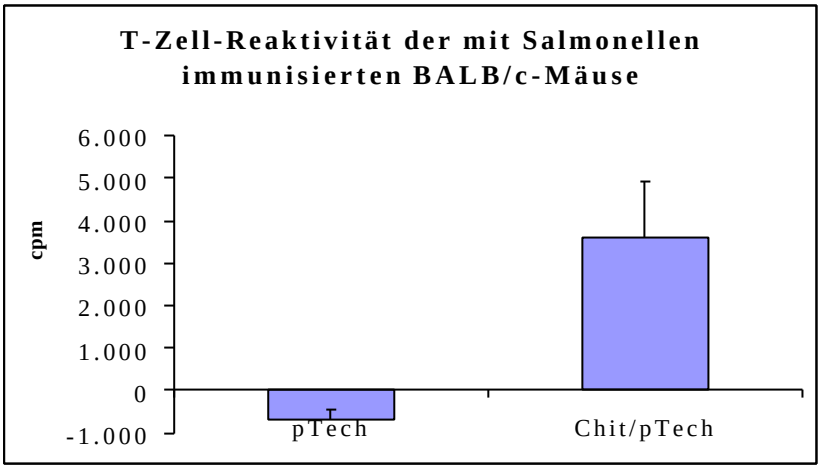


Abb 15: T-Zell-Reaktivität von mit Salmonellen immunisierten BALB/c-Mäusen nach Restimulation mit rekombinanter Chitinase. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der netto cpm+ Standardabweichung.

3.5.2. Antikörperantworten gegen die rekombinante *O. volvulus*-L3-Chitinase in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien

Nach Immunisierung der Mäuse mit Chitinase ohne Adjuvans, Chitinase mit STP und Chitinase in Kombination mit Alum konnten bei allen Tieren IgG-Antikörper gemessen werden (Abb. 16). Untersucht man die Subklassen der einzelnen Gruppen, so konnten bei der Gruppe, die Chitinase ohne Adjuvans erhalten hatte, nur Antikörper der Subklasse IgG_1 detektiert werden. Die OD_{450}-Meßwerte der Subklassen IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG_3 lagen mit 0,02-0,05 in dem selben Bereich wie die Werte der zugehörigen Kontrollgruppe PBS/Harnstoff.

Wurde den Mäusen Chitinase in Kombination mit STP appliziert (Gruppe 3), konnte neben IgG-Antikörpern Immunglobuline aller Subklassen ermittelt werden. Bei IgG_1 lag die OD_{450} bei 0.746 während die Subklassen IgG_{2a} mit OD_{450} von 0,4 und von 0,25 bei IgG_{2b} gegenüber den anderen Gruppen erhöhte Werte aufwiesen.

Die Gabe von Chitinase in Kombination mit Alum (Gruppe 5) bewirkte in Mäusen eine Antikörperantwort, die sich in einer starken IgG_1-Antwort ausdrückte. Antikörper der Subklassen

IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG_3 zeigten im Vergleich der Kontrollgruppe nur leicht erhöhte OD-Werte von 0,01-0,05, die statistisch nicht signifikant waren.

Wurde der Antikörpergehalt des IgG_1 zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt, so zeigte sich, daß nach der ersten und der zweiten Immunisierung höhere OD-Werte bei der Gruppe 5 (Chitinase/Alum) (0,209 nach der 1. Immunisierung; 0,526 nach der 2. Immunisierung) im Vergleich zu der Chitinase/STP Gruppe (0,019 nach der 1. Immunisierung; 0,414 nach der 2. Immunisierung) zu finden waren. Erst nach der 3. Immunisierung konnten bei Tieren, die mit Chitinase/STP immunisiert wurden, höhere OD-Werte der IgG_1-Antikörper (0,746 bei der Chitinase/STP-Gruppe) gegenüber Chitinase/Alum-Gruppe (OD_{405} 0,641) ermittelt werden.

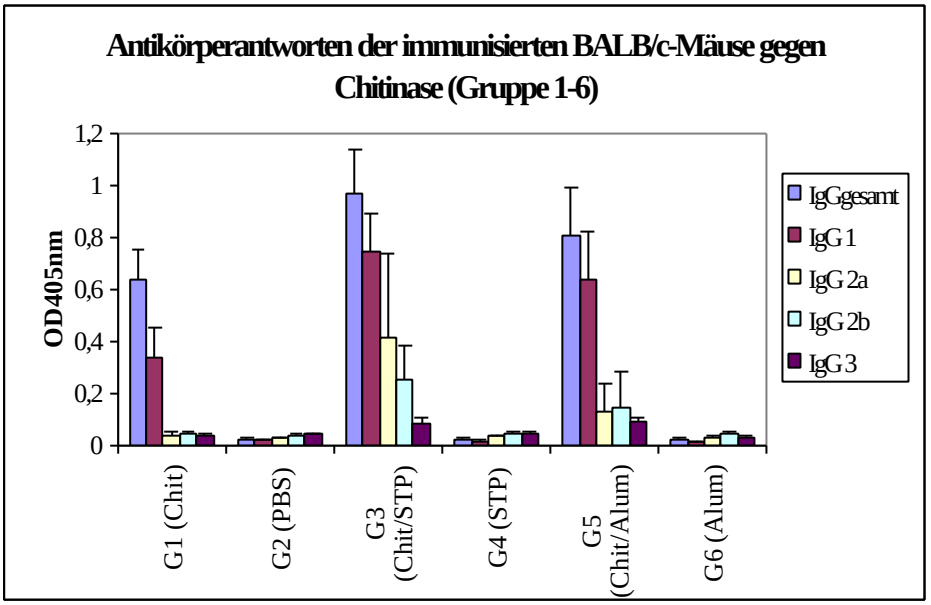


Abb 16: Antikörperantworten von BALB/c-Mäusen, die mit Chitinase in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien immunisiert wurden. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte + Standardabweichung von IgG und IgG-Subklassen.

Obwohl der Nachweis von Salmonellen in den Organen positiv ausfiel und eine Restimulierung mit Chitinase möglich war, konnten keine antigen-spezifischen Antikörper gefunden werden. Um zu überprüfen, ob die Immunisierung zu einer humoralen Immunantwort geführt hat, oder ob nur eine zellvermittelte Immunantwort erfolgte, wurde die Antikörperantwort gegen Salmonellen-LPS im ELISA überprüft.

Es konnten deutliche Unterschiede in der Reaktivität der einzelnen Tiere auf Salmonellen-LPS festgestellt werden (Abb. 17). Nur ein Tier, das mit dem Vektor pTECH immunisiert wurde, reagierte mit einer deutlichen IgG-Antikörperantwort (Tier 5: OD_{450} 1,0). Auch bei der Gruppe die Chitinase/pTECH erhielten, zeigte ein Tier (Tier 1) einen erhöhten Gehalt an IgG-Antikörpern. Bei

den übrigen Tieren ließen sich kaum IgG-Antikörper im Serum nachweisen. Antikörper der Subklassen IgG_3 und IgG_1 konnten im Serum der Tiere nicht nachgewiesen werden, so daß, bedingt durch die geringen Antikörperantworten auf die Testung von den Subklassen $IgG2_a$ und $IgG2_b$ verzichtet wurde.

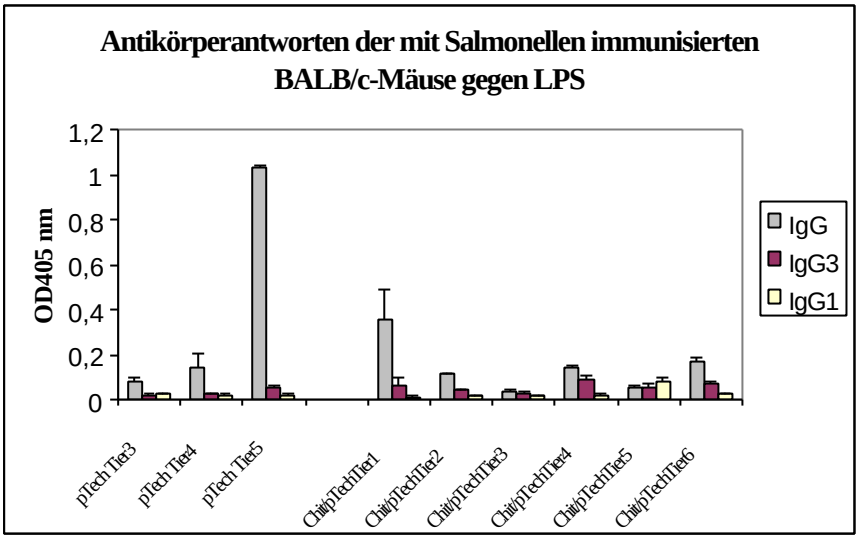


Abb.17 :Antikörperantworten der mit Salmonellen immunisierten BALB/c-Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung von IgG-, IgG3- und IgG1- Antikörperantworten auf Salmonellen-LPS.

3.5.3. Nachweis der Zytokine IL-4, IL-10 und INF-g von Mäusen mittels RT-PCR

Um das Zytokinmuster der immunisierten Mäuse zu untersuchen, wurden Milzzellen der Mäuse, die mit den oben beschriebenen Adjuvantien immunisiert wurden, gewonnen. Die Milzzellen wurden mit rekombinanter Chitinase und ohne Antigen inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (8h, 24h, 48h und 96h) wurden die Überstände der Kultur verworfen und die Zellen in RNA-Isolierungsreagenz (Trisolv®, AGS) aufgenommen.

Nach Isolierung der RNA und Umschreibung in cDNA erfolgte die Amplifikation der cDNA von ß2-Mikroglobulin, um eine erfolgreiche Gewinnung der cDNA zu dokumentieren. Es wurden zuerst Zellen nach 48h Inkubation mit Chitinase bzw. ohne Antigen untersucht. Bei der Gruppe Chitinase/STP und STP wurden zudem noch Milzzellen untersucht, die 8h und 24h mit Chitinase stimuliert wurden.

Bei allen Proben konnte cDNA von ß2-Mikroglobulin amplifiziert werden. Anschließend wurden die Proben durch Titration der cDNA auf eine annähernd gleiche Bandenstärke nach erfolgter PCR eingestellt. Mit diesem Schritt sollten Unterschiede in der cDNA-Konzentration nach der

Umschreibung ausgeglichen werden (Abb. 18a). Die ermittelte Menge an cDNA wurde in die anschließende PCR für die Amplifikation der Zytokine IL-4, IL-10 und INF-γ eingesetzt und das Amplifikat nach Auftrennung im Agarosegel mit dem E.A.S.Y. Programm der Firma Herolab ausgewertet (Abb. 18 b und c). Mit Hilfe dieses Programmes wurden zuerst die Intensitäten der Banden des Markers ausgemessen. Diese Intensität wurde den entsprechenden ng des Markers zugeordnet. An Hand dieser Werte wurde eine Standardkurve von dem Programm erstellt. Die Intensitäten der amplifizierten cDNA jeder Probe wurde ausgemessen und die zugehörige ng-Menge mit Hilfe der Standardkurve ermittelt. Die Ergebnisse wurden mit +/-, +, ++, +++ und ++++ in Tabellen dargestellt (Tab. 1 und 2).

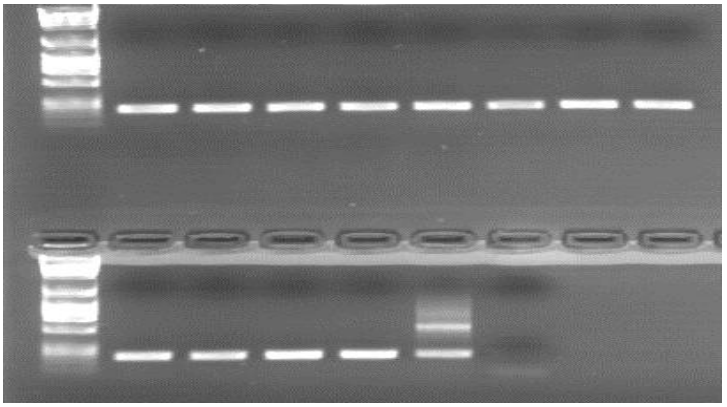


Abb.18a. Amplifikation von ß2Mikroglobulin nach Reverser Transkription
Spur 1: Marker; Spur 2: Gruppe 1: ohne Restimulation; Spur 3: mit Chitinase restimuliert; Spur 4: Gruppe 2: ohne Restimulation, Spur 5: mit Chitinase restimuliert; Spur 6: Gruppe 3: ohne Restimulation; Spur 7: mit Chitinase restimuliert; Spur 8: Gruppe 4: ohne Restimulation; Spur 9: mit Chitinase restimuliert; Spur 10: Marker; Spur 11: Gruppe 5: ohne Restimulation; Spur 12: mit Chitinase restimuliert; Spur 13: Gruppe 6: ohne Restimulation Spur 14: mit Chitinase restimuliert; Spur 15: Positivkontrolle; Spur 16: Negativkontrolle

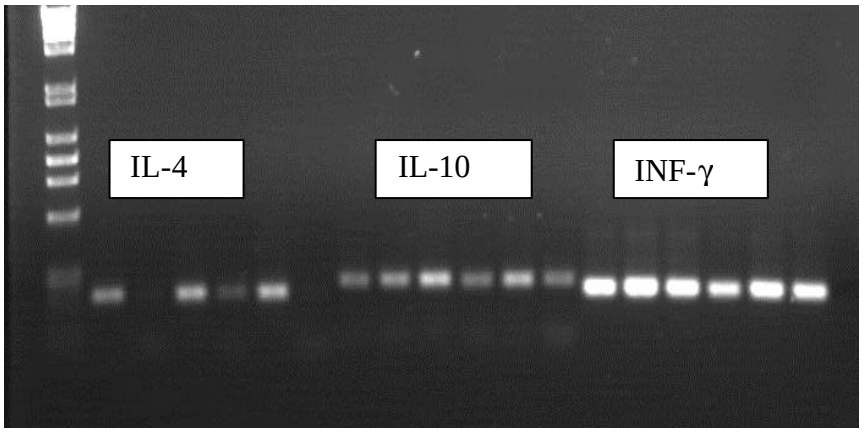


Abb. 18b. Amplifikation der Zytokine IL-4 , IL-10 und INF-γ von unstimulierten Zellen (RPMI) nach 48h Inkubation.
Spur 1: Marker; Spur 2-6: Amplifikation von IL-4 von unstimulierten Zellen der Gruppe 1-6, Spur 7-12: Amplifikation von IL-10 von unstimulierten Zellen der Gruppe 1-6, Spur 13-18: Amplifikation von INF-γ von unstimulierten Zellen der Gruppe 1-6

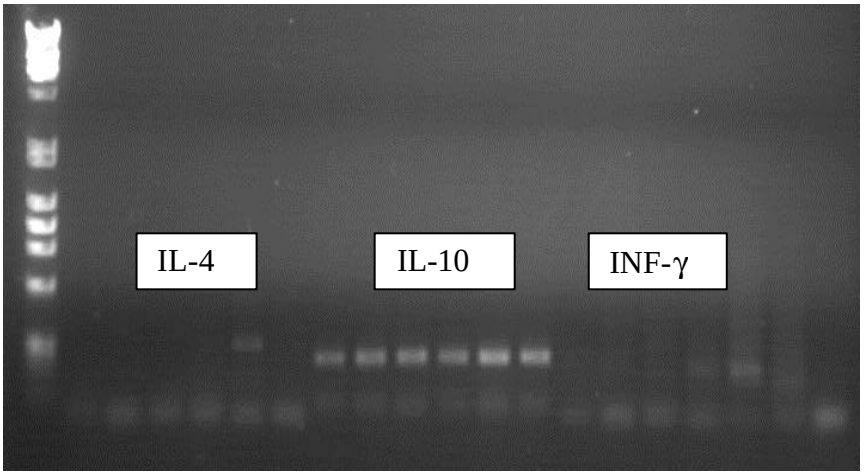


Abb.18c.: Amplifikation der Zytokine IL-4 , IL-10 und INF-γ nach 48 h Stimulation mit rek. OvL3-Chitinase.
Spur 1: Marker; Spur 2-6: Amplifikation von IL-4 von mit Chitinase restimulierten Zellen der Gruppe 1-6, Spur 7-12: Amplifikation von IL-10 von mit Chitinase restimulierten Zellen der Gruppe 1-6, Spur 13-18: Amplifikation von INF-γ von mit Chitinase restimulierten Zellen der Gruppe 1-6

Untersucht man Milzzellen von Mäusen, die nur mit Chitinase ohne Adjuvans immunisiert wurden, konnte nach 48h Restimulation mit Chitinase die mRNA von IL-10 nachgewiesen werden. Bei Milzzellen, die ohne Antigen inkubiert wurden, konnte die mRNA von IL-4 und INF-γ detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse konnte auch bei Milzzellen der zugehörigen Kontrollgruppe gefunden werden. Tiere, die nur PBS/1M Harnstoff verabreicht bekamen, zeigten bei Untersuchungen auf

mRNA-Ebene, daß nach Restimulation mit Chitinase nur IL-10 transkribiert wurde. Dagegen konnte im unstimulierten Ansatz nicht nur IL-10 und sondern auch noch INF-γ nachgewiesen werden. Interleukin 10 konnte nach Restimulation mit Chitinase in der Versuchsgruppe, die mit Chitinase in Kombination mit STP bzw. nur mit STP immunisiert wurden, gefunden werden. Zusätzlich ließ sich ein schwaches Transkript der mRNA von INF-γ bei Milzzellen der STP-Gruppe nachweisen. Ohne Restimulation konnte bei beiden Gruppen die mRNA der Zytokine IL-4, IL-10 und INF-γ nachgewiesen werden, wobei die Transkripte der Milzzellen, die von Chitinase /STP immunisierten Mäusen stammten, stärker waren als die, der zugehörigen Kontrollgruppe STP.

Bei Mäusen, die mit Chitinase /Alum immunisiert wurden, konnten sowohl in den unstimulierten als auch in den mit Chitinase stimulierten Ansätzen Transkripte gleicher Stärke bei allen untersuchten Zytokine gefunden werden. Eine Ausnahme bildete INF-γ, dessen Amplifikat nach Restimulation mit Chitinase deutlich stärker war.

Bei Milzzellen von Mäusen, die nur Alum verabreicht bekamen, ließ sich die mRNA von IL-10 nach Stimulation mit Chitinase nachweisen, während ohne Stimulation neben der mRNA von IL-10 noch die mRNA von INF-γ gefunden werden konnte (Tab.1+2).

Da diese Informationen wenig zusätzliche Informationen lieferten, wurde von der Chitinase/STP bzw. STP-Gruppe Milzzellen untersucht, die nur 8h bzw. 24h mit Chitinase bzw. ohne Antigen stimuliert wurden. Bei diesem Ansatz wurde zusätzlich das Zytokin TNF-α untersucht.

Nach Stimulation mit Chitinase konnte neben der mRNA von IL-4 und IL-10 deutliche Transkripte von INF-γ und TNF-α nachgewiesen werden. Wurde die Zellen ohne Antigen kultiviert, konnten schwache Transkripte von IL-10 und INF-γ, jedoch ähnlich starke Transkripte von TNF-α wie nach Stimulation mit Chitinase gefunden werden. Nahezu identische Ergebnisse erhielt man, wenn man Zellen untersuchte, die von Mäusen stammten, die nur mit STP immunisiert wurden.

Einziger Unterschied zu der Chitinase/STP-Gruppe lag in dem Nachweis von IL-4 mRNA bei Zellen, die ohne Antigen inkubiert wurden (Tab.1+2).

Nach 24h Restimulation mit Chitinase konnte sowohl in der Gruppe, die mit Chitinase/STP als auch in der Gruppe, die nur STP verabreicht bekamen, Transkripte von IL-10, INF-γ und TNF-α nachgewiesen werden. Ohne Restimulation mit Chitinase ließ sich die mRNA von INF-γ in der Chitinase /STP-Gruppe nachweisen, während bei der STP-Gruppe der Nachweis aller untersuchten Zytokine (IL-4, IL-10, INF-γ und TNF-α erfolgreich war (Tab.1+2).

	Chitinase 8 Stunden				Chitinase 24 Stunden				Chitinase 48 Stunden			
	IL-4	IL-10	INF-γ	TNF-α	IL-4	IL-10	INF-γ	TNF-α	IL-4	IL-10	INF-γ	TNF-α
G1 Chitinase									-	++	+	n.d.
G2 PBS/1M Harnstoff									-	++	-	n.d
G3 CtG3Chit/STP	++	++	+++	+++	-	++	++	+++	-	++	-	n.d.
G4 STP	+	++	+++	+++	-	++	++	+++	-	++	+/-	n.d.
G5 Chit/Alum									++	++	++	n.d.
G6 Alum									-	++	-	n.d-

	RPMI 8 Stunden				RPMI 24 Stunden				RPMI 48 Stunden			
	IL-4	IL-10	INF-γ	TNF-α	IL-4	IL-10	INF-γ	TNF-α	IL-4	IL-10	INF-γ	TNF-α
G1 Chitinase									++	-	+++	n.d.
G2 PBS/1M Harnstoff									-	++	+++	n.d.
G3 Chit/STP	-	+	+	+++	-	-	++	n.d.	++	+++	+++	n.d.
G4 STP	+	+	+	+++	++	++	+++	+++	+/-	+	++	n.d.
G5 Chit/Alum									++	++	+++	n.d.
G6 Alum									-	+	++	n.d

Tab.1 und 2.: Ergebnisse der Zytokin-Untersuchungen mittels RT-PCR. Die Intensität der amplifilzierten cDNA jeder Probe wurde mit -, -/+, +, ++, +++, ++++ angegeben. n.d. bedeutet, daß kein Zytokin-Nachweis durchgeführt wurde.

3.6. Charakterisierung von T-Zell-Epitopen innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase

Um die zelluläre Immunantwort gegen Chitinase näher zu charakterisieren, wurden drei verschiedene Algorithmen angewendet, die innerhalb des Proteins T-Zell-Epitope identifizieren. Es wurde der Algorithmus von Rothbard und Taylor, die Vorhersage der
MHC-Bindungs-Motive nach Rammensee und der Algorithmus von Humphreys angewendet. Zusätzlich gewährleisteten überlappende Peptide von 16 AS Länge, die die gesamte Chitinase umspannten (Pepscan), daß möglichst viele T-Zell-Epitope erkannt wurden. Zunächst wurden die vorhergesagten T-Zell-Epitope mit den tatsächlich gefundenen Epitopen aus dem Pepscan verglichen. Durch die Termini Sensitivität und Spezifität wurden die Algorithmen in ihrer Genauigkeit und Zuverlässigkeit beurteilt. Mit diesem Ansatz sollten nicht nur Epitope innerhalb der Chitinase identifiziert werden, sondern Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit dieser Algorithmen auf große Datenbanken gezogen werden. Alle vorhergesagten Epitope wurden synthetisch mit einer Länge von 15 AS, bzw. die vorhergesagten Humphreys-Peptide gemäß der Vorhersage mit 13 AS hergestellt und anschließend in Proliferationsstudien eingesetzt. Dazu wurden Milzzellen von BALB/c-Mäuse verwendet, die 3x mit Chitinase/STP immunisiert wurden.

3.6.1. T-Zell-Epitope nach der Vorhersage von Rothbard und Taylor

Der Algorithmus von Rothbard und Taylor konnte 24 Epitope innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase identifizieren (Abb. 20). Die meisten dieser Epitope befanden sich innerhalb der katalytischen Domäne. Weitere Cluster von Epitopen konnte dieser Algorithmus innerhalb der CBD detektieren. Die vorhergesagten Epitope wurden mit den tatsächlichen T-Zell-Epitopen, die mit Hilfe des Pepscans ermittelt wurden, verglichen. Dieser Algorithmus zeigte eine gut Sensitivität von 0,54, jedoch nur eine geringe Spezifität (0,33) (Abb. 19).

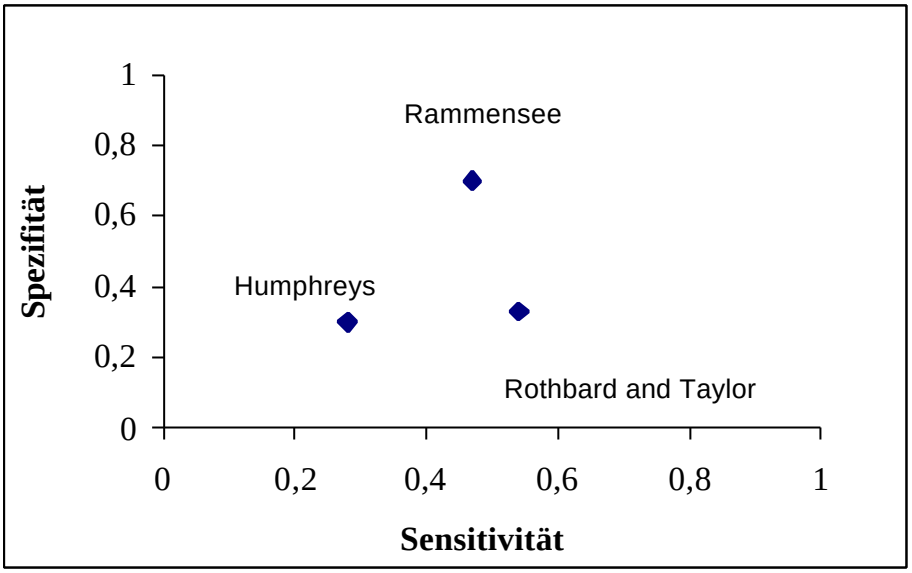


Abb. 19. Sensitivität und Spezifität der T-Zell Algorithmen.

3.6.2. Vorhersage der MHC-Bindungs-Motive nach Rammensee

Mit der Hilfe dieser Vorhersage konnten 10 MHC-Bindungs-Motive für BALB/c Mäuse mit dem genetischen Hintergrund 2H-E^d innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase aufgedeckt werden. Alle diese Epitope befanden sich innerhalb der katalytischen Domäne und beinhalteten mit einer Ausnahme mindestens ein Rothbard und Taylor Motiv (Abb. 19). Der Algorithmus von Rammensee erreichte einen hohen Spezifitäts- (0,7) und einen guten Sensitivitätsindex (0,47). Damit erwies sich diese Vorhersage als zuverlässigste der getesteten Algorithmen.

3.6.3. T-Zell-Epitope nach der Vorhersage von Humphreys

Eine Überprüfung der OvL3-Chitinase mit dem Algorithmus von Humphreys ergab, daß 13 Abschnitte die Anforderungen dieses Algorithmus erfüllen konnten. Dabei befand sich immer mindestens ein Rothbard und Taylor-Motiv innerhalb des Abschnittes. Übereinstimmende Epitope wurden zudem mit der Vorhersage der MHC-Bindungs-Motive nach Rammensee gefunden (Abb. 20). Dieser Algorithmus konnte jedoch nur eine Sensitivität von 0,28 und eine Spezifität von 0,3 erreichen.

3.6.4. Kombination der Algorithmen

Wurden alle Algorithmen auf die OvL3-Chitinase angewendet, so konnte der Sensitivitätsindex auf 0,67 erhöht werden. Jedoch sank durch die große Anzahl der vorhergesagten Epitope der Spezifitätsindex auf 0,21. Wurden nur zwei Algorithmen kombiniert, so konnte bei der Anwendung des Algorithmus von Rothbard und Taylor und der Vorhersage der MHC-Bindungs-Motive nach Rammensee die besten Ergebnisse erzielt werden. Die Sensitivität blieb bei 0,67, während sich der Spezifitätdindex auf 0,33 erhöhte.

```
                    signalsequence                                  ***
  1  EVDNNFCKVM RIGAMLIPFI ILGNAIIAYG YVRGCYYTNW AQYRQGEGKF
                                                  ************
     **********                                  *****************
 51  LPEDIPKGLC THILYAFAKV DQSGTSLPFE WNDEDTNWSK GMYSRVTKLK
     **
     **********
101  ENDPEMKILL SYGGYNFGSS TFTAIRNRAE KRKHFIKSAI AFLRKNKFDG

151  FDFDWEYPIG MAQEYAKLVN EMKVAFVEEA KKSDSEQLLL TAAVSAGKHT
                                          **************
                                     **************
201  IDQSYNVQSL GENFDLLSLM SYDFHGSWEM NVDLHAKLHP TKGETSGTGI
       **************   ***************
251  FNTEFAANYW LSKGMPKQKI IIGIPTYGRG WTLRDSSKTT IGAEGISPSS
          ***************                                  *
301  PSTTNPAGGT AAYWEICKYL KEGGKETIDE QGVGACMVQG SQWYGYDNEE
     *************
351  TIRMKMRWLK EKGYGGAFIW TLDFDDFGT SCGEGPYPLL SAINHELKGE
                                     ****************
401  ATATTRSLRT TITQSSTIGS TKFETTTTAS EITKNNKIKT TTIAVEPTGE
          ***************************
451  SSDIKCPESF GLFRHPNDCH LFIHCAHDHP YVKLCPPNTF FNDKIKVCDH

501  FGECDE
```

Abb. 20: AS-Sequenz der O. volvulus-L3-Chitinase. Die vorhergesagten T-Zell-Epitope sind in die Sequenz eingetragen. Die Bereiche, die von dem Algorithmus nach Rothbard und Taylor vorhergesagt wurden, sind unterstrichen, während die Abschnitte der Rammensee-Vorhersage oberhalb der Sequenz eingetragen wurden. Mit Sternen oberhalb der Sequenz wurde die Vorhersage nach Humphreys gekennzeichnet. Mit einem hellgrauen Kasten versehen sind die T-Zell-Abschnitte, die von allen Algorithmen detektiert wurden, während das aktive Zentrum grau unterlegt wurde. Zusätzlich wurden die Signalsequenz und die Chitin-Binde-Domäne (CBD) eingezeichnet.

Lokalisation der vorhergesagten Epitope innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase

2a.	*Lokalisation AS*	*Rothbard und Taylor-Peptide*	*Korrespondierende Pepscan-Peptide*	Reaktivität im T-Zell-Tests	*Reaktivität im Pepscan-Tests*
	28-43	1. AYGYVRGCYYTNWAQY	4-7	++	-
	45-58	2.RQGEGKFLPEDIPKG	8-10	++	++
	53-67	3. EDIPKGLCTHILYAF	11-13	++	-
	85-99	4. DTNWSKGMYSRVTKL	19-21	-	-
	102-116	5. NDPEMKILLSYGGYN	23-25	++	++
	128-143	6. RAEKRKHFIKSAIAFL	29-31	+++	+
	193-207	7. AVSAGKHTIDQSYNV	46/47	-	+
	231-245	8. NVDLHAKLHPTKGETS	55-57	+++	++
	258-272	9. NYWLSKGMPKQKIII	62-64	++	++
	263-278	10. GMPKQKIIIGIPTYG	63-65	+	+++
	275-289	11. PTYGRGWTLRDSSKT	66-68	-	-
	284-297	12. LRDSSKTTIGAEGIS	68-70	-	-
	304-317	13. TNPAGGTAAYWEICK	73-75	+	-
	313-327	14. YWEICKYLKEGGKET	76-78	++	++
	327-341	15. TIDEQGVGACMVQGS	79-81	+++	-
	247-362	16. NEETIRMKMRWLKEK	84-86	+++	+++
	352-366	17. IRMKMRWLKEKGYGG	85-87	++	+
	357-371	18. RWLKEKGYGGAFIWT	87-89	+	+
	361-375	19. EKGYGGAFIWTLDFD	88-90	++	++
	404-428	20. TTRSLRTTITQSSTI	98-100	+	-
	432-446	21. ITKNNKIKTTTIAVE	105-107	+/	-
	465-479	22. HPNDCHLFIHCAHDH	114-116	+/-	-
	468-473	23. CHLFIHCAHDHPYVK	114-116	+/-	-
	478-503	24. TFFNDKIKVCDHFGE	119-122	-	-

2b.	*Lokalisation AS*	*Rammensee-Peptide*	*Korrespon-dierende Pepscan-Peptide*	*Reaktivität im T-Zell-Tests*	*Reaktivität im Pepscan-Tests*
	47-61	1. EGKFLPEDIPKGLCT	9/10	-	-
	122-146	2.FTAIRNRAEKRKHFI	29	++	+
	134-148	3. HFIKSAIAFLRKNKF	32	-	++
	171-185	4.EMKVAFVEEAKKSDS	39/41	++	++
	231-245	5. NVDLHAKLHPTKGET	56	++	++
	257-273	6. ANYWLSKGMPKQKII	62	-	-
	256-260	7. AANYWLSKGMPKQKI	62	++	+
	278-292	8.GRGWTLRDSSKTTIG	68	++	-
	310-334	9. TAAYWEICKYLKEGG	76	-	-
	349-363	10. EETIRMKMRWLKEKG	86	++	++

2c.	*Lokalisation AS*	*Humphreys-Peptide*	*Korrespondierende Pepscan-Peptide*	*Reaktivät im T-Zell-Tests*	*Reaktivität im Pepscan-Tests*
	47-60	1. GKFLPEDIPKGLC	8-10	-	++
	85-97	2. DTNWSKGMYSRVT	18-20	++	-
	89-103	3. KGMYSRVTKLKEN	19-21	-	-
	97-110	4. KLKENDPEMKILL	22-23	+	++
	227-240	5. WEMNVDLHAKLHP	54-56	-	++
	233-245	6. DLHAKLHPTKGET	56-57	+	++
	253-265	7. TEFAANYWLSKGM	61-62	+++	-
	268-281	8. KIIIGIPTYGRGW	64-65	++	++
	311-323	9. AAYWEICKYLKEG	75-77	++	-
	350-362	10. ETIRMKMRWLKEK	84-86	+++	++
	429-441	11. ASEITKNNKIKTT	104-106	++	-
	460-472	12. FGLFRHPNDCHLF	112-114	++	-
	471-483	13. LFIHCAHDHPYVK	114-116	++	-

Tab 2a-c. Übersicht über die vorhergesagten T-Zell-Epitope. Aufgeführt sind die Lokalisation der Epitope, die entsprechenden korrespondierenden Pepscan-Peptide, die T-Zell-Reaktivität der Peptide und die Reaktivität der korrespondierenden Pepscan-Peptide in Proliferationsstudien.

3.6.5. Vergleich der vorhergesagten T-Zell-Epitope

Vergleicht man die vorhergesagten Epitope der Algorithmen, so konnten 5 Bereiche von alle Vorhersagen als vermutliche T-Zell-Epitope identifiziert werden. Das erste Epitop befand sich in der katalytischen Domäne an Position bp 47-61. Während der Algorithmus von Rothbard und Taylor zwei nicht zusammen hängende Abschnitte innerhalb des Bereiches erkannte, konnte der gesamte Abschnitt konnte sowohl von der Vorhersage nach Rammensee als auch von dem Humphreys-Algorithmus als T-Zell-Epitop detektiert werden. An Position bp 231-245 war das zweite gemeinsame Epitop lokalisiert. Dieser Abschnitt entsprach den Anforderungen des Algorithmus nach Rothbard und Taylor und den MHC-II-Bindungs-Motiven nach Rammensee. Der Algorithmus nach Humphreys hingegen identifizierte zwei Sequenzabschnitte, die sich um acht AS überlappen (bp 227-240/233-245), aber insgesamt der Vorhersage der MHC-Bindungs-Motiven nach Rammensee entsprachen.

Das nächste Epitop befand sich an Position bp 257-273. Sowohl die Vorhersage von Rothbard und Taylor konnte diesen Abschnitt als vermutliches T-Zell Epitop identifizieren (bp 258-272), als auch die Vorhersage nach Rammensee. Der Algorithmus von Humphreys sagte zwei vermutliche T-Zell-

Epitope in diesem Abschnitt voraus (bp 253-265 und bp 268-281).

Im vierten Abschnitt lokalisierte der Algorithmus von Rothbard und Taylor zwei nicht zusammenhängende Bereiche. Einer befand sich am Anfang der Region (bp 304-317), während das zweite Epitop in der Mitte dieser Region lokalisiert war (bp 313-327). Der gesamte Abschnitt entsprach sowohl den Anforderungen des Algorithmus von Rammensee- als auch von Humphreys (bp 310-334/311-323).

An Position bp 349-363 konnte das letzte übereinstimmende Epitop gefunden werden. Hier ergab die Analyse der *O. volvulus*-L3-Chitinase Sequenz mit dem Algorithmus von Rothbard und Taylor vier Epitope, die aneinander angrenzten. Die Vorhersage von Rammensee und Humphreys konnte den gesamten Abschnitt als T-Zell Epitop identifizieren.

Durch die Anwendung der drei Algorithmen konnten eine Vielzahl vermutlicher T-Zell-Epitope identifiziert werden. Um die Zuverlässigkeit und die Korrektheit der einzelnen Algorithmen zu überprüfen, wurden die vorhergesagten T-Zell-Epitope als synthetische Peptide hergestellt und in T-Zell-Proliferationstests eingesetzt. Zusätzlich sollte getestet werden, ob eine Kombination der Vorhersagen eine höhere Trefferwahrscheinlichkeit besitzt.

3.7. Einsatz der vorhergesagten Epitope in T-Zell-Proliferationstests

3.7.1. T-Zell-Proliferationstests mit Rothbard und Taylor-Peptiden

Der Algorithmus von Rothbard und Taylor identifizierte 24 Abschnitte innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase. Die vorhergesagten Bereiche wurden auf 15 AS entsprechend der Sequenz gleichmäßig nach beiden Seiten erweitert und als synthetische Peptide hergestellt. Diese Peptide wurden in T-Zell-Tests eingesetzt, bei denen Milzzellen von BALB/c-Mäusen verwendet wurden, die zuvor mit rekombinanter *O. volvulus*-L3-Chitinase (in Kombination mit STP) immunisiert wurden.

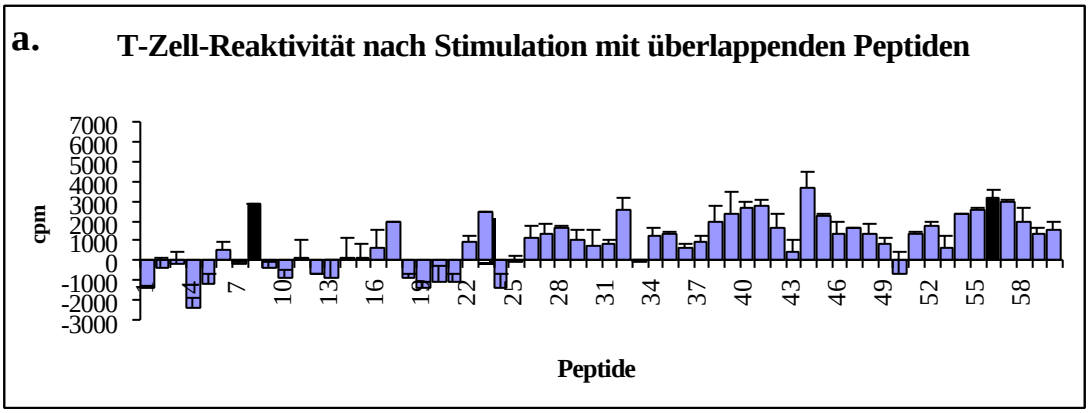
Abbildungen 21 und 22b zeigen ein repräsentatives Experiment (von 4 Experimenten) der T-Zell-Antworten von immunisierten Mäusen gegen Rothbard und Taylor-Peptide. Drei Peptide waren in der Lage, Milzzellen zu stimulieren und Werte von mehr als 2000cpm (2000-3000cpm) hervorzurufen. Während Milzzellen gegen elf weitere Peptide mit Proliferationswerten von 1000-1500cpm reagierten, konnten die restlichen Peptide Milzzellen nicht zur Proliferation anregen.

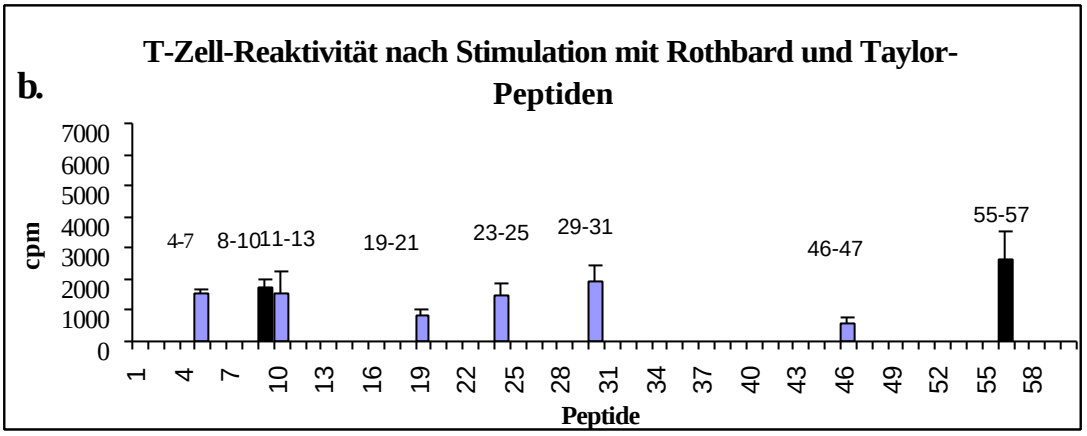
3.7.2. T-Zell-Proliferationstests mit Rammensee-Peptiden

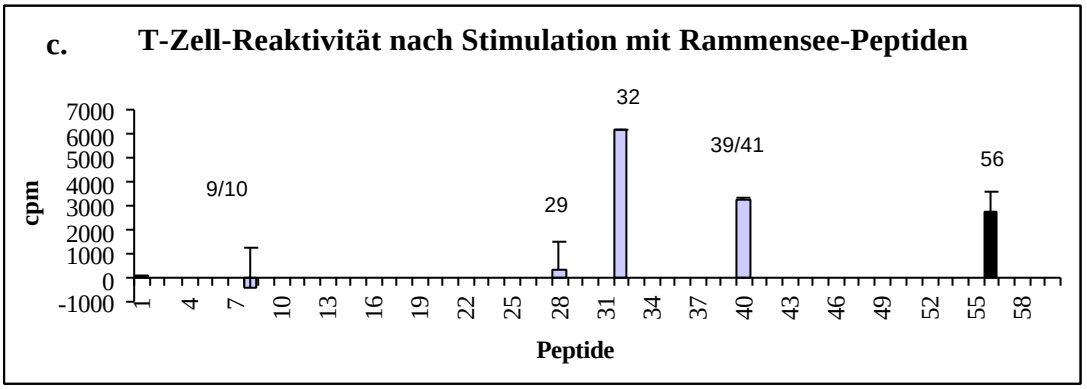
Die Vorhersage der MHC-Bindungs-Motive von Rammensee sagte für die *O. volvulus*-L3-Chitinase bei BALB/c-Mäusen mit dem genetischen Hintergrund H2-E^d 10 T-Zell-Epitope vorher. Wurden die vorhergesagten Bereiche als synthetische Peptide mit 15 AS Länge in T-Zell-Tests eingesetzt, konnten zwei Peptide Milzzellen zur Stimulation mit Proliferationswerten zwischen 1500 und 2000cpm anregen. Während vier Peptide auf Milzzellen keinerlei Einfluß hatten, reagierten vier weitere Peptide mit mehr als 3000cpm (3000-6600cpm) (in Abb. 21 und 22c ist ein repräsentatives Experiment von 4 Experimenten dargestellt).

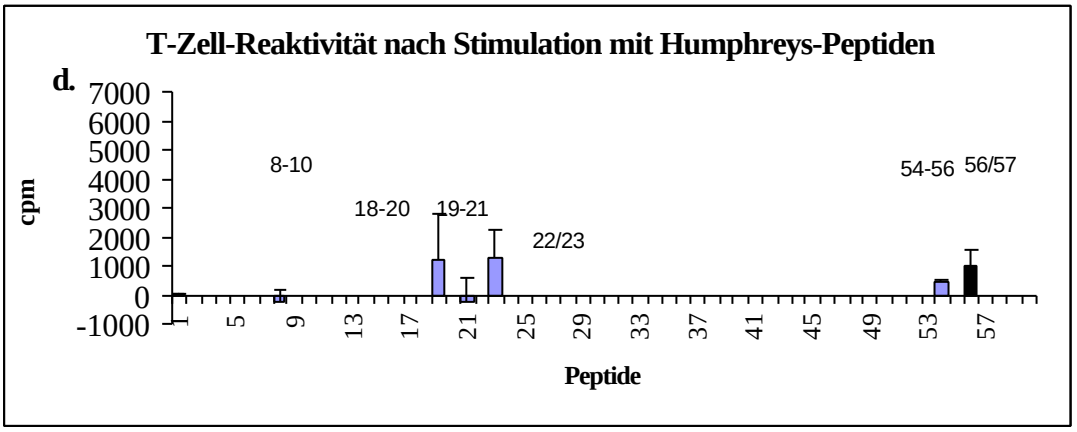
3.7.3. T-Zell-Proliferationstests mit Humphreys-Peptiden

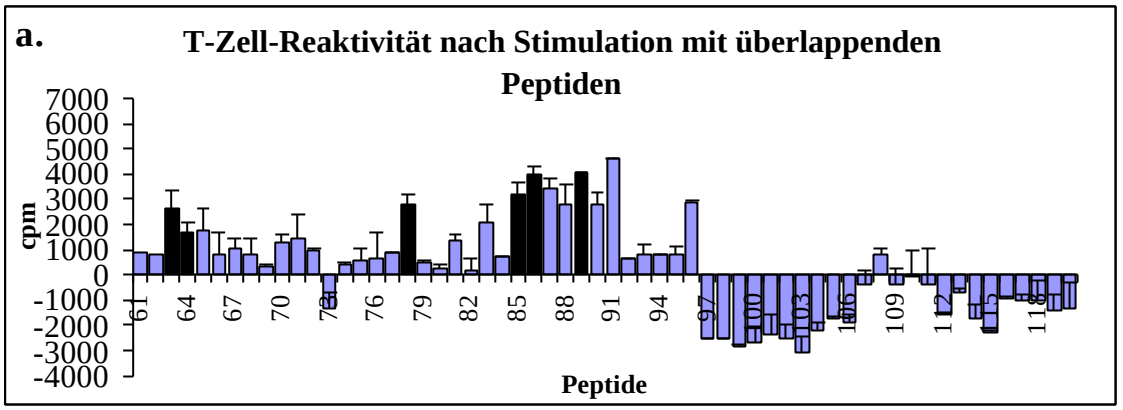
Die Vorhersage nach Humphreys konnte 13 Epitope innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase lokalisieren. Diese Peptide wurden gemäß der Vorhersage mit einer Länge von 13 AS synthetisch hergestellt. Während vier Peptide in der Lage waren, Milzzellen zur Proliferation mit Werten zwischen 1000 und 1500cpm anzuregen, konnten 5 weitere Pepitde Milzzellen zu Proliferationswerten von 2000-6000cpm anregen. Die restlichen vier Peptide riefen keine Reaktion bei den T-Zellen hervor (in Abb. 21 und 22d ist ein repräsentatives Experiment von 5 weiteren Experimenten dargestellt).

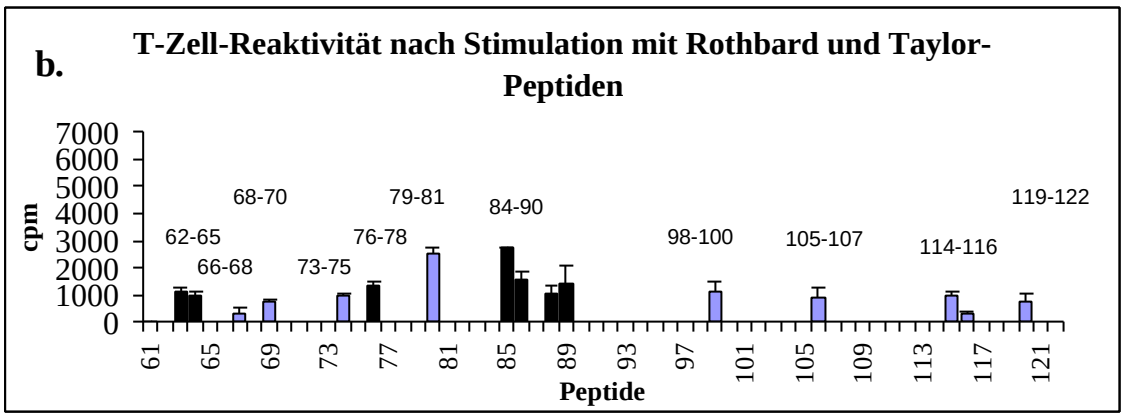

a.
T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit überlappenden Peptiden
cpm
Peptide

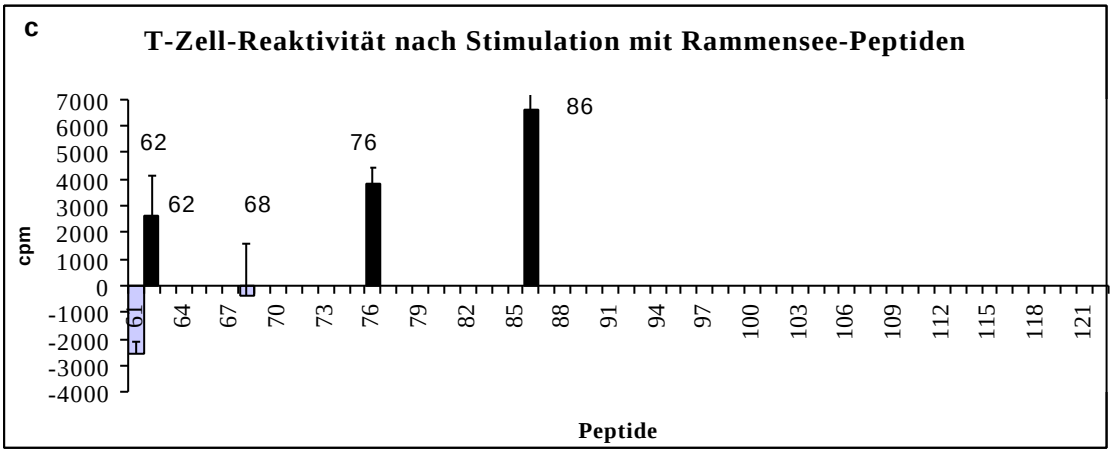

b.
T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit Rothbard und Taylor-Peptiden
cpm
4-7
8-10
11-13
19-21
23-25
29-31
46-47
55-57
Peptide


c.
T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit Rammensee-Peptiden
cpm
9/10
29
32
39/41
56
Peptide


T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit Humphreys-Peptiden
d.
cpm
8-10
18-20
19-21
22/23
54-56
56/57
Peptide


a.
T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit überlappenden Peptiden
cpm
Peptide


b.
T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit Rothbard und Taylor-Peptiden
cpm
62-65
66-68
68-70
73-75
76-78
79-81
84-90
98-100
105-107
114-116
119-122
Peptide


c
T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit Rammensee-Peptiden
cpm
62
62
68
76
86
Peptide

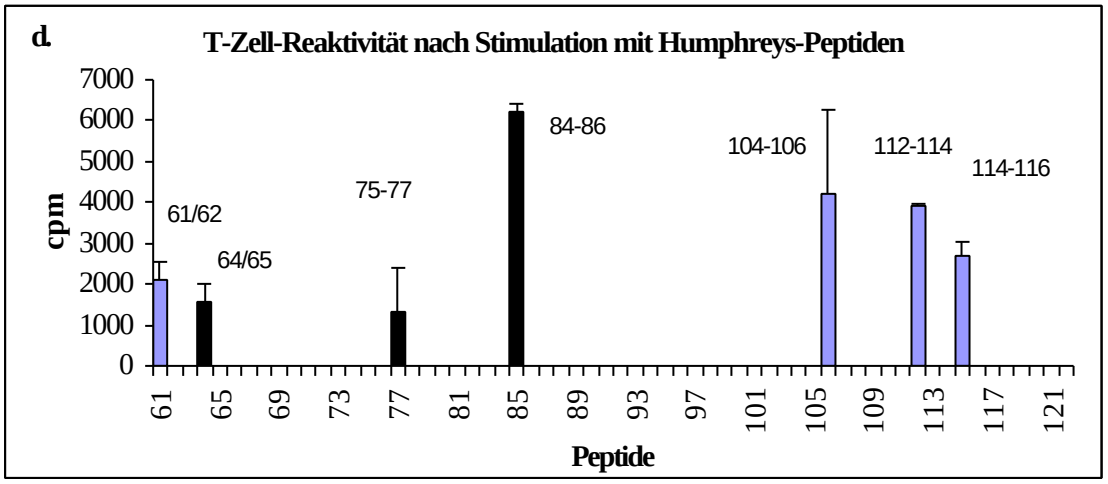

d.
T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit Humphreys-Peptiden
cpm
61/62
64/65
75-77
84-86
104-106
112-114
114-116
Peptide

Abb.21a-d und 22 a-d: T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit den verschiedenen Peptiden. Dargestellt sind die netto cpm nach Abzug der spontanen Proliferation (RPMI) und die Standardabweichung. Mit dunklen Balken sind die Peptide dargestellt, die von allen Algorithmen vorhergesagt wurden.

3.7.4. Proliferationstests mit überlappenden Peptiden der *O. volvulus*-L3-Chitinase (Pepscan)

Ein Set von 122 überlappenden 16mer Peptiden, die sich jeweils um 12 AS überschnitten und die gesamte Chitinase umspannten, wurden synthetisch hergestellt. Durch die unterschiedliche Länge der Pepscan-Peptide und der Peptide der Vorhersagen variierten die flankierenden Bereiche um die antigene Kern-Determinante, so daß keine identischen Peptide in diesen Experimenten verwendet wurden. Die Pepscan-Peptide wurden in T-Zell-Tests eingesetzt, bei denen Milzzellen von mit OvL3-Chitinase/STP immunisierten Mäusen verwendet wurden (dargestellt ist in Abb. 21a und 22a ein repräsentatives Experiment von 7 weiteren Experimenten).

In dieser Arbeit wurde die OvL3-Chitinase ohne Signalsequenz kloniert, aufgereinigt und in Immunisierungsstudien eingesetzt, um die Expression in *E. coli* zu erleichtern. Deshalb konnte die am N-Terminus befindliche Signalsequenz von Milzzellen immunisierter Tiere nicht erkannt werden und reagierten nach Stimulation mit den Pepscan-Peptiden nicht mit Proliferation. An diesen Abschnitt schloß sich die katalytische Domäne an. Im vorderen Teil dieser Domäne konnte das Pepscan-Peptid 8 Milzzellen zur Proliferation von 2839cpm anregen (Abb. 21a). In diesem Bereich konnten alle drei Algorithmen T-Zell-Epitope identifizieren. Nur die Rothbard und Taylor-Peptide (8-10) stimulierten Milzzellen zwischen 1300 und 1700cpm (Abb. 21b und 21c), während die Peptide der anderen Vorhersagen keine Reaktion bei Milzzellen hervorriefen. Eine deutliche T-Zell Antwort konnte das Peptid 17 hervorrufen. Hier konnten Proliferationswerte von 1700cpm gemessen werden. Weder der Algorithmus von Rothbard und Taylor noch von Rammensee oder Humphreys konnten in diesem Abschnitt ein Epitop detektieren.

Das nächste Peptid, das in der Lage war, Milzzellen zur Proliferation anzuregen, war Peptid 23. Nach Stimulation mit diesem Peptid konnte in T-Zell-Tests Werte von 2484cpm gemessen werden. Dieses Epitop konnte nur von der Vorhersage von Rothbard und Taylor und von Humphreys identifiziert werden. Dabei erzielte das Rothbard und Taylor-Peptid mit 1465cpm ähnliche Ergebnissen wie das Humphreys-Peptid (1308cpm). Die Stimulation mit den Pepscan-Peptiden 28/29 konnte Milzzellen zur Proliferation mit 1000-1600cpm anregen (Abb. 21a). Während die Vorhersage nach Rothbard und Taylor und nach Rammensee dieses Epitop vorhersagte, entsprach dieser Bereich nicht den Anforderungen der Vorhersage nach Humphreys. Dabei erzielte der Einsatz der synthetischen Rothbard und Taylor-Peptide in T-Zell-Tests ähnliche Proliferationswerte wie die Pepscan-Peptide,

während das Rammensee-Peptid keinen Einfluß auf die Milzzellen hatte (Abb. 21b und 21c).
Wurden Milzzellen mit dem Pepscan-Peptid 32 inkubiert, konnte eine T-Zell Proliferation mit 2500cpm detektiert werden. Dieses T-Zell Epitop wurde nur von dem Algorithmus nach Rammensee vorhergesagt und es konnten Proliferationswerte von >3000cpm nach Stimulation mit dem Peptid erzielt werden. Der Bereich der überlappenden Peptide 38-48 stimulierte T-Zellen mit 1300cpm bis zu 3600cpm. In diesem Bereich detektierte der Algorithmus von Rothbard und Taylor und von Rammensee T-Zell-Epitope, während die Vorhersage nach Humphreys keine T-Zell stimulierenden Bereiche identifizierte. Nach Stimulation mit dem synthetischen Rothbard und Taylor-Peptid konnte keine Proliferation gemessen werden. Der Einsatz des Rammensee-Peptid (39/41) erzielte hingegen ähnliche Ergebnisse wie die korrespondierenden Pepscan-Peptide.
Die nächsten Peptide, die eine verstärkte T-Zell Reaktion hervorrufen konnten, waren die Peptide 54-58. Alle drei Algorithmen sagten hier T-Zell-Epitope vorher. Dabei wurden die stärksten T-Zell Reaktionen von 3200cpm nach Stimulation mit dem Pepscan-Peptid 56 gefunden. Während die entsprechenden Rothbard und Taylor- und Rammensee-Peptide vergleichbare Ergebnisse erzielten, konnte das Humphreys-Peptid Milzzellen nicht zur Prolifreation anregen (Abb. 21a-d).
Nach Stimulation mit den Pepscan-Peptide 63/64 reagierten Milzzellen mit Werten zwischen 1700 und 2700cpm. In diesem Abschnitt wurde von allen Algorithmen T-Zell-Epitope vermutet. Während die synthetischen Rothbard und Taylor- und Humphreys-Peptide nur Proliferationswerte zwischen 1000cpm und 1500cpm erzielten, riefen die vorhergesagten Rammensee-Peptide (61/62 und 62) unterschiedliche Reaktionen hervor (Abb. 21b-d). Milzzellen waren nicht in der Lage nach Restimulation mit den Rammensee-Peptiden 61/62 zu reagieren, jedoch zeigte die Stimulation mit Peptid 62 Proliferationswerte von 2600cpm.
Nach Stimulation mit den Pepscan-Peptiden 77 und 78 konnten Proliferationswerte von 2800cpm gemessen werden. Obwohl alle Algorithmen in diesem Bereich T-Zell stimulierenden Determinanten vorhersagten, reagierten Milzzellen nach Stimulation mit den synthetischen Peptiden sehr schwach. Während die Rothbard und Taylor-Peptide und die Humphreys-Peptide Milzzellen zur Proliferation von 1300cpm anregen konnten (Abb. 22b), wurde nach Einsatz der entsprechenden Rammensee-Peptide Werte von >3000cpm gemessen (Abb. 22c und 22d). Am C-Terminus der katalytischen Domäne waren die Pepscan-Peptide 85 bis 91 in der Lage, Milzzellen zur Proliferation mit Werten von 2700-4600cpm anzuregen. Dieser Abschnitt konnte die Anforderungen aller Algorithmen erfüllen. Die synthetisch hergestellten Peptide gemäß der Vorhersagen von Rothbard und Taylor, Rammensee und Humphreys erzielten in T-Zell-Tests vergleichbare Ergebnisse wie die Pepscan-Peptide (Abb. 22b-d). Peptide des Pepscans, die die C-terminale Chitin-Binde-Domäne umfaßten, konnten Milzzellen zu keiner Proliferation anregen. Innerhalb dieses Abschnittes sagten die Algorithmen von Rothbard und

Taylor und von Humphreys T-Zell-Epitope voraus, während Rammensee keine MHC-Bindungs-Motive finden konnte.

Rothbard und Taylor vermutete in diesem Abschnitt fünf T-Zell-Epitope, jedoch konnte kein Peptid T-Zell-Antworten über 1000cpm erzielen. Dem gegenüber stehen die Epitope, die von der Vorhersage von Humphreys vorhergesagt wurden (Peptide 104-106 und 112-114 und 114-116). Diese Peptide riefen T-Zell-Antworten zwischen 2500cpm und 3200cpm hervor.

Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die vorhergesagten Epitope sind mit Lokalisation und T-Zell-Reaktivität aufgelistet. Zudem sind die Ergebnisse des Pepscan in die Tabelle integriert. So ist es möglich, die theoretische Vorhersage der Algorithmen und die tatsächliche Reaktivität der einzelnen Epitope zu vergleichen.

75% Prozent der vorhergesagten Rothbard und Taylor-Peptide waren in der Lage, Milzzellen zu stimulieren. Jedoch nur 50% korrespondierender Pepscan Peptide konnten vergleichbare Resultate erzielen. Die MHC-Bindungs-Motive nach Rammensee sagten 10 vermutliche T-Zell-Epitope voraus, von denen 50% in der Lage waren, Milzzellen von immunisierten Mäusen zu stimulieren. Im Pepscan hingegen zeigten 60% der entsprechenden Peptide deutliche Reaktivität.

Nach Inkubation mit vorhergesagten Humphreys Peptiden konnten Milzzellen auf 77% der insgesamt 13 Peptide reagieren. Nur 46% dieser reaktiven Peptide konnten im Pepscan nachgewiesen werden.

Lokalisation der reaktiven Pepscan-Peptide	Reaktivität der Pepscan-Peptide im T-Zell-Test	T-Zell-Epitope nach Rothbard und Taylor	Reaktivität der Peptide im T-Zell-Test	T-Zell-Epitope nach Rammensee	Reaktivität der Peptide im T-Zell-Test	T-Zell-Epitope nach Humphreys	Reaktivität der Peptide im T-Zell-Test
	-	4-7	++	-	-	-	-
8	**+++**	**8-10**	**++**	**9-10**	**-**	**8-10**	**-**
	-	11-13	++	-	-	-	-
17	++	-	-	-	-	-	-
	-	19-21	-	-	-	18-20 19-21	+ -
23	+++	23-25	+	-	-	22-23	+
28/29	+	29-31	++	29	-	-	-
32	+++	-		32	++++	-	
38-48	+/++++	46/47	-	39-41	++++	-	-
54-58	**++++**	**55-57**	**+++**	**56**	**+++**	**54-56** **56/57**	**-** **-**
63/64	**++/+++**	**62-64** **63-65**	**+** **+**	**61/62** **62**	**-** **++**	**61/62** **64/65**	**+++** **++**
	+/-	66-68 68-70	- -	68	-	-	-
	+/-	73-75	-	-	-	-	-
77/78	**+++**	**76-78**	**+**	**76**	**++++**	**75-77**	**+**
	+/-	79-81	+++	-	-	-	-
85/91	**++++/++++**	**84-86** **85-87** **87-89** **88-90**	**+++** **++** **+** **++**	**85/86**	**++++**	**84-86**	**++++**
	-	98-100	-	-	-	-	-
	-	105-107	-	-	-	104-106	++++
	-	114-116 (2x)	-	-	-	112-114; 114-116	++++ ++++
	-	119-122	-	-	-	-	-

Tab. 3. T-Zell-Reaktivität der vorhergesagten T-Zell-Epitope im Vergleich mit dem Pepscan. In der ersten Spalte sind die Peptide aufgeführt, die von Rothbard und Taylor identifiziert wurden. In der zweiten Spalte ist die T-Zell-Reaktivität der vorhergesagten Peptide dargestellt und die Stärke der Reaktion mit + (≥ 1000cpm), ++ (≥ 1500cpm), +++ (≥ 2000cpm) oder ++++ (≥ 3000cpm) beurteilt. In der nächsten Spalte befinden sich die vorhergesagten Rammensee-Peptide, gefolgt von der Spalte mit der Reaktivität der Peptide in T-Zell-Tests. Die nächsten zwei Spalten enthalten die vorhergesagten Epitope nach Humphreys und ihre Reaktivität im Proliferationsassays. In der letzten Spalte ist die Bestätigung der vorhergesagten Epitope durch die korrespondierenden Pepscan-Peptide dargestellt.

3.8. Einsatz der rekombinanten Proteine und Peptide in Feldstudien in Kamerun

3.8.1. Parasitologische Untersuchungen des Patientenkollektives

Alle Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden, wurden mit Alter, Geschlecht, Name, Herkunft und Krankengeschichte erfaßt. Um den Infektionsstatus der Patienten zu ermitteln, wurden Hautbiopsien und Serum von den Patienten gewonnen. Eine Stuhluntersuchung und ein Blutausstrich diente dazu, eventuelle parasitäre Begleitinfektionen zu detektieren.

In die Studie wurden 49 männliche und 12 weibliche Personen aufgenommen. Das durchschnittliche Alter lag bei 31 Jahren. Bei 33% der Patienten konnte intestitale Parasiten wie *Ascaris lumbricuides*, *Trichuris trichuris*, *Gardia lamblia*, *Enterobius vermicularis* oder Entamöba spp. detektiert werden. 90% der untersuchten Patienten wiesen eine starke Eosinophilie (5-37% Eosinophile) im Blutausstrich auf. Die endemische Kontrollgruppe bestand aus 19 Personen, die alle aus der Hauptstadt Yaoundé stammten und in Durchschnitt 23 Jahren alt waren. In dieser Gruppe konnten nur bei zwei Individuen parasitäre Begleitinfektionen und eine leicht erhöhte Eosinophilie nachgewiesen werden (Tab. 4).

Bei 49 Patienten konnten Mikrofilarien mittels Hautbiopsien nachgewiesen werden. Dabei lag die mittlere Mikrofilarienlast pro mg Haut bei 26 (0,1-174 Mf/mg). Da die Proben erst nachträglich in Berlin gewogen werden konnten, muß bei den Ergebnissen durch Transport und Austrocknung mit Schwankungen gerechnet werden.

	Onchozerkose-Patienten n=61	Endemische Kontrollpersonen n=19
Alter in Jahren	31	23
Mf-Last	26Mf/mg	-
IgG-/IgG_4-Antikörper gegen OvAg	100%/46%	-
IgG-/IgG_4-Antikörper gegen Chitinase	61%/77%	-
IgG-/IgG_4-Antikörper gegen CBD	43%/20%	-
Onchozerkome	71%	-
Eosinophilie	90% mit durchschnittlich 14 Eosinophilen	-
Intestinale Begleiterkrankungen	*Ascaris lumbricuides* 8% *Trichuris trichuris* 16% *Entamöba spp.* 36% *Gardia lamblia* 10% *Enterobius vermicularis* 7%	

Tab 4: Übersicht der durchschnittlichen Werte der Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden. Alter, Mf-Last, Antikörperantworten, Onchozerkome, parasitäre Begleiterkrankungen sind in der Tabelle aufgeführt.

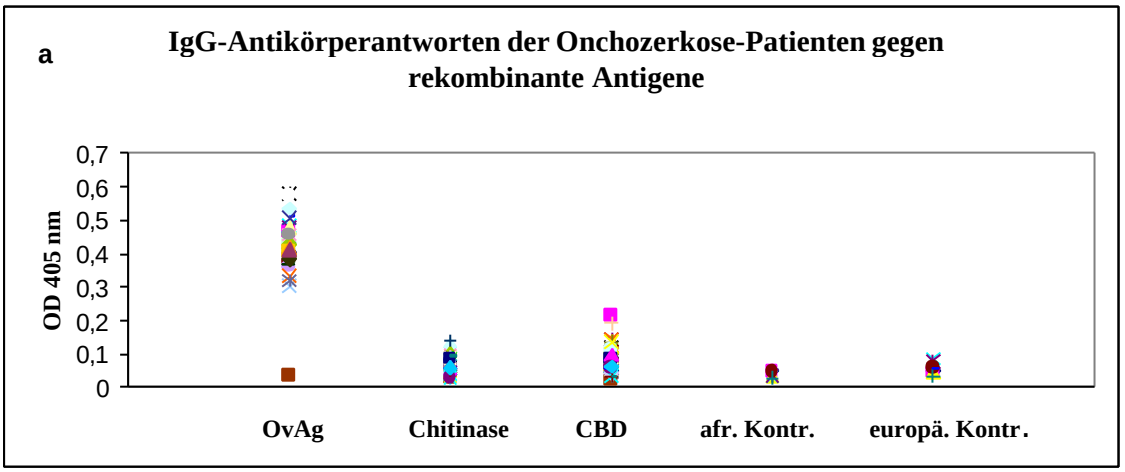
3.8.2 Antikörperantworten der Onchozerkose-Patienten

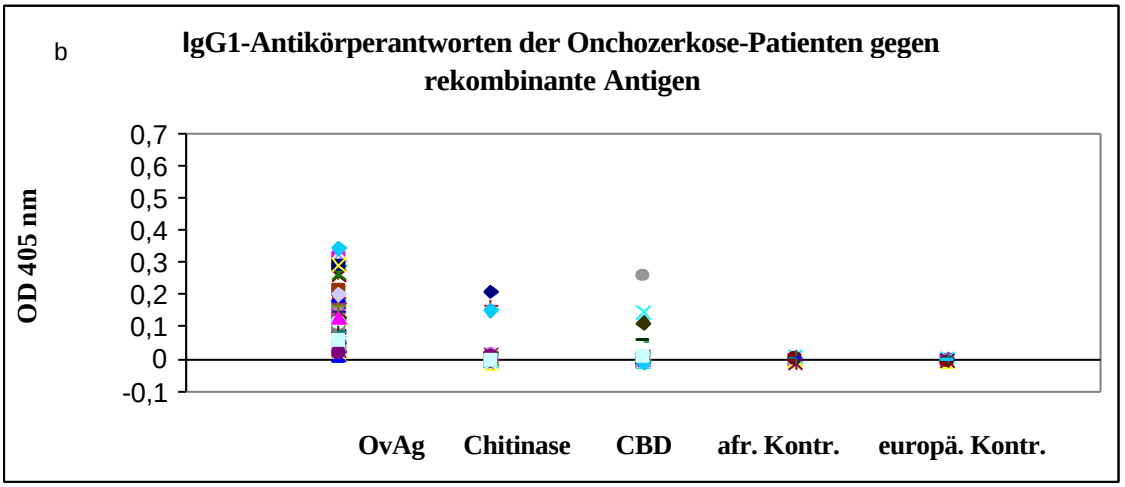
Untersucht wurden die Antikörperantworten auf *O. volvulus* Gesamtantigen (OvAg), *O. volvulus*-L3-Chitinase und der Chitin-Binde-Domäne. Im Gegensatz zu der afrikanischen Kontrollgruppe konnten bei allen Patienten IgG-Antikörper gegen OvAg detektiert werden (OD_{405} = 0,38). Ähnliche Werte erzielte auch die Messung der IgG_4-Antikörper (OD_{405} = 0,40), die jedoch nur bei 28 von 61 Patienten im Serum gefunden werden konnten. Auf die rekombinante Chitinase zeigten 37 Patienten IgG-Antikörper, während sich im Serum von 48 Patienten IgG_4-Antikörper gegen Chitinase befanden. Bei 26 Patienten konnten IgG-Antikörper gegen die OvL3-CBD nachgewiesen werden, jedoch enthielten nur 12 Seren Antikörper der Klasse IgG_4 (Abb. 23).

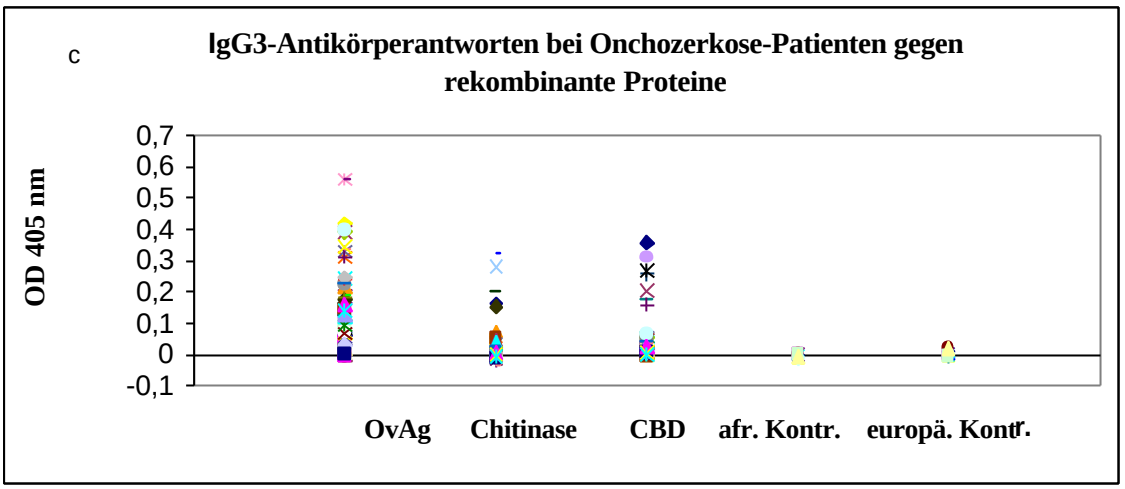
Auffällig war ein Serum in der Kontrollgruppe, das sowohl Antikörper gegen OvAg als auch gegen OvL3-Chitinase und OvL3-CBD enthielt. Auf Grund dieser Daten wurde das Serum aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen.

OD $_{405}$	IgG_{gesamt}	IgG_4	IgG_3	IgG_1
OvAg	0,395	0,409	0,157	0,129
OvL3-Chit	0,061	0,053	0,026	0,004
OvL3-CBD	0,084	0,030	0,048	0,007

Tab. 5: Mittelwerte der Antikörperantworten der Onchozerkose-Patienten gegen Gesamtantigen (OvAg), rekombinante Chitinase (OvL3-Chit) und Chitin-Binde-Domäne (OvL3-CBD). Als positiv wurden Seren gewertet, die über den Mittelwert ± 2s Bereich der afrikanischen Kontrollgruppe lagen.







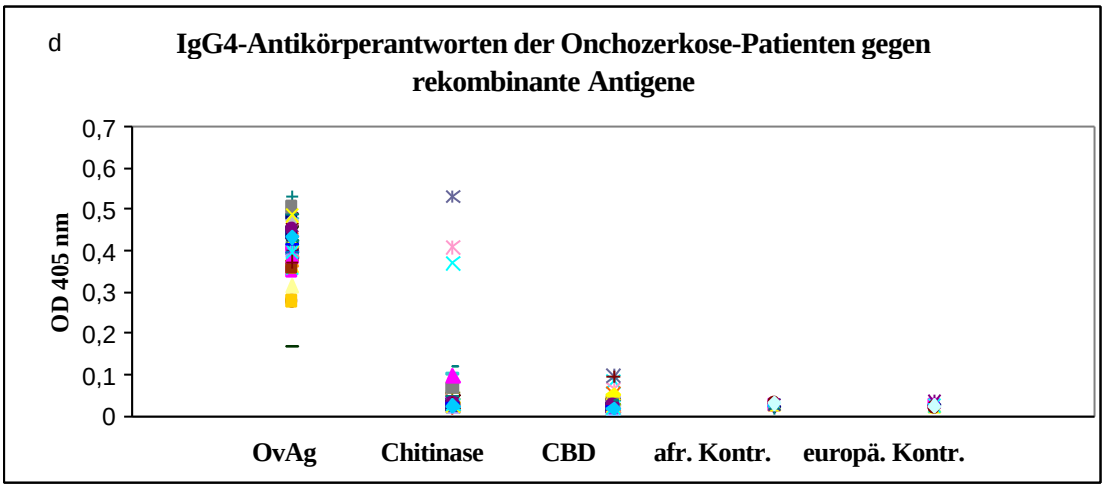


Abb. 23 a-d: Antikörperantworten der Onchozerkose Patienten (n=61) gegen Gesamtantigen (OvAg), Chitinase und CBD. Dargestellt sind die Einzelwerte der Antikörper IgG, IgG1, IgG3 und IgG4

3.8.3. T-Zell-Reaktivität der Patienten gegen rekombinante Proteine und synthetische Peptide

Bei 49 Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden, wurden die PBMC isoliert und in T-Zell-Proliferationstests eingesetzt. Dabei wurde zuerst die Fähigkeit der Zellen geprüft, auf Mitogen zu reagieren, bevor eine Stimulation mit rekombinanten Proteinen erfolgte. Auf Grund von technischen Schwierigkeiten konnten nur Proliferationsdaten von 30 Patienten und 9 Kontrollen ausgewertet werden. Sowohl endemische Kontrollen als auch die Onchozerkose-Patienten reagierten nach Stimulation mit PHA mit hohen Stimulationsindices von 158 (42-343, end. Kontrollen) bzw. 159 (24-547 Patienten). Nach Stimulation mit Con A zeigten die PBMC der Patienten deutlich geringere SI (SI

68 (9-232)) als die endemischen Kontrollen (SI 123 (44-283). Die Stimulationsfähigkeit mit ubiquitären Antigen wurde durch den Einsatz von *Streptococcus pyrogenes* (SL-O) getestet. Dieses Antigen mußte in hoher Konzentration eingesetzt werden (unverdünnt), damit sich sowohl die Zellen der endemischen Kontrollen als auch die Zellen der Patienten stimulieren ließen (SI 24,6 (1,2-160)). Die T-Zell-Reaktivität der Patienten auf spezifisches Antigen (OvAg) fiel bei Onchozerkose-Patienten mit durchschnittlichen SI von 2,5 (0,4-9,8) deutlich geringer aus als auf SL-O.

Eine Stimulation mit rekombinanten Antigenen konnte nur bei PBMC weniger Patienten Proliferation induzieren. Nach Stimulation mit Chitinase, CBD und den synthetischen Peptiden generierten die Zellen der Patienten SI-Werte um eins, obwohl einzelne Patienten mit deutlichen cpm (SI >2) auf diese Antigene reagieren konnten (Abb. 24).

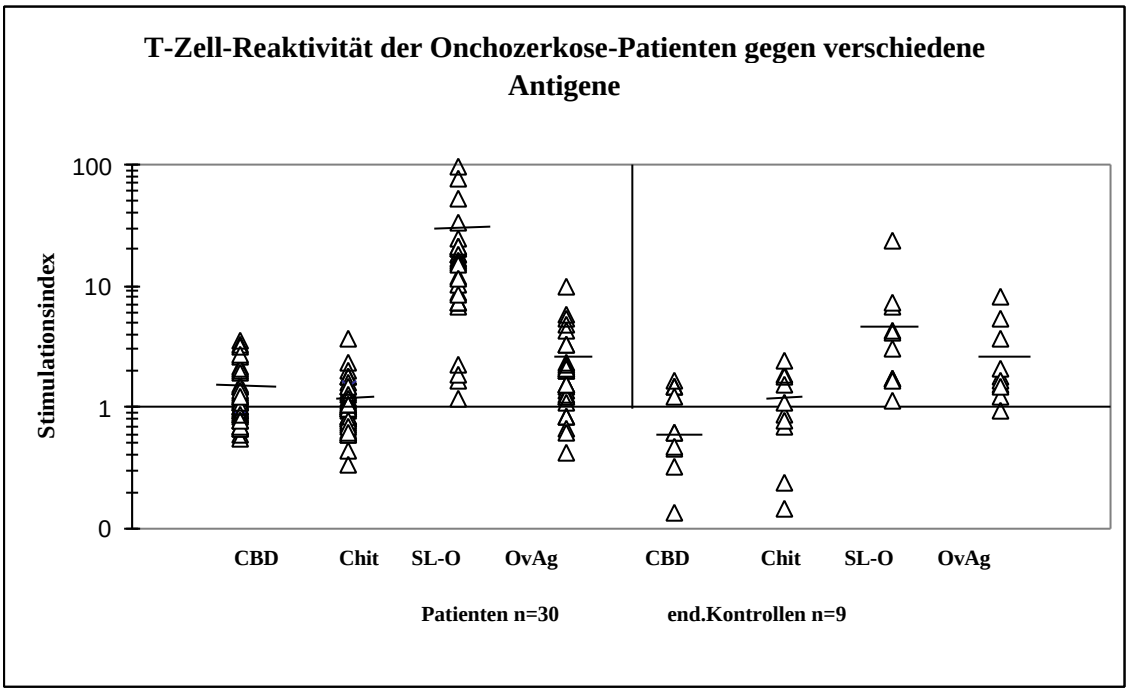


Abb. 24: T-Zell-Proliferationswerte der PBMC der Onchozerkose-Patienten auf verschiedene Antigene. Die Werte sind als Stimulationsindizes angegeben, wobei die Proliferationswerte nach Stimulation durch die Werte ohne Stimulation geteilt wurden.

3.8.4 Zytokinexpression nach Stimulation mit rekombinanter OvL3-Chitinase und OvL3-CBD

Da nur einige Patienten in der Lage waren, auf Stimulation mit Chitinase bzw. CBD mit Proliferation zu reagieren, wurde eine kleine Auswahl von PBMC auf Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, INF-γ (je n=14) und IL-10 (n=5) hin untersucht. Die Auswahl der PBMC wurde an Hand der erhaltenen Proliferationsdaten getroffen. Dabei wurden überwiegend PBMC ausgewählt, die auf Chitinase, CBD oder Peptide mit Proliferation reagieren konnten. Zudem wurden einige PBMC ausgewählt, die keine T-Zell-Reaktivität aufwiesen.

Auch hier reagierten nur wenige Zellen mit Zytokinausschüttung, so daß die gebildeten Mittelwerte starke Streuungen aufweisen. An Hand dieser wenigen Daten konnte nur ein Trend abgelesen werden, wobei PBMC von Onchozerkose-Patienten auf rekombinante Chitinase und CBD mit vermehrter Ausschüttung von TH2-Zytokinen reagierten (Tab. 6).

	IL-4 pg/ml	IL-5 pg/ml	IL-10 pg/ml	INF-γ pg/ml
Chitinase (n =14)	26,5	16,7	72,3	6,8
CBD (n =14)	60,1	22,0	65,5	224
Spontane Freisetzung	37,4	21,1	4,2	76,7
Lit.: TH1/TH2	92/179	nd/4,7	80/165	3200/2400
Spontane Freisetzung	78	<1	120	1960

Tab. 6 Zytokinausschüttung der PBMC nach 96h Stimulation mit Chitinase, CBD und ohne Antigen. Die Werte sind in pg/ml angegeben. Als Vergleich wurden Werte aus der Literatur (S. McHugh et al. 1996) nach Antigenstimulation aufgeführt.

4. DISKUSSION

Die Bekämpfung der Onchozerkose erfolgt durch die Behandlung der Bevölkerung mit Ivermectin® und durch Vektorbekämpfung. Es kommt jedoch zu zunehmenden Pestizid-Resistenzen der Insektenstämme. Begleitet werden diese Schwierigkeiten von der Notwendigkeit einer jährlichen Anwendung von Ivermectin und der Tatsache, daß dieses Medikament nur mikrofilarizid wirkt. Adulte Würmer müssen durch Nodulektomien entfernt werden. Dabei entstehen hohe Kosten, die oft mit logistischen Problemen verbunden sind. Die Entwicklung einer Vakzine, die den Entwicklungszyklus unterbrechen würde, könnte eine wertvolle Ergänzung der bestehenden Maßnahmen darstellen. Durch zahlreiche Untersuchungen über die Mechanismen zur Entstehung von Immunität konnten einige

Antigene von *Onchocerca volvulus* identifiziert werden, denen eine entscheidende Rolle im Infektionsverlauf zugeschrieben wird (Taylor et al. 1995, Taylor et al. 1996, Jenkins et al. 1996). Eines dieser Antigene stellt die Chitinase von infektiösen Drittlarven dar, die als prominentes Antigen mit einer möglichen Rolle bei erworbener Immunität beschrieben wurde (Freedman et al. 1989, Lucius et al. 1991). Zudem konnten Chitinasen an essentiellen Punkten des Filarienzyklus lokalisiert werden (Justus und Ivey 1969, Ward und Fairbairin 1972, Gooday et al. 1988, Adam et al. 1996). Diese Ergebnisse lassen die OvL3-Chitinase als geeigneten Impfstoffkandidaten erscheinen und gaben den Anstoß für die molekulare Charakterisierung der OvL3-Chitinase.

4.1. Klonierung der Chitinase und der Chitin-Binde-Domäne

Die cDNA der OvL3-Chitinase wurde in einen prokaryotischen Expressionsvektor kloniert und durch Affinitätschromathographie aufgereinigt, so daß es für weitere Studien zur Verfügung stand. Zusätzlich wurde der C-terminale Abschnitt des Proteins, die Chitin-Binde-Domäne, kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Der Einsatz der Chitin-Binde-Domäne sollte Aufschluß über die Lokalisation möglicher T-Zell-Epitope und über das protektive Potential dieser Domäne geben.

Während sich die Chitin-Binde-Domäne ohne Probleme klonieren und aufreinigen ließ, gestaltete sich die Klonierung und Expression der Chitinase in *E. coli* schwierig und gelang erst nach zahlreichen Variationen des Versuchsprotokolls. Da Bakterien eine eigene Chitinase und eigenes Lysozym besitzen, das neben der Spaltung von N-acetylmuramin und N-Acetylglucosamin in der Lage ist, Chitin zu spalten (Stryer, 1997), führte die Überexpression der bakterienfremden Chitinase offensichtlich zu Stoffwechsel- und damit zu Wachstumsproblemen der Bakterien. Der verwendete *E.coli*-Stamm XL-1 blue besitzt eine Mutation im Lac-Iq-Gen, die zu einer hohen Expression des Lac-Repressors führt (QIAexpressionist, 1999). So konnte die Expression der für die Bakterien toxischen Chitinase bis zum Zeitpunkt des Expressionsstartes unterbunden werden. Nach einer kurzen Expressionsphase von 3 Stunden konnte die Chitinase aus den Bakterienkulturen isoliert werden.

Die aufgereinigte Chitinase wurde in einem Aktivitätstest auf ihre Fähigkeit, das Substrat MU-GlucNac-3 zu spalten, überprüft. Das rekombinante Protein (in einer Konzentration mit 8,2 nM) zeigte enzymatische Aktivität, was durch die Zunahme der Fluoreszenz verfolgt werden konnte. Bei der Positivkontrolle, eine käufliche Chitinase von *Serratia marcescens*, konnte ein ähnlicher Verlauf während des Aktivitätstests beobachtet werden. Die eingesetzte Konzentration lag jedoch mit 3,5 nM deutlich unter der Konzentration der OvL3-Chitinase. Obwohl beide Chitinasen von gram-negativen Bakterien produziert wurden, handelt es sich bei Chitinase von *Serratia marcescens* um ein natives Protein, während die OvL3-Chitinase rekombinant in diesem prokaryotischen System produziert

wurde. Die OvL3-Chitinase wird in den Bakterien nicht posttranslational modifiziert, so daß sie vermutlich nicht in der optimalen Proteinkonfiguration vorliegt. Diese Konfiguration könnte jedoch für eine optimale Aktivität notwendig sein.

4.2. Einsatz der Chitinase in Immunisierungsstudien

4.2.1. Einsatz der Chitinase und der Chitin-Binde-Domäne im *A. viteae-Meriones*-Modell

Da *O. volvulus* streng primatenspezifisch ist, müssen Untersuchungen über das protektive Potential einzelner Antigene im Tiermodell erfolgen. Dabei eignet sich das Labormodell der Nagetierfilarie *A. viteae* besonders gut, weil in diesem System der gesamte Nagetierfilarienzyklus von *A. viteae* unter definierten Bedingungen ablaufen kann. Der Zwischenwirt *O. moubata* wird über eine Membran mit Blut gefüttert, das eine definierte Menge an Mikrofilarien enthält. Nach ca. 6-8 Wochen werden die infektiösen Drittlarven aus den Zecken isoliert und eine definierte Anzahl (70 oder 75 L3) dem Endwirt verabreicht. Nach Gabe der L3 gibt die Rückfindungsrate adulter Würmer Aufschluß über die Wirkung einzelner Antigene. In diesem System wurde die Chitinase in Kombination mit STP und die Chitin-Binde-Domäne mit Alum getestet.

Die Immunisierung mit Chitinase und STP hatte die Reduzierung der Adultwurmlast von 40% und in einem 2. Versuch von 17,7 % zur Folge. Jedoch konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den immunisierten Gruppen und der Kontrollgruppe gefunden werden. Die Ursache hierfür liegt in den großen Streuungen der Wurmlasten der einzelnen Tiere. Obwohl alle Tiere aus einem Inzucht-Stamm stammten, scheinen einzelne Tiere die Infektion besser kontrollieren zu können. Dies spiegelte sich auch in der Antikörperantwort der Tiere wieder. Während alle Tiere IgG-Antikörper gegen Chitinase bildeten, war der Gehalt an IgG_3-Antikörpern in dem ersten Versuch negativ korreliert mit der Anzahl der Würmer ($r = -0,8$). In dem zweiten Versuch konnte eine Korrelation zwischen dem IgG_3- Gehalt und der Anzahl der Würmer nicht gefunden werden. Die Untersuchungen der Antikörperantworten des zweiten Versuches zeigten eine Erhöhung der Antikörper-Subklasse IgG_1, gefolgt von IgG_3-Antikörpern. Während IgG_3-Antikörper bei TH1-Immunantworten vorherrschend sind, können Antikörper der Subklasse IgG_1 bei TH2-Antworten gefunden werden. Durch die unterschiedlichen Antikörperantworten der zwei Versuche ließen sich keine Rückschlüsse zwischen Protektion und der Ausprägung einer bestimmten Immunantwort ziehen.

Bei intestinalen Nematoden kann die Ausprägung einer TH2-Antwort für die erfolgreiche Kontrolle der Infektion verantwortlich gemacht werden (Urban et al. 1992**,** Lokslay et al. 1994). So konnten

BALB/c-Mäuse die Infektion mit *Trichuris muris* durch die Ausschüttung von TH2-Zytokinen erfolgreich kontrollieren. Dem gegenüber stehen Mäuse des Stammes AKR, die eine Infektion mit *T. muris* nicht bekämpfen können und bei denen Zytokine einer TH1-Antwort nachgewiesen werden konnten. Die Neutralisation von INF-γ führte bei den AKR-Mäusen zu einer erfolgreichen Ausheilung der Erkrankung, wohingegen die Blockierung von IL-4 bei BALB/c-Mäusen zum Ausbruch der Infektion führte.

Bei Filarieninfektionen kann die Zuordnung einer bestimmten Immunantwort für die erfolgreiche Bekämpfung der Erkrankung nicht erfolgen, da Untersuchungen über die Mechanismen zur Entstehung von Protektion zu gegensätzlichen Befunden führte. Lange et al. (1994) konnten in BALB/cBYJ-Mäusen, die mit strahlungsattenuierten L3 immunisiert wurden, eine erfolgreiche Abtötung der Larven, die in Diffusionskammern den Mäusen implantiert wurden, durch die Zytokine IL-4 und IL-5 nachweisen. Gegensätzliche Befunde zeigten Untersuchungen im Humansystem, wo Hinweise auf eine Beteiligung einer TH1-Immunantwort bei der Kontrolle der Infektion gefunden wurden. Patienten, die keine Krankheitssymtome aufweisen, sind im Gegensatz zu Onchozerkose-Patienten, durch eine verstärkte zelluläre Immunantwort gekennzeichnet (Finkelman et al. 1991; Elson et al. 1995). Die wiederholte Gabe von Ivermectin führt Onchozerkose-Patienten aus der zellulären Hyporeaktivität heraus, wobei sich die Immunreaktion in Richtung einer TH1-Antwort verschiebt (Soboslay et al. 1992). Zusätzlich konnte bei diesen Patienten ein hoher IgG_3-Antikörper-Gehalt im Serum gefunden werden (Stewart et al. 1995). Offensichtlich spielt die Ausprägung einer TH1-Antwort eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung der Erkrankung. Es wird angenommen, daß die Eliminierung der Parasiten zu einem sehr frühen Zeitpunkt erfolgt (Chandrashekar et al. 1985). Der hohe Gehalt an IgG_3-Antikörpern läßt auf einen Abtötungsmechanismus schließen, der durch Komplementaktivierung und nachfolgende antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) in Gang gesetzt wird. Dabei könnte die Häutung von L3 zu L4 der mögliche Angriffspunkt dieser Antikörper sein (Brattig et al. 1991).

Die rekombinante Chitin-Binde-Domäne wurde den Wüstenrennmäusen in Kombination mit dem Adjuvans Alum verabreicht. Bei der anschließenden Sektion differierte die Anzahl der Würmer im Vergleich zu der Kontrollgruppe nur wenig. Da bei diesem Versuch nur die IgG-Antiköper-Antworten untersucht wurden, können keine Aussagen über eine Polarisation der Immunantwort gemacht werden. Untersuchungen über die *Brugia malayi*-Mf-Chitinase konnten durch den Einsatz eines verkürzten Proteins die wichtigsten protektiven Epitope auf der Chitin-Binde-Domäne lokalisieren (Venegas et al. 1996). Bei einem Einsatz dieser Domäne in Immunisierungsversuchen konnte die Mf-Last der immunisierten *M. unguiculatus* signifikant verringert werden (Wang et al. 1997). Vergleichbare

Ergebnisse konnten in dieser Studie mit der OvL3-CBD nicht erzielt werden. Nach Abschluß dieser Arbeit und Auswertung der Ergebnisse wird deutlich, daß die OvL3-Chitinase unter den getesteten Bedingungen eine TH2-Immunantwort induziert. Eine weitere Überprüfung der Chitin-Binde Domäne mit einem TH1-Adjuvans ist sinnvoll, um Aussagen über das protektive Potential dieser Domäne machen zu können.

Die Untersuchungen dieser Arbeit liefern Hinweise, daß die OvL3-Chitinase in Kombination mit einem geeigneten Adjuvans, welches die Verschiebung der Immunantwort in Richtung TH1 bewirkt, in der Lage ist, eine Filarieninfektion teilweise zu kontrollieren. Deshalb muß weiter nach geeigneten Applikationsformen und Vakzin-Carriern gesucht werden, die eine deutliche TH1 Antwort hervorrufen. Der Einsatz von Chitinase exprimierenden Salmonellen in diesem System könnte weitere entscheidende Hinweise auf die Wirkung und die Notwendigkeit von TH1-Antworten während einer Infektion geben. Ein weiterer denkbarer Ansatz könnte eine DNA-Vakzinierung (Lewis et al. 1999) oder die Gabe von Salmonellen als DNA-Vehikel sein. Diese Salmonellen tragen ein Plasmid, in dem die Fremd-DNA unter dem Einfluß eines eukaryotischen Promotors steht. Nach Invasion der Salmonellen in die Wirtszellen kommt es zu einer Produktion des Fremd-Proteins. Nach Prozessierung des Proteins und Präsentation der resultierenden Peptide kommt es zur Stimulation der Immunantwort und Ausprägung einer TH1-Antwort (Darji et al. 1997).

4.2.2. Untersuchungen im Mausmodell

Immunisierungsstudien mit geeigneten Impfstoffkandidaten zeigten, daß nicht nur das Antigen von entscheidender Bedeutung ist, sondern daß die Art des verwendeten Adjuvans, die Route und die Dosis der Immunisierung eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Immunantwort spielt (Comoy et al. 1998; Leclerc und Ronco 1998). Durch den Einsatz von geeigneten Adjuvantien ist es möglich, Immunantworten zu beeinflussen und in eine bestimmte TH-Richtung zu verschieben. In dieser Arbeit sollte deshalb nicht nur die Chitinase näher charakterisiert werden, sondern ein geeignetes Applikationsschema für dieses Protein entwickelt werden. Da im *A. viteae-Meriones*-Modell keine ausreichenden Immunreagentien zur Verfügung stehen, wurden diese Untersuchungen mit BALB/c-Mäusen durchgeführt. Es wurde das Co-Blockpolymer STP eingesetzt, das eine Polarisation der T-Helfer-Antworten in Richtung TH1 bewirken kann. Die Autoren Byars & Allison (1987) konnten zeigen, daß nach Gabe von Antigenen mit STP die zelluläre Reaktivität auf diese Antigene verstärkt werden konnte. Diese zelluläre Reaktivität wurde von starken Antikörperantworten begleitet.

Als zweites Adjuvans wurde Alum verwendet. Diese Substanz fördert die Antikörperantworten auf schwache Antigene, wobei die Subklassen IgG_1 und IgG_{2b} dominieren (Ada 1995). Außerdem konnte

die Chitinase als Fusionsprotein mit dem atoxischen, aber hochimmunogenen Tetanusfragment TetC in einen Salmonellen-Carrier kloniert werden. Die orale Gabe von Salmonellen hat den Vorteil, daß neben einer humoralen und zellulären Immunantwort zusätzlich eine generalisierte sekretorische Immunantwort sowohl gegen das Fremdantigen als auch gegen den Salmonellenvektor erfolgt. Die Salmonellen werden im intestinalen Lumen von M-Zellen aufgenommen und zu Antigen präsentierenden Zellen (APC, dendritische Zellen, Makrophagen) transferiert, wo sie von diesen phagozytiert werden (Curtis et al. 1994). Dabei wird die Aufnahme in Makrophagen von den Salmonellen induziert. In den Makrophagen verhindern sie die Verschmelzung mit dem Phagolysosomen und verzögern die Übersäuerung des Zell-Kompartiments (Jones 1996; Comoy et al. 1997). Es kommt zur Präsentation der Fremdantigene bzw. der resultierenden Peptide in Verbindung mit dem MHC-I und MHC-II-Komplex (Svenson et al. 1997). Zusätzlich aktivieren intrazelluläre Bakterien natürliche Killerzellen (NK), die INF-γ produzieren. Durch die Ausschüttung von INF-γ und die IL-12 Produktion von aktivierten Makrophagen wird die Ausprägung einer TH1-Antwort induziert (Abbas et al. 1997).

Der Einsatz der Adjuvantien in dieser Immunisierungsstudie zeigte, daß Chitinase ohne die Gabe eines zusätzlichen Adjuvans nicht in der Lage war, eine zelluläre Immunantwort in immunisierten Mäusen hervorzurufen. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch die Analyse der Antikörperantworten. Die Untersuchung der Antikörper-Subklassen zeigte, daß nur Antikörper der Subklasse IgG_1 gebildet wurden. Erfolgte hingegen die Gabe von Chitinase in Kombination mit dem Adjuvans STP, konnte die zelluläre Immunantwort deutlich verstärkt werden. Auch in der Antikörperantwort dieser Tiere konnten Unterschiede gefunden werden. Während die Applikation der Chitinase mit STP Antikörper aller Subklassen hervorrief, konnten in Seren von Mäusen, die Chitinase mit Alum verabreicht bekamen, IgG- und IgG_1-Antikörper detektiert werden. Die gefundenen Ergebnisse lassen den Einfluß des STP auf das verabreichte Protein deutlich werden. Die verbesserte zelluläre Reaktion, verbunden mit Antikörpern der Subklassen IgG_{2a} und IgG_{2b}, deuten auf die Ausprägung einer TH1-Antwort hin, wenn gleich auch der Einfluß der Chitinase nicht vollständig aufgehoben werden konnte, was durch die Anwesenheit von IgG_1-Antikörpern deutlich wird.

Durch die orale Gabe von Salmonellen, die Chitinase exprimierten, konnte in der vorliegenden Arbeit die zelluläre Immunantwort gesteigert werden. Es wird beschrieben, daß das atoxische TetC-Fragment des Salmonellenvektors pTECH als starkes Adjuvans wirkt (Kahn et al. 1994). Antigen-spezifische Antikörper ließen sich im ELISA nicht nachweisen, obwohl die T-Zell-Antwort gegen Chitinase und der durchgeführte Salmonellen Nachweis in den Organen auf eine erfolgreiche Immunisierung schließen lassen. Weiterhin konnten nur geringe Antikörperantworten gegen Salmonellen-LPS

detektiert werden. Einige Arbeiten über Immunisierungen mit Salmonellen bestätigen die Abwesenheit antigen-spezifischer Antikörper trotz vorhandener Protektion bei einer Belastungsinfektion (Strugnell et al. 1992). Die Autoren vermuteten, daß die Protektion der Versuchstiere auf eine rein zelluläre Immunantwort zurückzuführen ist. Dies könnte eine Erklärung für die gefundenen Ergebnisse sein. Das Fehlen der Antikörperantworten könnte auch in einem Verlust des Plasmids oder einer verringerten Expression der Chitinase liegen. Es ließen sich jedoch in allen Salmonellen, die aus Kot und den Organen isoliert wurden, Plasmide nachweisen. In parallel durchgeführten Versuchen mit einem anderen Filarienprotein (*A. viteae*-Tropomyosin) konnten ebenfalls Plasmide aus den Salmonellen isoliert und Expressionsversuche erfolgreich durchgeführt werden (Kranich, pers. Mitteilung), so daß ein Verlust oder eine verringerte Expressionsfähigkeit als Erklärung für die fehlenden Antikörperantworten ausgeschlossen werden kann. Einen entscheidenden Einfluß auf die Invasivität und Adhärenz haben die Kulturbedingungen der Salmonellen. Es konnte gezeigt werden, daß ein Verlust der Invasivität der Salmonellen mit dem Erreichen der stationären Wachstumsphase einherging. Außerdem konnte ein geringer Sauerstoffgehalt (0%-1%) während des Wachstums die Invasivität und die Adhärenz der Salmonellen deutlich erhöhen (Lee et al. 1990). Daher sollte bei weiteren Versuchen eine genaue Wachstumskurve des jeweiligen Salmonellenstammes erstellt und die Sauerstoffzufuhr stark reduziert werden, um diese Punkte als mögliche Fehlerquelle auszuschließen.

Vielfach konnte die Immunisierung mit Salmonellen sehr gute Erfolge erzielen (Mukkur et al. 1987, Kahn et al. 1994, Toebe et al. 1997, Catmul et al. 1999). Auch bei der Verwendung von Salmonellen im *A. viteae-Meriones*-Modell konnten erste Erfolge erzielt werden. So hatte bei einem Versuch die orale Gabe von Salmonellen, die die homologe L3 Chitinase von *A. viteae* exprimierten, eine signifikante Reduzierung der Wurmlast um 49% zur Folge (Adam et al., pers. Mitteilung). Leider erwies sich der verwendete Salmonellenstamm (pZoosal®) als nicht stabil, so daß diese Werte nicht reproduziert werden konnten. Optimierungsversuche sind notwendig, um die Invasivität und die Virulenz der Salmonellen zu verbessern und so durch den Einsatz von Salmonellen, die OvL3-Chitinase exprimieren, die protektive Wirkung der OvL3-Chitinase und die Polarisierung von Immunantworten durch Salmonellen zu überprüfen.

Zusätzlich sollte das Zytokinmuster auf mRNA–Ebene untersucht werden, um weitere Hinweise für die Ausprägung einer bestimmten Immunantwort zu bekommen. Dabei wurden zuerst Milzzellen von immunisierten Tieren untersucht, die 48 Stunden sowohl mit als auch ohne Antigen kultiviert wurden. Da bei der Gruppe 3 (Chitinase/STP) deutliche Unterschiede auf zellulärer und humoraler Ebene gefunden wurden, erfolgte zusätzlich die Untersuchung von Milzzellen, die 8h und 24h mit Chitinase stimuliert wurden. Nach Restimulation mit Chitinase konnte bei allen Gruppen die mRNA von IL-10 gefunden werden. Zusätzlich wurde ein schwaches Transkript von INF-γ bei Milzzellen, die von STP

immunisierten Mäusen stammten, nachgewiesen. Bei Mäusen, die Chitinase/Alum erhielten, konnten neben der mRNA von IL-10 Transkripte von IL-4 und INF-γ nachgewiesen werden.

Auffällig war die Präsenz aller Zytokine auf mRNA-Ebene bei Milzzellen, die ohne Antigen kultiviert wurden. Während die mRNA von INF-γ bei allen untersuchten Gruppen zu finden war, ließ sich IL-4 nur bei der Gruppe 1 (Chitinase), Gruppe 3 (Chitinase/STP), Gruppe 4 (STP) und Gruppe 5 (Chitinase/Alum) nachweisen. Auch die mRNA von Interleukin 10 konnte, mit Ausnahme von Gruppe 1 (Chitinase), bei allen Gruppen gefunden werden. Durch das Vorhanden sein fast aller untersuchten Zytokine in den Ansätzen, die ohne Antigen kultiviert wurden, lieferten die gefundenen Ergebnissen keine weiteren Hinweise auf die Ausprägung einer bestimmten Immunantwort. Deshalb wurde bei den Untersuchungen der früheren Zeitpunkte (8h und 24h) zusätzlich das Zytokin TNF-α untersucht. Auch diese Ergebnisse konnten die gefundenen Unterschiede der zellulären und humoralen Immunantwort zwischen den immunisierten Gruppen nicht bestätigen. In allen Proben konnten starke Transkripte von TNF-α gefunden werden. TNF-α wird vorwiegend durch LPS-aktivierte Makrophagen, aber auch von antigen-aktivierten T-Zellen und NK-Zellen gebildet. Durch TNF-α kommt es zur verstärkten Ausschüttung von proinflamatorischen Zytokinen, wie INF-γ, IL-1 und IL-6 (Abbas et al. 1997). Bei humanen PBMC konnte gezeigt werden, daß nach LPS-Stimulation und Ausschüttung von TNF-α nach ca. 24 Stunden die Hochregulation von IL-10 auf mRNA-Ebene erfolgt (Platzer et al. 1995). Da die rekombinante Chitinase aus *E. coli* aufgereinigt wurde und LPS-Werte im pg-Bereich im Zellkulturmedium nachgewiesen werden konnten (Hartmann et al., pers. Mitteilung) könnten die starken Transkripte von TNF-α und die Anwesenheit von IL-10 in allen Gruppen auf den Einfluß von LPS zurückzuführen sein.

Eine weitere Ursache für die Unterschiede zwischen der zellulären Immunantwort und den Ergebnissen der RT-PCR könnte im Versuchsaufbau begründet sein. Viele in der Literatur beschriebene Untersuchungen der Zytokine auf mRNA-Ebene wurden als *ex vivo*-Experimente durchgeführt. Dabei werden Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung getötet, Milzzellen isoliert und die mRNA analysiert (Klimpel et al. 1995; Comoy et al. 1997; Liu et al. 1999). Dabei wurde die mRNA zu sehr frühen Zeitpunkten untersucht (3h, 6h, 8h), um die tatsächlichen Verhältnisse im Tier nach Immunisierung zu ermitteln. Dem gegenüber stehen einige wenige Arbeiten, in denen Lymphknotenzellen *in vitro* stimuliert wurden (von 6 bis 72 Stunden). Während die Autoren in diesem Versuchsansatz eine gute Korrelation zwischen den Ergebnisse des Zytokin-ELISA und den Ergebnissen der mRNA-Untersuchungen finden konnten (Warbrick al. 1998), konnte aus den hier gefundenen Ergebnissen der mRNA-Untersuchung keine weiteren Rückschlüsse auf die Verhältnisse während des T-Zell-Tests gezogen werden. Da die RT-PCR eine hochsensible Methode darstellt, können auch geringe Mengen an DNA nachgewiesen werden. Dadurch werden auch Transkripte von

Zytokinen erfaßt, die durch unspezifische Stimulation (wie durch LPS), durch *in vitro*-Kultivierung oder durch eine konstitutive Expression dieser Zytokine hervorgerufen werden (Klimpel et al. 1995). Zudem benötigt die RT-PCR durch viele voneinander abhängige Versuchsschritte sehr viel Erfahrung und optimale Versuchsbedingungen. Neuere Methode, wie intrazelluläre Zytokin-Messungen im FACS-scan (Tayebi et al. 1999), oder die Quantifizierung der Zytokine mit Hilfe spezifischer Fluoreszenz-markierter Sonden, die an das PCR-Produkt binden und über die Fluoreszenz Aussagen über die Stärke des PCR-Produktes geben (Taq-man®, Perkin-Elmer), stellen zuverlässigere Methoden zum Nachweis von Zytokinen dar.

4.3. Identifizierung von T-Zell-Epitopen innerhalb der OvL3-Chitinase

4.3.1. Beurteilung der verwendeten Algorithmen

Zur Identifizierung von T-Zell-Epitopen innerhalb von Proteinen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Algorithmen entwickelt, die auf Grund von Strukturmerkmalen oder von empirisch ermittelten AS-Abfolgen Bindungsvorhersagen von Peptiden an den MHC-Komplex treffen. Mit Hilfe dieser Algorithmen ist es möglich, schnell und effizient potentielle T-Zell-Epitope innerhalb von Proteinen zu detektieren (Rothbard und Taylor 1988, Reyes et al. 1991). In der Literatur sind eine Vielzahl von Algorithmen beschrieben, doch eine Studie über die Zuverlässigkeit dieser Vorhersagen wies auf eine geringe Spezifität und Sensitivität vieler getesteter Algorithmen hin. In der Untersuchung von Deavin et al. (1996) zeigte sich, daß die Vorhersage von Rothbard und Taylor (1988) die einzige zuverlässige und exakte Vorhersage im Mausmodell ist. Im Humansystem lieferte der Algorithmus von Stille (1987) zuverlässige Vorhersagen. Auf Grund dieser Resultate wurden in dieser Arbeit diese beiden Algorithmen ausgewählt und auf die OvL3-Chitinase angewendet. Zusätzlich lieferte die Vorhersage der MHC-II-Bindungs-Motive aus der Arbeitsgruppe Rammensee (Universität Tübingen) weitere Informationen über mögliche T-Zell-Epitope innerhalb der Chitinase.

Bei diesem Ansatz sollten nicht nur T-Zell-Epitope innerhalb der Chitinase detektiert werden, sondern gleichzeitig die Algorithmen auf Zuverlässigkeit und Genauigkeit geprüft werden. Aus diesen Daten sollten Rückschlüsse gezogen werden, ob durch einzelne Algorithmen oder die Kombination von Algorithmen zuverlässig T-Zell-Epitope innerhalb von großen Datenbanken identifiziert werden können. Die vorhergesagten Epitope wurden als synthetische Peptide hergestellt und in Proliferationsassays auf ihre Fähigkeit getestet, Milzzellen von immunisierten Mäusen zur

Proliferation anzuregen. Zusätzlich gewährleisteten überlappende Peptide, die die Gesamtheit des Proteins umfaßten, daß eine möglichst große Anzahl von T-Zell-Epitopen detektiert wurde.

Durch den Einsatz dieser überlappenden Peptide konnten 14 T-Zell-Epitope innerhalb des Proteins ermittelt werden. Die Vorhersage von Rothbard und Taylor ermittelte 24 vermutliche T-Zell-Epitope, von denen acht mit den 14 tatsächlichen T-Zell-Epitopen übereinstimmten. Durch die hohe Anzahl der vorhergesagten Epitope konnte dieser Algorithmus eine hohe Sensitivität erzielen (0,54), doch die vielen falsch positiven Vorhersagen senkten die Spezifität auf 0,33. Ähnliche Ergebnisse konnten Reyes et al. 1990 finden, als sie den Algorithmus von Rothbard und Taylor auf verschiedene Antigene anwandten und mit bekannten Epitopen innerhalb der Proteine verglichen. In diesen Untersuchungen erzielte die Rothbard und Taylor-Vorhersage einen Index von 0,4 bei Sensitivität und Spezifität. Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse von Deavin et al. 1996, die bei einem Vergleich verschiedener Algorithmen darlegten, daß die Vorhersage von Rothbard und Taylor die einzige war, die murine T-Zell-Epitope mit Signifikanz vorhersagte.

Der Algorithmus von Humphreys basiert auf der Vorhersage nach Stille (1987), die amphiphatische Abschnitte innerhalb des Proteins identifiziert. Von den 13 vorhergesagten Epitopen zeigten jedoch nur 4 korrespondierende Pepscan-Peptide Reaktionen in Proliferationsassays. Damit konnte dieser Algorithmus nur eine Spezifität von 0,3 und Sensitivität von 0,28 erzielen. Bei der vergleichenden Studie von Deavin (1996) konnten ähnliche Ergebnisse im Mausmodell gefunden werden. Hier lag der Index für Spezifität bei 0,38 und der für Sensitivität bei 0,08. Im Humansystem konnten diese Werte verbessert werden. Die Spezifität lag bei 0,43, während die Sensitivität 0,1 erzielte. Dem gegenüber stehen Untersuchungen von Reyes (1990), die diesen Algorithmus mit einer Spezifität von 0,47 und einer Sensitivität von 0,57 auswiesen.

Von den vorhergesagten MHC-II-Bindung-Motive von Rammensee für den genetischen Hintergrund H2-E^d der BALB/c- Mäuse konnten sieben der zehn vorhergesagten T-Zell-Epitope durch die Reaktion der Pepscan-Peptide bestätigt werden. Dies drückte sich durch eine hohe Spezifität (0,7) und hohe Sensitivität (0,47) aus. Bei einer kombinierten Anwendung aller Algorithmen konnte die Sensitivität auf 0,67 erhöht werden. Doch durch die große Anzahl der vorhergesagten T-Zell-Epitope sank die Spezifität auf 0,21. Bei der Verwendung zweier Algorithmen zeigte die Kombination der Rammensee- und der Rothbard und Taylor-Vorhersage die besten Werte. Die Sensitivität blieb mit 0,67 gleich hoch wie bei der Kombination aller Algorithmen, während sich die Spezifität von 0,21 auf 0,33 erhöhte. Der zusätzliche Einsatz des Humphreys-Algorithmus ergab keine Hinweise auf neue Epitope, sondern verringerte die Spezifität durch die gestiegene Anzahl der vorhergesagten Epitope.

Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Vorhersagen könnten in den verschiedenen Grundlagen der einzelnen Algorithmen liegen. Während sich die Vorhersage von Rothbard und Taylor

und der Algorithmus von Humphreys auf sekundäre Strukturen oder Sequenz-Charakteristika stützen, wurden die MHC-Bindung-Motive von endogen prozessierten Protein-Antigenen bzw. die Präsentation der resultierenden Peptide durch den MHC-II-Komplex ermittelt. Von einigen Arbeitsgruppen (Takahashi et al. 1989, Berzofski et al. 1991) wurde diskutiert, daß die natürliche Prozessierung von Antigenen der essentielle Schritt bei der Generation von T-Zell-Epitopen darstellt. Die Prozessierung von Antigenen geschieht in Endosomen/Lysosomen von APC, wo Cathepsin B als Protease wirkt. Die Inhibition des Cathepsin B führte zum Verlust von Epitopen, die nach natürlicher Prozessierung bei dem Modell-Antigen Myoglobin entstanden. Auf Grund dieser Ergebnisse schlossen die Autoren, daß Cathepsin B notwendig und ausreichend für die Generation und Präsentation von Peptiden ist. Die Rammensee-Vorhersage wurde auf der Basis von natürlich prozessierten Antigenen erstellt. Damit wurden auch tatsächliche Schnittstellen von Proteasen berücksichtigt, so daß dies ein Grund für die guten Resultate der Rammensee-Vorhersage sein könnte. Der Nachteil dieser Vorhersage besteht in der Restriktion durch den MHC-Haplotyp. Jede Vorhersage muß gesondert für den jeweiligen MHC-II-Haplotyp erfolgen. Deshalb ist die Identifikation von sogenannten promiskuitiven Epitopen, die von einem breiten Spektrum von MHC-Haplotypen erkannt werden, wichtig. Derzeit gibt es noch keinen Algorithmus, der eine Erkennung der Epitope in großen Populationen gewährleistet, so daß die Prüfung von ermittelten Epitopen in großen Populationen von Individuen erforderlich ist. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der eingeschränkten Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse vom Maussystem auf das Humansystem. Die theoretischen Vorhersagen von MHC-Bindungs-Motiven innerhalb der OvL3-Chitinase für den genetischen Hintergrund von zwei verschiedenen Maus- und drei verschiedenen humanen MHC-Haplotypen zeigten deutliche Unterschiede in der Lokalisation von potentiellen T-Zell-Epitopen.

Das schlechte Abschneiden der Humphreys-Vorhersage könnte in der Anwendung der Vorhersage im Maussystem begründet sein. Die vergleichenden Studien von Deavin wiesen den Algorithmus von Stille als einen sehr effizienten Algorithmus im Humansystem aus. Die Modifikation dieses Algorithmus erfolgte durch den Mit-Autor der Stille-Publikation Humphreys, der die Anwendbarkeit des Algorithmus auf das Maussystem zusicherte. Auf Grund der erzielten Ergebnisse dieser Arbeit scheint eine Überarbeitung dieses Algorithmus für die erfolgreiche Anwendung in Maussystem notwendig.

In dieser Arbeit konnte deutlich gemacht werden, daß die Identifizierung und Charakterisierung von T-Zell-Epitopen durch die Anwendung von verschiedenen Algorithmen innerhalb der OvL3-Chitinase erfolgen konnte. Dabei zeigte sich, daß sich durch eine kombinierte Anwendung des Algorithmus von Rothbard und Taylor und Rammensee die Anzahl der zu synthetisierenden Peptide von 122 Stück (Pepscan) auf 30 Peptide senken läßt. Durch die 30 vorhergesagten T-Zell-Epitope konnten 71% der

im Pepscan gefundenen T-Zell-Epitope detektiert werden. Durch den Einsatz dieser synthetischen Peptide in Proliferationstests konnte eine Lokalisation der T-Zell-Epitope erfolgen. Zudem könnten diejenigen T-Zell-Epitope ausgewählt werden, die eine starke T-Zell-Reaktivität aufweisen und für die Entwicklung einer Vakzine verwendet werden.

Steht nicht so sehr die Identifikation und Charakterisierung immundominanter Bereiche eines einzelnen Proteins im Vordergrund, sondern die Anwendung der Algorithmen auf große Datenbanken, liefert die Kombination der Algorithmen von Rothbard und Taylor und von Rammensee ebenfalls zuverlässige Ergebnisse. Sollen innerhalb von Proteinen schnell und effizient T-Zell-Epitope identifiziert werden, können durch die kombinierte Anwendung der beiden Algorithmen diejenigen Epitope ausgewählt werden, die von beiden Algorithmen vorhergesagt werden. Dadurch kann die Anzahl der Peptide auf 7 reduziert werden, von denen 6 durch korrespondierende Pepscan-Peptide als reaktive T-Zell-Epitope bestätigt werden konnten.

Die Anwendungen beider Algorithmen auf weitere Antigene werden darüber Aufschluß gegeben, ob ähnliche Ergebnisse erzielt werden können.

4.3.2. T-Zell-Reaktivität der vorhergesagten Epitopen

Die vorhergesagten T-Zell-Epitope wurden in Form von synthetischen Peptiden hergestellt und in Proliferationsassays mit Milzzellen immunisierter Mäuse getestet. Während die Pepscan-Peptide als 16mere hergestellt wurden, wurden die Rammensee-Peptide mit einer Länge von 15 AS synthetisiert. Auch die vorhergesagten Epitope von Rothbard und Taylor wurden bis auf 3 Ausnahmen als 15mere hergestellt. Die Humphreys-Peptide wurden gemäß der Vorhersage synthetisiert und umfaßten 13 Aminosäuren. Es wurden BALB/c-Mäuse mit rekombinanter Chitinase in Kombination mit STP immunisiert und die isolierten Milzzellen mit den synthetischen Peptiden restimuliert.

Insgesamt waren die Proliferationswerte sehr niedrig, dennoch konnten reproduzierbare Aussagen über einzelne stimulierende Bereiche getroffen werden. Ähnlich geringe Proliferationswerte konnten auch in anderen Studien nach Stimulation mit Peptiden gefunden werden (Raulf-Heimsoth et al. 1998). Zusätzlich zeigt die OvL3-Chitinase nur schwache Immunogentität. So konnten Milzzellen von Mäusen, die nur mit rekombinanter Chitinase ohne Adjuvans immunisiert wurden, nicht auf Restimulierung mit diesem Protein reagieren. Auch nach Immunisierung mit Chitinase und STP konnten nur Proliferationswerte bis 3000cpm gemessen werden.

Eine weitere Schwierigkeit trat während der Versuchsdurchführung auf. Bei Wiederholungen der Tests kam es zu immer schlechteren Proliferationswerten und nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Erst die Analyse von Peptiden durch HPLC, die mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren wurden und der

Vergleich verschiedener Mikrotiterplatten konnte zeigen, daß es zur Degradation der Peptide und zur Adsorption der synthetischen Peptide an die Mikrotiterplatten kam. Das Aliquotieren der Peptide in Mikrotiterplatten, die dann jeweils für den entsprechenden Test aufgetaut und benutzt wurden, führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

Vergleichende Studien über die Identifizierung von T-Zell-Epitopen arbeiteten überwiegend mit T-Zell-Linien. Durch die Verwendung von spezifischen T-Zell-Linien kommt es zu erhöhten Kontakt zwischen präsentiertem Peptid und T-Zell-Rezeptor, so daß eine starke Immunantwort die Folge ist. Deshalb können bei der Verwendung von T-Zell-Linien höhere Proliferationswerte (>14000cpm) erzielt werden (Amante et al. 1997). Eine andere Möglichkeit zur Verbesserung der T-Zell-Reaktivität ist die Verwendung von Lymphknoten immunisierter Tiere. Antigene werden zuerst in die nächstgelegenen Lymphknoten transportiert, wo sie durch dendritische Zellen und Makrophagen aufgenommen und prozessiert werden (Abbas et al. 1997). Deshalb führt der Einsatz von Lymphknoten durch die erhöhte Anzahl von Antigen präsentierenden Zellen zu verstärkten T-Zell-Antworten (> 23 000cpm; Kutubuddin et al. 1991).

Beide Versuchsansätze wurden in dieser Studie nicht verfolgt, obwohl sie zur Verbesserung und damit zu klareren Ergebnissen geführt hätten. In dieser Arbeit sollte die Verwendung von T-Zell-Algorithmen auf große Datenbanken überprüft werden. Das Ziel sollte die schnelle, effektive und kostengünstige Identifizierung von T-Zell-Epitopen sein, die sich in einfach durchzuführenden Systemen verifizieren lassen. Dafür schien der Einsatz von Milzzellen immunisierter Tiere geeignet, da die Generation von T-Zell-Linien für eine große Anzahl von Peptiden nicht durchführbar wäre. Zudem gewährleistete die Verwendung von Milzzellen im Gegensatz zu Lymphknotenzellen eine genügend hohe Zellzahl für den Einsatz vieler Peptide. Ob der Einsatz von Milzzellen zu zuverlässigen Ergebnissen führt, werden weitere Studien mit anderen Antigenen zeigen.

Auffällig waren unterschiedliche Reaktionen korrespondierender Peptide im Proliferations- bzw. im Pepscanassay. Der Bereich 79-81 zeigte diese Unterschiede besonders deutlich. In allen Peptiden war das vorhergesagte Rothbard und Taylor-Motiv KYLYKE enthalten, trotzdem reagierten die Peptide sehr unterschiedlich. Gute Resultate zeigte das Pepscan-Peptid 78 und das Rothbard-Peptid 79-81. Beide enthielten C-terminal neben dem vorhergesagten Motiv noch die Aminosäuren GKETI. Offensichtlich sind diese AS für eine Interaktion zwischen MHC-II-Peptid-Komplex und dem TCR notwendig. Die Arbeitsgruppe von Mougil et al. (1998) konnte zeigen, daß eine Reihe von Faktoren bei der Interaktion zwischen Peptid, MHC-Komplex und TCR eine Rolle spielen. Ein wesentlicher Einfluß auf das Bindungsverhalten und damit auch auf die T-Zell-Antworten haben flankierende Bereiche um die antigene Kern-Determinante. Durch den Austausch einer AS kann es zu veränderten Bindungsaffinitäten zum MHC-Komplex kommen. Durch konkurrierendes Bindungsverhalten

einzelner AS zum MHC-Komplex kann die Immunantwort beeinflußt und verändert werden. Zudem ermöglichen unterschiedliche flankierende Bereiche den Zugang unterschiedlicher Peptidasen. Damit erfolgt die Präsentation unterschiedlicher Peptide, die wiederum unterschiedliche T-Zell-Antworten hervorrufen. Ein weiterer Faktor ist die Konzentration der eingesetzten Peptide. Untersuchungen an MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen ergaben, daß dominante Peptide schon in geringen Konzentrationen zu einer T-Zell-Antwort führten. Bei subdominanten Epitopen war eine deutlich höhere Konzentration notwendig, um eine Stimulation bei T-Zellen hervorzurufen (Busch und Pamer 1998). Zusätzlich hat die Konzentration der Peptide einen großen Einfluß auf die Ausprägung der T-Helfer-Antwort (Murray 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden die Peptide mit einer Konzentration von 10µg/Vertiefung in die Proliferationstests eingesetzt. Dieser Wert wurde aus Literaturangaben übernommen, und es erfolgte keine Titration zur Bestimmung der optimalen Konzentration der Peptide. Dies lag zum einem an der großen Anzahl der zu testenden Peptide, zum andern sollte die Vergleichbarkeit der Peptide in den einzelnen Tests gewährleistet sein. Trotz dieser Schwierigkeiten konnten fünf Bereiche gefunden werden, die von allen Algorithmen vorhergesagt und in T-Zell-Tests bestätigt werden konnten.
Obwohl Immunisierungen mit Peptiden mehrfach erfolgreich angewendet wurden (Takita-Sonoda et al. 1996), besitzen Peptide oft nur schwache Immunogenität (Auriault et al. 1988). Eine Methode zur Verbesserung des immunogenen Charakters ist die Kopplung der Peptide an Carrier-Moleküle. Hierfür eignen sich das Tetanus-Toxoid oder Ovalbumin (Auriault et al. 1988) oder die Inseration von Peptiden in Immunglobuline (Brumeanu et al. 1995). Eine andere Möglichkeit, die Immunogenität der Peptide zu erhöhen, ist die Herstellung von Konstrukten, bei denen verschiedene T-Zell-Epitope oder einzelne T-Zell-Epitope mehrfach aneinander gehängt werden (de Olivera et al. 1993, Godard et al. 1994, Kahn et al. 1994). Diese Strategie konnte erfolgreich bei der Schistosomiasis und der Toxoplasmose angewendet werden (Darcy et al. 1992, Wolowczuk et al. 1991, Godard et al. 1994), so daß eine dieser Möglichkeiten für den Einsatz der fünf Peptide im *A.viteae-Meriones*-Modell ausprobiert werden sollte.

4.4. Einsatz der rekombinanten Proteine und Peptide in Feldstudien in Kamerun

In einem hyperendemischen Onchozerkosegebiet in Kamerun sollte die humorale und zelluläre Reaktivität von Onchozerkose-Patienten gegen die rekombinante Chitinase, die Chitin-Binde-Domäne getestet werden. Zusätzlich wurden Peptide der Chitinase in T-Zell-Proliferationtests eingesetzt.
Es erfolgte eine gründliche Anamese der Patienten. Durch Hautbiopsien und Beurteilung der

Krankheitssymtome wurde die Schwere der Erkrankung ermittelt, jedoch erfolgte keine Einteilung in generalisierte und lokalisierte Onchozerkose oder in vermeintlich Immune (PI). Die Mikrofilarienlast der Patienten lag bei durchschnittlich 26 Mf/mg, so daß unter Berücksichtigung der anderen Parameter bei den meisten Patienten auf eine generalisierte Onchozerkose geschlossen werden konnte. Dies spiegelte sich auch in der Immunantwort der Patienten wieder. Während die T-Zell-Reaktivität gegen Mitogen unbeeinflußt blieb, wurde die ausgeprägte Hyporeaktivität dieser Patienten durch Stimulation mit dem Gesamtextrakt von *O. volvulus*-Würmern (OvAg) sichtbar. Erst der Einsatz hoher Konzentrationen erzielte meßbare Stimulationswerte. Auch die Restimulation mit 18 parallel untersuchten rekombinanten *A. viteae*- und *O. volvulus*-Antigenen erwies sich als schwierig. Diese ausgeprägte Hyporeaktivität ist bei Patienten mit generalisierter Onchozerkose vielfach beschrieben worden (Nutman et al. 1987; Bradley et al. 1995). Dennoch konnte die T-Zell-Reaktivität gegen einige rekombinante Proteine bei Onchozerkose-Patienten erfolgreich getestet werden, wenngleich auch in diesen Arbeiten die T-Zell Reaktivität gegen die rekombinanten Proteine schwach ausfiel (Arasu et al. 1989; Seeber et al. 1993). In unser Studie reagierten nur vereinzelt Patienten nach Stimulation mit Chitinase, CBD oder Chitinase-Peptiden. Die Arbeiten dieser Studie haben gezeigt, daß die Chitinase unter den getesteten Bedingungen eine TH2-Immunantwort induziert. Selbst BALB/c-Mäuse, die keiner generalisierten Hyporeaktivität unterliegen, waren nach Immunisierung mit Chitinase nicht in der Lage, auf eine Restimulation mit Chitinase mit Proliferation zu reagieren. Warum jedoch einige Patienten in der Lage waren, auf diese Antigene zu reagieren, konnte nicht geklärt werden. Keiner der untersuchten Parameter (Mf-Last, IgG-Subklassen, Alter) korrelierte mit den gefundenen Ergebnissen aus den T-Zell-Proliferationstests. Eine mögliche Ursache könnte in einem geeigneten MHC-Klasse-II-Haplotyp dieser Patienten liegen (Meyer et al. 1994). Eine weitere Erklärung könnte die Tatsache sein, daß diese Patienten nicht einer generellen Hyporeaktivität unterliegen, sondern daß ihre zelluläre Reaktivität durch bestimmte Faktoren (z.B. die Einnahme von Ivermectin) verbessert wurde. Untersuchungen in einem Patientenkollektiv, bei dem die Einteilung in die verschiedenen Krankheitsbilder erfolgt wäre, hätte die Einordnung der gefundenen Ergebnisse erleichtert.

Während bei allen untersuchten Patienten IgG-Antikörper gegen OvAg im Serum nachgewiesen werden konnten, enthielten 61% der Patienten IgG-Antikörper im Serum gegen die Chitinase bzw. 43% gegen die OvL3-CBD. Bei einem höheren Prozentsatz von Patienten konnten α-Chitinase-IgG_4-spezifische Antikörper im Serum gefunden werden. Diese Differenzen lassen sich auf eine unterschiedliche Sensitivität im ELISA zurückführen, die durch die jeweilige Konjugatverdünnung bedingt wird. Die Antikörperantwort gegen die OvL3-CBD zeigte einen erhöhten Anteil an IgG_3-Antikörpern. Mit Hilfe des Algorithmus von Kolaskar (1990) konnten auf dieser Domäne sehr viele

potentielle B-Zell-Epitope lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich scheint die OvL3-CBD eine wichtige Rolle bei der Ausprägung von TH1-Immunantworten zu spielen.

Der hohe Anteil an Chitinase-spezifischen Antikörpern in diesem Patientenkollektiv steht dem Befunde von Freedman et al. (1989) gegenüber. Diese Arbeitsgruppe konnte nur bei putativ Immunen Antikörper gegen Chitinase nachweisen. Eine mögliche Erklärung könnte die Behandlung mit Ivermectin sein. Ivermectin wirkt, ähnlich wie Dethylcarbamazine (DEC), mikrofilarizid. Durch die Behandlung mit DEC kommt es zur Erhöhung von Eosinophilen (Francis et al. 1985). Zusätzlich kann drei Tage nach Behandlung ein kurzfristiger Anstieg von Phosphorylcholin beobachtet werden, dem, nach Abfall der Phosphorylcholinkonzentration, ein Anstieg von anti-Phosphorylcholin-Antikörpern (IgM und IgG) folgt (Lal et al. 1989). Erst kürzlich haben Untersuchungen gezeigt, daß das sekretierte Antigen ES-62 von adulten *A. viteae* aus Phosphorylcholin-Molekülen besteht, die mit N-Acetyl-Glucosamin-Molekülen, den Bausteinen der Chitinase, verknüpft sind. Phosphorylcholin-Epitope konnten aber nicht nur bei Adulten, sondern auch bei mf von *Brugia malayi* nachgewiesen werden (Wenger et al. 1988). Eine Abtötung der Mikrofilarien könnte eine Freisetzung von Phosphorylcholin und damit auch Acetyl-Glucosamin bewirken, auf die der Wirtsorganismus mit der Produktion von Antikörpern reagieren könnte.

Die Untersuchung der Zytokine von T-Zellen der Patienten unterstützten die Befunde der Proliferationstests. Sowohl nach Stimulation mit Chitinase als auch mit OvL3-CBD reagierten PBMC von Onchozerkose-Patienten mit der Ausschüttung von TH2-Zytokinen. Während nach Stimulation mit Chitinase nur eine vermehrte Ausschüttung von IL-10 zu beobachten war, konnte nach Stimulation mit OvL3-CBD neben IL-10 auch IL-4 und INF-γ nachgewiesen werden. Obwohl die gemessenen INF-γ-Werte in einem Bereich liegen, der in der Literatur für Antigene beschrieben wird, die eine TH2-Antwort induzieren (McHugh et al. 1996), konnte eine leicht verstärkte Reaktivität auf zellulärer und humoraler Ebene nach Stimulation mit OvCBD gefunden werden. PBMC von 7 Patienten generierten Stimulationindizes von ≥ 2 nach Stimulation mit OvL3-CBD. Außerdem konnte ein erhöhter Anteil von α-CBD-IgG_3-Antikörpern in den Seren der Patienten gefunden werden. Diese Domäne scheint wichtige Komponenten zu besitzen, die für die Ausprägung einer TH1-Antwort wichtig sind. Weitere Untersuchungen im *A. viteae-Meriones*-Modell mit TH1-induzierenden Adjuvantien werden wichtige Hinweise auf das protektive Potential dieser Domäne geben.

Die im Humansystem gefundenen Ergebnisse unterstützen die Befunde aus den Immunisierungsstudien in BALB/c-Mäusen. Die OvL3-Chitinase scheint unter den getesteten Bedingungen eine TH2-Antwort auszulösen, die durch geringe T-Zell-Reaktivität und von IgG_1-Antikörpern bei der Maus begleitet ist. Die Chitinase tritt an essentiellen Punkten des Filarienzyklus auf, während des Eischlupfes und der Häutung von L3 zu L4. Diese sensiblen Punkte im

Entwicklungszyklus des Parasiten bilden Angriffspunkte der Immunantwort, so daß eine TH2-Antwort für das Überleben der Würmer wichtig ist. Durch die Induktion von TH2-Zytokinen entzieht sich der Wurm der Immunantwort. Eine TH1-Antwort auf die Chitinase würde eine starke T-Zell-Reaktivität, eine hohe INF-γ-Produktion und damit proinflammatorische Reaktionen hervorrufen. Zusätzlich würden die induzierten IgG_3-Antiköper für die Aktivierung von Komplement sorgen, was zur Rekrutierung von Eosinophilen und zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität führt. Mit dieser Immunantwort könnte es zu einer Abtötung der L3 kommen, so daß der Entwicklungszyklus unterbrochen wäre.

Die Chitinase ist nach wie vor einer der vielversprechendsten Impfstoffkandidaten. Weitere Versuche mit geeigneten Adjuvantien, die eine starke TH1-Antwort hervorrufen, sind notwendig, um die gefundenen Ergebnisse zu bestätigen. Eine Möglichkeit wäre die Immunisierung mit DNA, die in vielen Studien erfolgreich eingesetzt werden konnte (Lewis et al. 1999). Eignen würde sich ebenso die Verwendung von Salmonellen, die Fremdproteine exprimieren (Kahn et al. 1994) oder die als Vehikel für eine DNA-Vakzinierung benutzt werden (Darji et al. 1997). Durch den Einsatz von eukaryotisch exprimierten Protein in Immunisierungsstudien könnte geprüft werden, ob posttranslationale Modifikationen Einfluß auf das protektive Potential der Chitinase haben. Die ideale rekombinante Subvakzine sollte sicher, billig, Hitze-stabil, leicht zu verabreichen sein und mit einer einzigen Dosis eine lange andauernde Immunität erzeugen (Liljeqvist et al. 1999). Dazu eignet sich besonders die Verwendung von synthetischen Peptiden, die aus T- und B-Zell-Epitopen bestehen. Die hier gefundenen T-Zell-Epitope könnten mit vorhergesagten B-Zell-Epitopen verknüpft werden und in Immunisierungsstudien eingesetzt werden.

5. Literatur

Abbas A, Lichtman, A, Pober J (1997): „Cellular and Molecular Immunology“
W. Saunders Company, 3nd Edition, Philadelphia

Ada G (1995) Adjuvantien in „Strategies in vaccine design“
RG Landes Company Austin, Springer Verlag, Heidelberg

Adam R, Kaltmann B, Rudin W, Friedrich T, Marti T, Lucius R (1996) Identification of chitinase as the immunodominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents.
J Biol Chem; 271:1441-7

Amante FH, Crewther PE, Anders RF, Good MF (1997) A cryptic T cell epitope on the apical membrane antigen of Plasmodium chabaudi adami can prime for an anamnestic antibody response: implications for malaria vaccine design.
Immunol; 159:5535-44

Arasu P, Nutman TB, Steel C, Mulligan MM, Abraham D, Tuan RS, Perler FB (1989) Human T-cell stimulation, molecular characterization and in situ mRNA localization of a Brugia malayi recombinant antigen.
Mol Biochem Parasitol; 36:223-31

Auriault C, Gras-Masse H, Wolowczuk I, Pierce RJ, Balloul JM, Neyrinck JL, Drobecq H, Tartar A, Capron A (1988) Analysis of T and B cell epitopes of the Schistosoma mansoni P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides.
Immunol; 141:1687-94

Bartlett A, Turk J, Ngu J, Mackenzie CD, Fuglsang H (1978) Variation in delayed hypersensitivity in onchocerciasis.
Trans R Soc Trop Med Hyg; 72:372-7

Berzofsky JA (1991) Mechanisms of T cell recognition with application to vaccine design.
Mol Immunol; 28:217-23

Boyum A (1968)
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.
Scand. J. Natl. Med.Assoc; 70, 597-598

Bradley JE, Elson L, Tree TI, Stewart G, Guderian R, Calvopina M, Paredes W, Araujo E, Nutman TB (1995) Resistance to Onchocerca volvulus: differential cellular and humoral responses to a recombinant antigen, OvMBP20/11.
J Infect Dis; 172 :831-7

Bradley LM, Clarke J, Mille A (1980) “Selected Methods in cellular Immunology”, eds Mishell B and Shiigi S, WH Freedman and Company, New York

Brattig NW, Tischendorf FW, Albiez EJ, Buttner DW, Berger J (1987) Distribution pattern of peripheral lymphocyte subsets in localized and generalized form of onchocerciasis.
Clin Immunol Immunopathol; 44:149-59

Brattig NW, Tischendorf FW, Strote G, Medina-de la Garza CE (1991) Eosinophil-larval-interaction in onchocerciasis: heterogeneity of in vitro adherence of eosinophils to infective third and fourth stage larvae and microfilariae of Onchocerca volvulus.
Parasite Immunol; 13: 13-22

Brumeanu TD, Dehazya P, Wolf I, Bona CA (1995) Enzymatically mediated, glycosidic conjugation of immunoglobulins with viral epitopes.
J Immunol Methods; 183:185-97

Brydon LJ, Gooday GW, Chappell LH, King TP (1987) Chitin in egg shells of Onchocerca gibsoni and Onchocerca volvulus.
Mol Biochem Parasitol; 25:267-72

Busch DH, Pamer EG (1998) MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL.
J Immunol; 160:4441-8

Byars, N. E. and Allison, A. C. (1987) Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell mediated and humoral immunity.
Vaccine 5, 223 - 228.

Canlas M, Wadee A, Lamontagne L, Piessens WF (1984) A monoclonal antibody to surface antigens on microfilariae of Brugia malayi reduces microfilaremia in infected jirds.
Am J Trop Med Hyg; 33:420-4

Carson RT, Desai DD, Vignali KM, Vignali DA (1999) Immunoregulation of Th cells by naturally processed peptide antagonists.
J Immunol; 162:1-4

Catmull J, Wilson ME, Kirchhoff LV, Metwali A, Donelson JE (1999) Induction of specific cell-mediated immunity in mice by oral immunization with Salmonella expressing Onchocerca volvulus glutathione S-transferase.
Vaccine; 17:31-9

Chandrashekar R, Rao UR, Subrahmanyam D (1985) Serum dependent cell-mediated immune reactions to Brugia pahangi infective larvae.
Parasite Immunol; 7:633-41

Chomocynski P, Sacchin N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-cholophorm extraction.
Anal.Biochem; 162, 156-159

Comoy EE, Vendeville C, Capron A, Thyphronitis G (1997) Infection with Salmonella typhimurium modulates the immune response to Schistosoma mansoni glutathione-S-transferase.
Infect Immun; 65:3261-6

Comoy EE, Capron A, Thyphronitis G (1998) Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the Schistosoma mansoni Sm28-GST.
Scand J Immunol; 47:444-52

Curtis R, Kelly SM, Tinger SA, Tacket CO, Levine MM, Srinivasan J, Koopman M (1994) Recombinant Salmonella vectors in vaccine development
In Brown F (ed): Dev Biol Stand. Basel, Karger

Dafa'alla TH, Ghalib HW, Abdelmageed A, Williams JF (1992) The profile of IgG and IgG subclasses of onchocerciasis patients.
Clin Exp Immunol; 88:258-63

Darcy F, Maes P, Gras-Masse H, Auriault C, Bossus M, Deslee D, Godard I, Cesbron MF, Tartar A, Capron A (1992) Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic
J Immunol; 149:3636-41

Darji A, Guzman CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S (1997) Oral somatic transgene vaccination using attenuated S. typhimurium
Cell; 91:765-75

Deavin AJ, Auton TR, Greaney PJ (1996) Statistical comparison of established T-cell epitope predictors against a large database of human and murine antigens.
Mol Immunol; 33:145-55

DeLisi C, Berzofsky JA (1985) T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures.
Proc Natl Acad Sci U S A;82:7048-52

de Oliveira GA, Clavijo P, Nussenzweig RS, Nardin EH (1994) Immunogenicity of an alum-adsorbed synthetic multiple-antigen peptide based on B- and T-cell epitopes of the Plasmodium falciparum CS protein: possible vaccine application.
Vaccine; 12: 1012-7

Elson LH, Calvopina M, Paredes W, Araujo E, Bradley JE, Guderian RH, Nutman TB (1995) Immunity to onchocerciasis: putative immune persons produce a Th1-like response
J Infect Dis; 171:652-8

Finkelman F, Pearce E, Urban F, Sher A. (1991) Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses.
Immunol.Today 12, A62-66

Francis H, Awadzi K, Ottesen EA (1985) The Mazzotti reaction following treatment of onchocerciasis with: clinical severity as a function of infection intensity.
Am J Trop Med Hyg; 34:529-36

Frank R (1992) Spot synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support.
Tetrahedron 48:9217-9232

Freedman DO, Nutman, TB. and Ottensen, EA. (1989) Protective immunity in bancroftian filariasis. Selective recognition of a 43-kDa larval stage antigen by infection-free individuals in an endemic area. J. Clin. Inv. 83, 14-22.

Fuhrman, J., Urioste, S., Hamill, B., Spielman, A. & Piessens, W. (1987) Functional and antigenic maturation of Brugia malayi microfilariae. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 36, 70-74.

Fuhrman JA, Lane WS, Smith RF, Piessens WF, Perler FB (1992) Transmission-blocking antibodies recognize microfilarial chitinase in brugian lymphatic filariasis.
Proc Natl Acad Sci U S A; 89:1548-52

Fuhrman, J. A. (1995) Filariasis: The role of chitinase in larval development and transmission. In Komuniecki, R. (ed.): Molecular Approaches to Parasitology, Wiley-Liss Inc.,pp. 77-87.

Gallin M, Edmonds K, Ellner JJ, Erttmann KD, White AT, Newland HS, Taylor HR, Greene BM (1988) Cell-mediated immune responses in human infection with Onchocerca volvulus.
J Immunol; 140:1999-2007

Godard I, Estaquier J, Zenner L, Bossus M, Auriault C, Darcy F, Gras-Masse H, Capron A (1994) Antigenicity and immunogenicity of P30-derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. Mol Immunol; 31:1353-63

Gooday GW, Brydon LJ, Chappel LH. (1988) Chitinase in female Onchocerca gibsoni and its inhibition by allosamidin.
Mol. Biochem. Parsitol 29, 223-225.

Greene BM, Fanning MM, Ellner JJ (1983) Non-specific suppression of antigen-induced lymphocyte blastogenesis in Onchocerca volvulus infection in man.
Clin Exp Immunol; 52: 259-65

Greene BM, Gbakima AA, Albiez EJ, Taylor HR (1985) Humoral and cellular immune responses to Onchocerca volvulus infection in humans.
Rev Infect Dis; 7:789-95

Hakala BE, White C, Recklies AD (1993) Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family.
J Biol Chem; 268:25803-10

Harrison RA, Wu Y, Egerton G, Bianco AE (1999) DNA immunisation with Onchocerca volvulus chitinase induces partial protection against challenge infection with L3 larvae in mice.
Vaccine; 18:647-655

Hartmann S, Kyewski B, Sonnenburg B, Lucius R (1997) A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production.
Eur J Immunol; 27:2253-60

Haslam SM, Houston KM, Harnett W, Reason AJ, Morrist HR, Dell A (1999) Structural studies of N-Glycans of filarial parasites
J Bio Chem 274, 20953-20960

Henrissat B (1990) Weak sequence homologies among chitinases detected by clustering analysis.
Protein Seq Data Anal; 3:523-6

Inuoe H, Nojima H, Okayama H (1990) High effiency transformation of Escherichia coli with plasmids
Gene, 96: 23

Jenkins RE, Taylor MJ, Gilvary N, Bianco AE (1996) Characterization of a secreted antigen of Onchocerca volvulus with host-protective potential.
Parasite Immunol 18:29-42

Jones BD, Falkow S (1996) Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants.
Annu Rev Immunol; 14:533-61

Justus, D. & Ivey, M. (1969) Chitinase activity in developmental stages of Ascaris suum and its inhibition by antibody.
J. Parasitol. 55, 472-476.

Kaltmann, B. (1990). Ph.D Thesis, Faculty of Biology, University of Heidelberg.

Khan CM, Villarreal-Ramos B, Pierce RJ, Demarco de Hormaeche R, McNeill H, Ali T, Chatfield S, Capron A, Dougan G, Hormaeche CE (1994) Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the Schistosoma mansoni peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in a live aro-attenuated vaccine strain of Salmonella.
Immunol; 153:5634-42

King CL, Nutman TB (1991) Regulation of the immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis.
Immunol Today; 12: A54-8

Klimpel GR, Asuncion M, Haithcoat J, Niesel DW (1995) Cholera toxin and Salmonella typhimurium induce different cytokine profiles in the gastrointestinal tract.
Infect Immun; 63:1134-7

Kolaskar AS, Tongaonkar PC (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens.
FEBS Lett; 276:172-4

Kramer A, Schuster A, Reineke U, Malin R, Volkmer-Engert R, Landgraf C, Schneider-Mergener J (1994) Combinatorial cellulose-bound peptide libraries: screening tool for the identification of peptides that bind ligands with predefined specificity.
METHODS (Comp Meth Enzymol) 6:388-3

Kramer A, Schneider-Mergener J (1998) Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports.
Methods Mol Bio; 87:25-39

Kulane A, Siddique AB, Sarthou JL, Tall A, Dieye A, Perlmann H, Perlmann P, Troye-Blomberg M, Ahlborg N (1999) Human immune responses to the highly repetitive Plasmodium falciparum antigen Pf332.
Am J Trop Med Hyg; 61:141-8

Kuranda, MJ and Robbins, PW (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of Saccharomyces cerevisiae.
J Biol Chem 266, 19758-19767.

Kutubuddin M, Kolaskar AS, Galande S, Gore MM, Ghosh SN, Banerjee K (1991) Recognition of helper T cell epitopes in envelope (E) glycoprotein of Japanese encephalitis, west Nile and Dengue viruses.
Mol Immunol; 28:149-54

Lal RB, Ottesen EA (1989) Phosphocholine epitopes on helminth and protozoal parasites and their presence in the circulation of infected human patients.
Trans R Soc Trop Med Hyg; 83:652-5

Lange AM, Yutanawiboonchai W, Scott P, Abraham D (1994) IL-4- and IL-5-dependent protective immunity to Onchocerca volvulus infective larvae in BALB/cBYJ mice.
J Immunol; 153:205-11

Leclerc C, Ronco J (1998) New approaches in vaccine development.
Immunol Today; 19:300-2

Lee CA, Falkow S (1990) The ability of Salmonella to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state.
Proc Natl Acad Sci U S A;87:4304-8

Lewis PJ, Babiuk LA (1999) DNA vaccines: a review.
Adv Virus Res; 54:129-88

Liljeqvist S, Stahl S (1999) Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines.
J Biotechno l30:1-33

Liu F, Ooi VE, Fung MC (1999) Analysis of immunomodulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides.
Life Sci, 64:1005-11

Lucius R, Textor G, Kern A, Kirsten C (1991) Acanthocheilonema viteae: vaccination of jirds with irradiation-attenuated stage-3 larvae and with exported larval antigens.
Exp Parasitol; 73: 184-96

Lucius R, Textor G (1995) Acanthocheilonema viteae: rational design of the life cycle to increase production of parasite material using less experimental animals.
Appl Parasitol; 36:22-33

Locksley RM (1994) Th2 cells: help for helminths.
J Exp Med;179:1405-7

Meyer CG, Gallin M, Erttmann KD, Brattig N, Schnittger L, Gelhaus A, Tannich E, Begovich AB, ErlicHA, Horstmann RD (1994) HLA-D alleles associated with generalized disease, localized disease and putative immunity in *Onchocerca volvulus* infection.
Proc Natl Acad Sci U S A; 91:7515-9

McHugh S, Deighton J, Rifkin I, Ewan P (1996) Kinetics and functional implications of Th1 and Th2 cytokine production following activation of peripheral blood mononuclear cells in primary culture.
Eur J Immunol; 26:1260-5

Moudgil KD, Sercarz EE, Grewal IS (1998) Modulation of the immunogenicity of antigenic determinants by their flanking residues.
Immunol Today; 19:217-20

Mukkur TK, McDowell GH, Stocker BA, Lascelles AK (1987) Protection against experimental salmonellosis in mice and sheep by immunisation with aromatic-dependent Salmonella typhimurium.
J Med Microbiol; 24:11-9

Murray JS (1998) How the MHC selects Th1/Th2 immunity.
Immunol Today; 19:157-63

Ngu JL (1978) Immunological studies on onchocerciasis. Varying skin hypersensitivity and leucocyte migration inhibition in a clinical spectrum of the disease.
Acta Trop; 35:269-79

Nutman T, Kumaraswami V, Ottensen E (1987) Parasite specific anergy in human filariasis.
J Clin Inv 79, 1516-1523

Oxer MD, Bentley CM, Doyle JG, Peakman TC, Charles IG, Makoff AJ (**1991)** High level heterologous expression in E. coli using the anaerobically-activated nirB promoter.
Nucleic Acids Res; 19:2889-92

Piessens WF, Ratiwayanto S, Tuti S, Palmieri JH, Piessens PW, Koiman I,
Dennis DT (1980) Antigen-specific suppressor cells and suppressor factors in human filariasis with *Brugia malayi.*
N Engl J Med; 302:833-7

Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD (1995) Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs.
Int Immunol; 7:517-23

Qiaexpressionist (1999) A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins
Qiagen, März **1999**,

Raghavan, N., Freedman, DO, Fitzgerald, PC, Unnasch, TR, Ottesen, EA & Nutman, TB (1994) Cloning and characterization of a potentially protective chitinase-like recombinant antigen from Wuchereria bancrofti.
Infect Immun 62: 1901-1908.

Rammensee HG, Friede T, Stevanoviic S (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing.
Immunogenetics ;41:178-228

Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Rihs HP, Kalbacher H, Liebers V, Baur X (1998) Analysis of T-cell reactive regions and HLA-DR4 binding motifs on the latex allergen Hev b 1 (rubber elongation factor).
Clin Exp Allergy; 28:339-48

Reyes VE, Fowlie EJ, Lu S, Phillips L, Chin LT, Humphreys RE, Lew RA (1990) Comparison of three related methods to select T cell-presented sequences of protein antigens.
Mol Immunol; 27: 1021-7

Reyes VE, Lew RA, Lu S, Humphreys RE (1991) Prediction of alpha helices and T cell-presented sequences in proteins with algorithms based on strip-of-helix hydrophobicity index.
Methods Enzymol, 202:225-38

Rothbard J. B. and Taylor, W. R. (1988) A sequence pattern common to T cell epitopes.
EMBO Journal 7, 93-100.

Sambrook J, Fritsche E, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual; Cold Spring Habor Laboratory Press, New York

Schild H, Gruneberg U, Pougialis G, Wallny HJ, Keilholz W, Stevanovic S, Rammensee HG (1995) Natural ligand motifs of H-2E molecules are allele specific and illustrate homology to HLA-DR molecules.
Int Immunol; 7:1957-65

Schulz-Key H, Albiez W, Büttner DW (1977) Isolation of living adult Onchocerca volvulus from noduls.
Tropenmed. Parasitol, 28, 428-430

Seeber F, Brattig N, Soboslay PT, Pogonka T, Lorz A, Strote G, Beck E, Titanji VP, Lucius R (1993) Characterization of a recombinant T cell and B cell reactive polypeptide of Onchocerca volvulus.
J Immunol; 150:2931-44

Soboslay PT, Dreweck CM, Hoffmann WH, Luder CG, Heuschkel C, Gorgen H, Banla M, Schulz-Key H (1992) Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia, cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment
Clin Exp Immunol; 89:407-13

Stewart GR, Elson L, Araujo E, Guderian R, Nutman TB, Bradley JE (1995) Isotype-specific characterization of antibody responses to Onchocerca volvulus in putatively immune individuals.
Parasite Immunol; 17:371-80

Stille CJ, Thomas LJ, Reyes VE, Humphreys RE (1987) Hydrophobic strip-of-helix algorithm for selection of T cell-presented peptides.
Mol Immunol; 24: 1021-7

Streyer L (1997): „Biochemie“
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

Strote G, Bonow I (1991) Morphological demonstration of essential functional changes after in vitro and in vivo transition of infective Onchocerca volvulus to the post-infective stage.
Parasitol Res, 77:526-35

Strugnell R, Dougan G, Chatfield S, Charles I, Fairweather N, Tite J, Li JL, Beesley J, (1992) Characterization of a Salmonella typhimurium aro vaccine strain expressing the P.69 antigen of Bordetella pertussis.
Infect Immun; 60:3994-4002

Svensson M, Pfeifer J, Stockinger B, Wick MJ (1997) Bacterial antigen delivery systems: phagocytic processing of bacterial antigens for MHC-I and MHC-II presentation to T cells.
Behring Inst Mitt; 5: 197-211

Takita-Sonoda Y, Tsuji M, Kamboj K, Nussenzweig RS, Clavijo P, Zavala F (1996)
Plasmodium yoelii: peptide immunization induces protective CD4+ T cells against a previously unrecognized cryptic epitope of the circumsporozoite protein.
Exp Parasitol; 84:223-30

Takahashi H, Cease KB, Berzofsky JA (1989) Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein.
J Immunol; 142:2221-9

Tayebi H, Lienard A, Billot M, Tiberghien P, Herve P, Robinet E (1999) Detection of intracellular cytokines in citrated whole blood or marrow samples by flow cytometry.
Immunol Methods; 229:121-130

Taylor MJ, Abdel-Wahab N, Wu Y, Jenkins RE, Bianco AE (1995) Onchocerca volvulus larval antigen, OvB20, induces partial protection in a rodent model of onchocerciasis.
Infect Immun; 63:4417-22

Taylor MJ, Jenkins RE, Bianco AE (1996) Protective immunity induced by vaccination with Onchocerca volvulus tropomyosin in rodents.
Parasite Immunol 18:219-25

Tellam RL (1996) Protein motifs in filarial chitinases: An alternative view.
Parasitol today, 12, 291-292

Toebe CS, Clements JD, Cardenas L, Jennings GJ, Wiser MF (1997) Evaluation of immunogenicity of an oral Salmonella vaccine expressing recombinant Plasmodium berghei merozoite surface protein.
Am J Trop Med Hyg; 56:192-9

Urban JF Jr, Madden KB, Svetic A, Cheever A, Trotta PP, Gause WC, Katona IM, Finkelman FD (1992) The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes.
Immunol Rev; 127:205-20

Venegas A, Goldstein JC, Beauregard K, Oles A, Abdulhayoglu N. & Fuhrman JA (1996) Expression of recombinant microfilarial chitinase and analysis of domain function.
Mol Biochem Parasitol 78, 149-159.

Wang SH, Zheng HJ, Dissanayake S, Cheng WF, Tao ZH, Lin SZ, Piessens WF (1997) Evaluation of recombinant chitinase and SXP1 antigens as antimicrofilarial vaccines.
Am J Trop Med Hyg; 56:474-81

Ward DJ, Nutman TB, Zea-Flores G, Portocarrero C, Lujan A, Ottesen EA (1988) Onchocerciasis and immunity in humans: enhanced T cell responsiveness to parasite antigen in putatively immune individuals.
J Infect Dis; 157:536-43

Ward, K. & Fairbairn, D. (1972) Chitinase in developing eggs of Ascaris suum (Nematoda).
J Parasitol 58, 546-549.

Warbrick WV, Dearman RJ, Basketter DA, Gerberick GF, Ryan CA, Kimber I (1998) Analysis of cytokine mRNA expression following repeated exposure of mice to chemical contact and respiratory allergens.
J Appl Toxicol, 18, 205-213

Watanabe T, Uchida M, Kobori K, Tanaka H (1994) Site-directed mutagenesis of the Asp-197 and Asp-202 residues in chitinase A1 of Bacillus circulans WL-12.
Biosci Biotechnol Biochem; 58:2283-5

Wenger DJ, Forsyth KP, Kazura JW (1988) Identification of Phosphorylcholine epitope-containig antigensin Brugia malayi and relation of serum epitope levels to infection status of jirds with brugian filariasis.
Am J Trop Med Hyg 38, 133-141

WHO (1987) Expert Committee on Onchocerciasis Control. WHO Technical Report Series 752, Geneva

Willenbucher J, Hofle W, Lucius (1993) The filarial antigens Av33/Ov33-3 show striking similarities to the major pepsin inhibitor from Ascaris suum.
Mol Biochem Parasitol; 57:349-51

Wolowczuk I, Auriault C, Bossus M, Boulanger D, Gras-Masse H, Mazingue C, Pierce RJ, Grezel D, Reid GD, Tartar A (1991) Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the Schistosoma mansoni Sm-28 GST antigen in rat, mouse, and monkey. Partial protection of Fischer rat after active immunization.
J Immunol; 146:1987-95

Wu Y, Adam R, Williams SA, Bianco AE (1996) Chitinase genes expressed by infective larvae of the filarial nematodes, Acanthocheilonema viteae and Onchocerca volvulus.
Mol Biochem Parasitol; 75:207-19

Abkürzungen

abs.	absolut
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
APC	Antigen präsentierende Zellen
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
Av	*Acanthoceilonema viteae*
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
cfu	Kolonie bildende Einheiten
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
Con A	*Concanavalin A*
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
Da	Dalton
DEC	Dethylcarbamazine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAse	Desoxyribonukleinase
DNTP	Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (enzyme linked immunosorbent assay)
FCS	fötales Kälberserum
FACS	Fluorescent activated cell sorter
g	rel. Zentrifugalbeschleunigung
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromathographie
Ig	Immunglobulin

INF-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
L3	infektiöse Drittlarve
L4	viertes Larvenstadium
LB	Luria Bertrani-Broth Medium
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MHC	Haupthistokompartibilitäts-Komplex (major histocompartibility complex)
mA	Milliamper
mAK	monoklonaler Antikörper
2-ME	ß-Mercapthoethanol
Mf	Mikrofilarie
mM	Millimolar
MMLV	Moloney murine leukemia virus
µCi	Mikro-Curie
mRNA	messenger RNA
NC	Nitrozellulose
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OvAg	*O. volvulus* Gesamtantigen
OvL3-CBD	Chitin-Binde-Domäne der Chitinase infektiöser Drittlarven
OvL3-Chitinase	Chitinase der infektiösen Drittlarven
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Mononukleäre Zellen des pheripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline (Phophatpuffer)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PI	vermeintlich Immune
p.i.	nach Infektion

primer	Oligonukleotid als Starter für die Polymerase-Ketten-Reaktion
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Kulturmedium
RSA	Rinderserumalbumin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase mit anschließender Polymerase Kettenreaktion
SAP	Shrimps alkalische Phosphatase
s.c.	unter die Haut (subcutan)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SI	Stimulationsindex
SL-O	Streptolysin O; Antigen aus *Streptococcus pyrogenes*
STP	Adjuvans aus Squalane, Tween 80 und Pleuronic
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TetC	Tetanus-Toxin-Fragment
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TH-Zellen	T-Helferzellen
TMB	Tetramethylbenzidin
U	Unit (1 U: Umsatz von 1 Mol Substrat/min)
Ü/N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den 4.1.2000 Birgit Drabner

Tagungsbeiträge und Publikationen

10/1995 1. Europäischer Kongreß für Tropenmedizin, Hamburg, Deutschland

Vortrag zum Thema: „The consequences of prenatal exposure to *Onchocerca volvulus”*.

11/1995 Jahrestagung der österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie, Wien, Österreich

Vortrag zum Thema: „Immun-Epidemiologie von Filarien?: Welchen Einfuß hat der prenatale Kontakt von *Onchocerca volvulus* auf die Ausprägung der späteren Infektion“.

3/1997 4. Deutscher Kongreß für Infektions- und Tropenmedizin, Berlin, Deutschland

Poster zum Thema: „Klonierung, Charakterisierung und Evaluierung des protektiven Potentials der Chitinase der Drittlarven von *Onchocerca volvulus*“.

9/1997 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin, Heidelberg, Deutschland

Poster zum Thema: „Klonierung, Charakterisierung und Evaluierung des protektiven Potentials von Filarien Chitinasen und deren Domänen“.

3/1998 18. Tagung der deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Dresden, Deutschland

Poster zum Thema: „Charakterisierung und Identifizierung von immundominanten Bereichen der *O. volvulus*-L3-Chitinase“.

11/1998 Seminar über Filariasis, Hamburg, Deutschland

Vortrag zum Thema: „Charakterisierung und Identifizierung von T-Zell Epitopen innerhalb der *O. volvulus*-L3-Chitinase“.

4/2000 19. Tagung der Gesellschaft für Parasitologie, Hohenheim, Deutschland

Vortrag zum Thema: Mapping of T-cell epitopes of the chitinase of *O. volvulus*-L3

Drabner B, Soboslay PT, Kowu L, Stadler A, Schulz-Key H (1996)

Immunologische Konsequenzen der maternalen Infektion mit *Onchocerca volvulus* bei Neugeborenen. Mitt. Österr. Ges. Tropmed. Parasit. 161-168

Soboslay PT, Geiger SM, Drabner B, Banla M, Batchassi E, Kowu LA, Stadler A, Schulz-Key H (1999) Prenatal immune priming in onchocerciasis-*Onchocerca volvulus*-specific cellular responsiveness and cytokine production in newborns from infected mothers**.**
Clin Exp Immunol; 117:130-7

Adam R, Drabner B and Lucius R Filarial Chitinases in Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology**.** Eds: M. W. Kennedy and W. Harnett, CABI Publishing (in press)

Drabner B, Reineke U, Schneider-Mergener J, Stevanovic J, Humphreys RE und R. Lucius
Mapping of T-cell epitopes of the L3-chitinase of *O. volvulus* (in Vorbereitung)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie der Humboldt-Universität Berlin angefertigt. Prof. Dr. Lucius möchte ich für die Betreuung der Arbeit, seine Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Arbeit danken.

Dr. R. Adam danke ich für die Überlassung des Themas.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schneider-Mergener, insbesondere Dr. U. Reineke, danke ich für die Synthese und Bereitstellung der synthetischen Peptide und die fachliche Unterstützung während der Experimente.

Dem gesamten Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die hilfreichen Diskussionen und die Unterstützung, auch in nicht ganz einfachen Zeiten. Mein besonderer Dank gilt Dr. M. von Nickisch, der mich in die Geheimnisse der Molekularbiologie einweihte, Dr. Th. Pogonka, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und Dr. S. Hartmann, die im Labor alles in die rechten Bahnen lenkte.

Für die tägliche Unterstützung, die aufbauenden Worte und die vielen persönlichen Gespräche möchte ich mich besonders bei Bettina, Steffi, Ruth und Sandra bedanken; ohne sie wäre der Laboralltag nur halb so schön gewesen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meinem Freund Volker, die mich in der ganzen Zeit unterstützt haben, wo sie nur konnten.

Lebenslauf

Name	**Birgit Drabner**
Geburtsdatum und -ort	**05.08.1969 in Kiel**
Promotion	
Seit 1996	**Promotion am Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie, Humboldt-Universität, Berlin** über das Thema: "Identifizierung und Charakterisierung von immundominanten Bereichen der L3-Chitinase von *Onchocerca volvulus*"
Studium	
1995-1996	**Diplomarbeit am Institut für Tropenmedizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen** über das Thema: „Immunologische Konsequenzen einer diaplazentaren Übertragung von *Onchocerca volvulus*"
1993-1995	**Hauptstudium an der Philipps-Universität Marburg**
1991-1993	**Grundstudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel**
1995	**Kursus für Tropen- und Reisemedizin am Institut für Tropenmedizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**
Auslandsaufenthalte	
1/1995-3/1995 und 1/1996 4/1996	**Feldstudien in Togo/Westafrika**
4/1998-6/1998	**Feldstudien in Kamerun /Westafrika**
Berufsausbildung	
1991/1992	Nebenbeschäftigung als MTA am Institut für Immunologie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
1990-1991	Anstellung als MTA am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, in der Abteilung Klinische Forschung
1988-1990	Ausbildung als Medizinisch-Technische Assistentin am Hygiene Institut Kiel
Schulbildung	
197-1988	Grundschule und Gymnasium in Kiel, Abschluß: Abitur