

**Identifizierung und Charakterisierung von  
gewebsspaltenden Proteinasen bei  
parasitären Nematoden**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
des Departments Biologie  
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von  
Nadine Borchert  
Hamburg**

**Hamburg 2006**

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. N. BRATTIG  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ  
Tag der Disputation: 06. Oktober 2006

Hamburg, den 19. September 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Lieberei'.

Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Onchocerca volvulus</i> ist der Erreger der Onchozerkose .....	1
1.1.1	Der Lebenszyklus von <i>O. volvulus</i> .....	1
1.1.2	Krankheitsformen der Onchozerkose.....	3
1.2	<i>Brugia malayi</i> ist ein Erreger der lymphatischen Filariasis.....	5
1.3	Die Rolle von Proteinasen in parasitären Nematoden .....	6
1.4	Die Astacin-Familie der Metallproteinasen.....	8
1.5	<i>Strongyloides ratti</i> als Modellorganismus für parasitäre Nematoden.....	10
1.6	Die Rolle der Vakzinentwicklung bei der Bekämpfung parasitärer Nematoden .	12
1.7	Fragestellung .....	13
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Geräte.....	14
2.1.2	Puffer und Lösungen .....	15
2.1.3	Kulturmedien und Medienzusätze.....	19
2.1.4	Zellkulturen .....	20
2.1.5	Parasiten, Ratten, Bakterienstämme .....	21
2.1.6	Nukleinsäuren.....	22
2.1.7	Immunreagenzien .....	24
2.1.8	Patientenseren.....	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Allgemeine molekularbiologische Arbeiten .....	25
2.2.1.1	Isolierung von genomischer DNA.....	25
2.2.1.2	Isolierung von RNA.....	25
2.2.1.3	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	26
2.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	26
2.2.1.5	Präzipitation von Nukleinsäuren .....	26
2.2.1.6	Polymerasekettenreaktion.....	27
2.2.1.7	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	27
2.2.1.8	Sequenzierung von DNA.....	28
2.2.1.9	DNA-Restriktion durch Endonukleasen .....	28
2.2.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten .....	28
2.2.1.11	Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese) .....	29
2.2.1.12	Southern Blotting.....	29
2.2.2	Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	31

2.2.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	31
2.2.2.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien und Transformation	31
2.2.2.3	Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab.....	32
2.2.2.4	Plasmid-Präparationen im großen Maßstab .....	32
2.2.2.5	cDNA Phagenbank-Titer erstellen.....	32
2.2.2.6	cDNA Phagenbank Screening.....	33
2.2.2.7	<i>In vivo</i> -Exzision der Plasmid-DNA aus dem Bakteriophagen.....	34
2.2.2.8	Überexpression in <i>E. coli</i> .....	34
2.2.3	Rekombinante Expression mit dem Baculovirus-System .....	35
2.2.3.1	Zellkultur.....	35
2.2.3.2	Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA .....	35
2.2.3.3	Isolierung rekombinanter Bacmid-DNA.....	36
2.2.3.4	Transfektion von Sf9-Zellen.....	36
2.2.3.5	Amplifikation von rekombinanten Viren in Sf9-Zellen.....	36
2.2.4	Larvengewinnung von <i>S. ratti</i> nach der Baermann-Methode.....	37
2.2.5	Allgemeine biochemische Methoden.....	37
2.2.5.1	Reinigung der rekombinant exprimierten Proteine durch Nickel-Chelat Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen.....	37
2.2.5.2	Reinigung der rekombinanten Proteine durch Glutathion- Affinitätschromatographie .....	38
2.2.5.3	Reinigung der rekombinanten Proteine durch MBP- Affinitätschromatographie .....	38
2.2.5.4	Reinigung rekombinant exprimierter Proteine aus dem Baculovirus- System mittels Ni-NTA-Agarose unter nativen Bedingungen.....	39
2.2.5.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford .....	39
2.2.5.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen.....	40
2.2.5.7	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung und Gel Trocknung.....	41
2.2.5.8	Silber-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	41
2.2.6	Protease Assays .....	41
2.2.6.1	Gelatine Substratgelelektrophorese .....	41
2.2.6.2	Gelatine Mikrotiter Assay.....	42
2.2.6.3	Substrat-Verdau .....	42
2.2.7	Immunologische Nachweise .....	42
2.2.7.1	Herstellung von Kaninchen-Antikörpern.....	42
2.2.7.2	Western Blot-Analysen.....	43

2.2.7.3	ELISA (Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay).....	44
2.2.7.4	Immunhistologie.....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
3.1	Identifizierung eines für eine Metallproteinase kodierenden Gens von <i>O. volvulus</i> ..	46
3.1.1	PCR-Versuche zur Identifizierung der Nukleotidsequenz mit Hilfe von cDNA-Bibliotheken .....	46
3.1.2	Sequenzanalyse der <i>O. volvulus</i> -Metallproteinase .....	49
3.1.3	Phylogenetische Analyse des Onchoastacins .....	50
3.1.4	Dreidimensionale Struktur des Onchoastacins.....	54
3.1.5	Analyse des Transkriptionsmuster des Onchoastacins .....	55
3.1.6	Prokaryotische Expression der Metallproteinase.....	58
3.1.6.1	Expression mit His-Tag und Signalpeptid .....	58
3.1.6.2	Expression mit Glutathion S-Transferase-Tag .....	58
3.1.6.3	Expression mit dem Maltose-Bindenden-Protein (MBP) .....	60
3.1.6.4	Aktivitätstest mit dem prokaryotisch exprimierten Onchoastacin .....	62
3.1.7	Expression im Baculovirus-System .....	63
3.1.7.1	Aktivitätsnachweis durch Substratgelelektrophorese.....	63
3.1.7.2	Aktivitätsnachweis durch Substratverdau .....	64
3.1.8	Immunologische Nachweise des Onchoastacins.....	65
3.1.8.1	Herstellung eines Antikörpers .....	65
3.1.8.2	Antikörper in Patientenseren gegen rekombinantes Onchoastacin und Onchoastacin-Peptide.....	66
3.1.8.3	Immunhistologie.....	68
3.2	Identifizierung des Onchoastacin-Orthologs aus <i>Strongyloides ratti</i> .....	70
3.2.1	Gewinnung der Nukleotidsequenz und bioinformatische Analyse .....	70
3.2.2	Differenzielle Genexpression in verschiedenen Entwicklungsstadien.....	72
3.3	Versuche zur Identifizierung einer Serinproteinase aus <i>O. volvulus</i> .....	73
3.4	Identifizierung eines für eine Serinproteinase kodierenden Gens von <i>B. malayi</i> ....	74
3.4.1	Durchmustern einer cDNA-Bank zur Findung des Volllängenktons .....	74
3.4.2	Sequenzanalyse der <i>B. malayi</i> -Serinproteinase .....	75
3.4.3	Prokaryotische Expression der Serinproteinase.....	77
3.4.3.1	Expression als His-Tag-Fusionsprotein.....	77
3.4.3.2	Expression mit dem MBP-System.....	78
3.4.3.3	Immunologische Nachweise der <i>B. malayi</i> -Serinproteinase.....	79

3.5	Durchmusterung von <i>O. volvulus</i> cDNA-Banken nach der orthologen Serinproteinase.....	79
4	<i>Diskussion</i> .....	80
4.1	Onchoastacin.....	81
4.1.1	Identifizierung.....	81
4.1.2	Charakterisierung.....	84
4.1.3	Immunologische Untersuchungen.....	87
4.1.4	Relevanz des Onchoastacins.....	89
4.2	<i>S. ratti</i> -Astacin.....	90
4.3	Die Serinproteinase von <i>B. malayi</i> .....	91
5	<i>Zusammenfassung</i> .....	95
6	<i>Literatur</i> .....	97
7	<i>Danksagung</i> .....	103

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMV	engl. <i>avian myeloma virus</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i> )
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
CSPD	Dinatrium-3-(4-Methoxy Spiro{1,2-Dioxethan-3,2'-(5'-Chloro)-tricyclo-[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl)-phenylphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxiribonucleotid, das N steht für A, T, G, C
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat, di-Natriumsalz
ELISA	Enzymgebundener Immunnachweis (engl. <i>enzym-linked immuno-sorbent assay</i> )
EtOH	Ethanol
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s <sup>2</sup> ; engl. <i>gravity</i> )
iFCS	inaktiviertes fetales Kälberserum (engl. <i>inactivated fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GST	Glutathion-S-Transferase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
h	Stunde (engl. <i>hour</i> )
HK	Hauptkultur
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. <i>horse raddish peroxidase</i> )
M	molar (Mol/l)
MBP	Maltose-bindendes Protein
mcs	Multiple Klonierungsstelle (engl. <i>multiple cloning site</i> )
min	Minute
mJ	Milli Joule
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NTA	Nitrilo-tri-acetic-acid
NZY	NZ amin (Casein Hydrolysat) und Hefeextrakt (engl. <i>yeast extract</i> )
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i> )
OD	Optische Dichte
orf	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )

PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque Forming Unit
pH	Wasserstoffionenkonzentration (lat. <i>potentia hydrogenii</i> )
POD	Peroxidase
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SDS	Natriumdecylsulfat (engl. sodiumdodecylsulfate)
sec	Sekunde (engl. second)
SSC	Natriumchlorid und Natriumcitrat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Trispuffer (engl. tris buffered solution)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFB	Transformationspuffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
ü.N.	über Nacht
U	Einheit (engl. unit)
UV	ultraviolett
V	Volt
VK	Vorkultur
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen (engl. weight per volume)
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

## 1 Einleitung

### 1.1 *Onchocerca volvulus* ist der Erreger der Onchozerkose

#### 1.1.1 Der Lebenszyklus von *O. volvulus*

Der Nematode *O. volvulus* gehört zur Ordnung Spirurida, Überfamilie Filarioidea, und ist der Erreger der Onchozerkose. Die sich frei in der Haut bewegenden Mikrofilarien können schwere Hautkrankheiten verursachen. Wandern die Mikrofilarien in die Augen, so kann es zur Gewebsschädigung bis zur Erblindung kommen. Daher wird die Krankheit auch als Flussblindheit bezeichnet. *O. volvulus* ist der zweithäufigste Erreger von infektiöser Blindheit. Der Parasit ist in Afrika, Lateinamerika und im Jemen endemisch. 120 Millionen Menschen sind dem Erreger *O. volvulus* ausgesetzt. Man ging von 18 Mio. Infizierten aus, von denen ca. 300000 erblindet sind (WHO 1995). Heute rechnet die WHO mit mehr als 30 Mio. Infizierten. Die größten endemischen Gebiete liegen in Zaire und Nigeria.

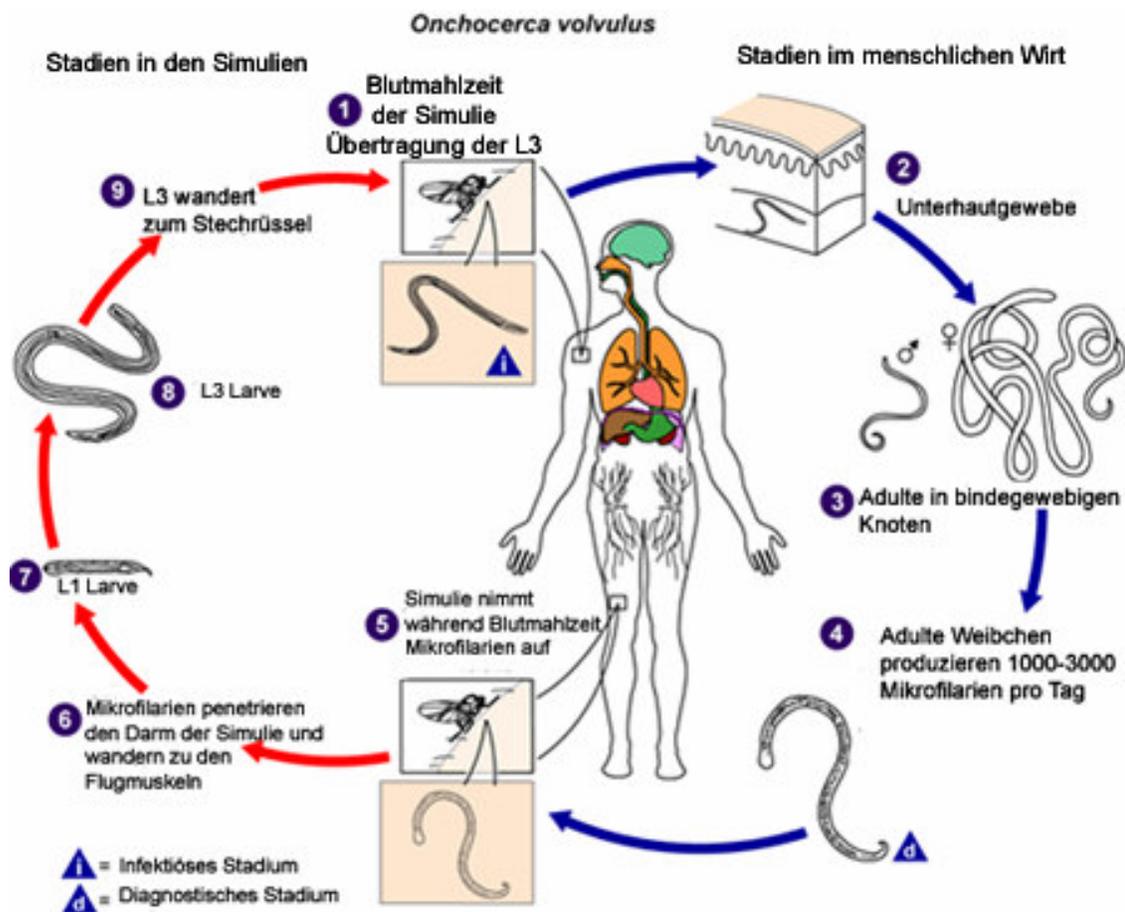


Abb. 1.1:

Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *O. volvulus* (Quelle: Homepage der Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control & Prevention).

Der Überträger von *O. volvulus* sind die Kriebelmücken der Gattung *Simulium*. Sie benötigen sauerstoffreiche, schnellfließende Gewässer als Brutplätze. Daher ist die Ausbreitung von *O. volvulus* lokal begrenzt und an Flüsse gebunden. In hyperendemischen Gebieten kann die Infektionsrate bei über 90 % liegen. Die Infektion erfolgt tagsüber durch eine Blutmahlzeit der Kriebelmücke. Nach der Blutmahlzeit wandern Infektionslarven (drittes Larvenstadium, L3) in die Bisswunde und können sich von dort aus ins Unterhautgewebe bewegen. Nach zwei Häutungen, über das L4-Stadium, entwickeln sich die jungen Adulten (siehe Abb. 1). Die Präpatenzzeit beträgt durchschnittlich 12-18 Monate, kann aber auch bis zu 3 Jahre dauern, da sich die Männchen (Länge 2 bis 8 cm, Durchmesser 0,1-0,2 mm) und Weibchen (Länge zwischen 20 und 60 cm, Durchmesser 0,25-0,45 mm) im Körper des Wirts finden müssen. Nach dieser Zeit bilden sich die ersten bindegewebigen Knoten, die meist im oberflächlichen Unterhautgewebe liegen, aber auch tiefer zu finden sind. In diesen Onchozerkomen leben die sessilen Weibchen, während die Männchen sich frei im Gewebe bewegen. Die Lebenserwartung der Makrofilarien beträgt bis zu siebzehn Jahre. Nach der Begattung fangen die Weibchen an, phasenweise 1000-3000 Mikrofilarien (L1, 0,3 mm Länge) pro Tag zu produzieren, die den Knoten verlassen und in die Dermis wandern, wo sie bei weiteren Blutmahlzeiten von Simulien aufgenommen werden können. Dabei verursacht die Simulie kleine Gewebsschädigungen in der Umgebung von Kapillaren, die es den Mikrofilarien ermöglichen, in die dadurch entstandene kleine Wunde um den Einstichkanal zu gelangen. Im Zwischenwirt angelangt, müssen die Mikrofilarien zunächst die Pharynxleisten passieren und dann die Wand des Mitteldarms penetrieren und durch das Haemocoel in die Flugmuskeln zu gelangen. Dort entwickeln sie sich intrazellulär über zwei Häutungen zur L3 weiter und wandern dann zurück zum Kopf des Zwischenwirts, wo sie sich in den Mundwerkzeugen sammeln. Diese Entwicklung dauert je nach Umgebungstemperatur ein bis zwei Wochen.

### 1.1.2 Krankheitsformen der Onchozerkose

Die Gattung *Onchocerca* verursacht hauptsächlich Infektionen in Huftieren und ist erst seit einigen tausend Jahren infektiös für den Menschen. Man geht davon aus, dass die evolutionäre Entwicklung noch nicht zu einer idealen Anpassung an den Wirt geführt hat, da *O. volvulus* zum Teil starke Immunpathologien im Menschen hervorruft. Es lassen sich im Hinblick auf die Infektion vier Gruppen unterscheiden: (1) Nicht infizierte Personen, die in *O. volvulus*-freien Gebieten leben, (2) Putativ immune Personen, da sie frei von Krankheit sind, obwohl sie jahrelang in endemischen Gebieten leben. Der Anteil an Frauen liegt in dieser Gruppe deutlich höher. (3) Infizierte Patienten mit einer generalisierten Form der Onchozerkose, und (4) hyperreaktive Patienten (Sowda-Form). Von der Infektion bis zur Entstehung der Onchozerkome sind die Patienten beschwerdefrei. Mit beginnender Mikrofilarienproduktion setzt die Besiedelung der Haut ein, die eine unterschiedlich ausgeprägte Onchodermatitis auslöst. Die Schwere der Symptome hängt wesentlich von der Wurmlast und der Wirtsreaktion ab, die unter anderem von genetischen Faktoren des Wirts bestimmt ist. So gibt es viele Patienten, die trotz hoher Parasitenlast nur leichte Symptome und Hautveränderungen aufweisen. Die späte generalisierte Onchozerkose zeichnet sich durch eine meist höhere Anzahl an Mikrofilarien (Mf) und Onchozerkomen und weniger schwere Hautveränderungen durch die Besiedelung der Haut mit Mikrofilarien aus. In hyperendemischen Dörfern beträgt die durchschnittliche Anzahl an Knoten pro Person zehn, es sind jedoch schon Individuen mit über 100 Knoten beobachtet worden.

Die Knoten beherbergen durchschnittlich 2-3 Weibchen und 1-2 Männchen, es sind allerdings auch schon Knoten mit 64 Weibchen entdeckt worden. Die Knotenbildung ist eine Abwehrreaktion des Wirts durch den ständigen Kontakt mit parasitären Proteinen. Der Wirt beginnt aufgrund der kontinuierlichen Reizung durch Fremdproteine mit der Infiltration des Gewebes um den Wurm mit bindegewebigen Zellen, Mastzellen, eosinophile und neutrophile Leukozyten und Makrophagen. Im Laufe der Zeit entsteht so ein Granulom mit einem unterschiedlich ausgeprägten inflammatorischen Infiltrat. Die Patienten produzieren spezifische IgG- und IgE-Antikörper (Brattig, 2004). Die Höhe der Mikrofilarienlast eines *O. volvulus* Infizierten kann bis zu 12 Millionen betragen. Bei leicht infizierten Personen beträgt die Anzahl sterbender Mikrofilarien 10 000 bis 20 000 pro Tag, während bei schwer infizierten Personen bis zu einer halben Million Mikrofilarien pro Tag zugrunde gehen (Duke, 1993). Die Mikrofilariendichte kann bei weniger als einer bis zu

mehreren Hundert Mf pro Milligramm Haut liegen. Liegt die Mikrofilariendichte bei 50 oder mehr Mf pro Milligramm Haut, so verringert sich die Lebenserwartung des Patienten um etwa zehn Jahre.

Eine Infektion durch *O. volvulus* löst eine zelluläre Immunantwort vom Typ Th2 -Typ aus. Dabei kommt es zur Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen, sowie zu einer starken Produktion von IgE-Antikörpern (Ottesen, 1995). Die erste Hautreaktion ist Juckreiz, sehr viel später folgt eine veränderte Pigmentation der Haut, wobei man Hyper- und Hypopigmentation beobachten kann. Es entstehen Pusteln und Kratzwunden, die Sekundärinfektionen nach sich ziehen können. Bei chronischer Infektion verliert die Haut ihre Elastizität und sie atrophiert. Fibrosierung und Verstopfung der Lymphgefäße können zu hängenden Leisten (*hanging groins*) führen (Stingl, 1997). Liegen Knoten im oberen Körperbereich, so ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Mikrofilarien in die Augen wandern. Sie können die Bindehaut, die Hornhaut und die hinteren Regionen des Auges befallen. Gehen die Mikrofilarien im Auge zugrunde, so kommt es zur Freisetzung somatischer Antigene, die eine Entzündungsreaktion verursachen, die zu Hornhauttrübung bis hin zu sklerosierenden Keratitis führen kann. Es wird angenommen, dass es genetisch verschiedene *O. volvulus*-Stämme gibt, deren Pathogenität unterschiedlich ist und die mit unterschiedlicher Prävalenz von Blindheit assoziiert sind (Zimmerman *et al.*, 1992).

Sowda-Patienten zeigen wenige große Onchozerkome mit starker perivaskulärer Infiltration, eine niedrige Mikrofilarienlast und eine starke lymphatische Reaktion. Die Lymphknoten schwellen an und die Lymphgefäße können teilweise verstopfen. Die Haut wird dicker und die Pigmentierung nimmt zu. Oft beschränken sich diese Symptome auf ein Bein. Viele der wenigen Mikrofilarien sind von Eosinophilen und Makrophagen umgeben. Sowda-Patienten sind in der Lage, aufgrund ihrer starken Immunantwort Mikrofilarien zu töten (Racz *et al.*, 1982).

## 1.2 *Brugia malayi* ist ein Erreger der lymphatischen Filariasis

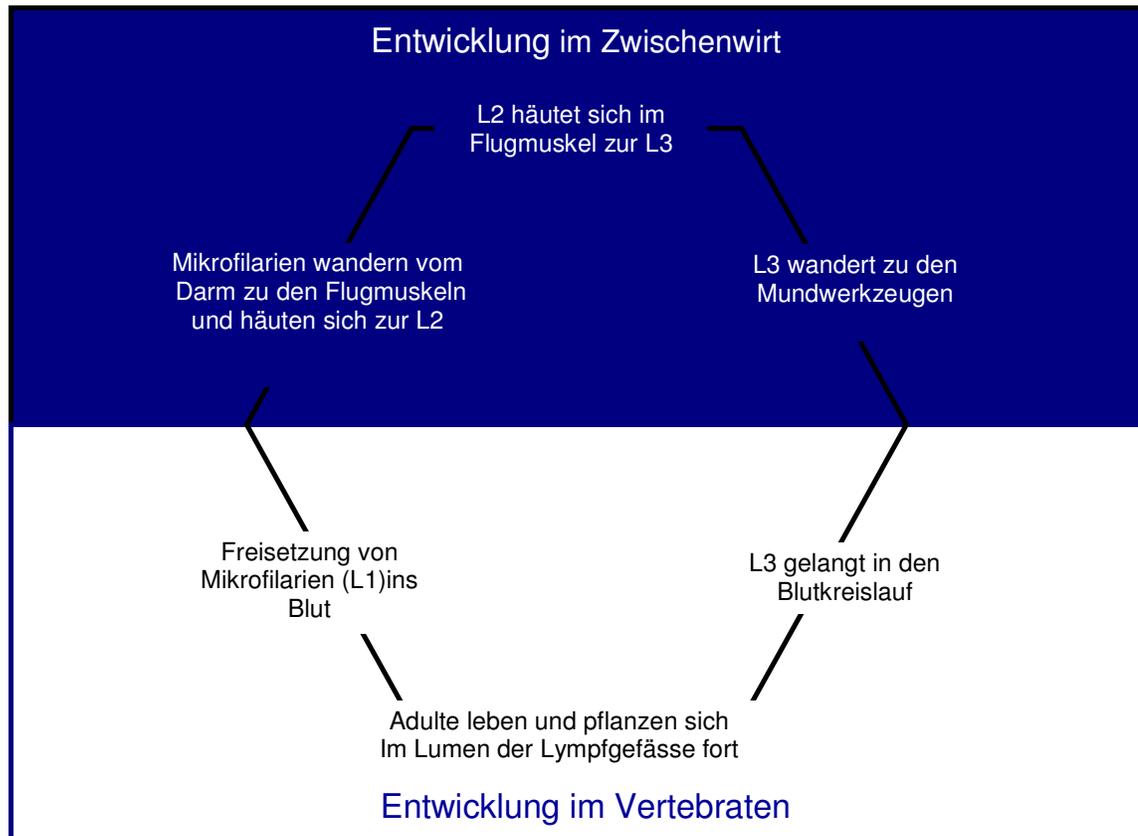


Abb. 1.2:  
Schematische Darstellung des Lebenszyklus lymphatischer Filarien

*B. malayi* ist einer der Erreger der lymphatischen Filariasis. Ungefähr 750 Millionen Menschen leben in endemischen Gebieten, davon sind ungefähr 150 Millionen infiziert, 91 % der Infektionen sind von *Wuchereria bancrofti* verursacht, die restlichen 9 % von *B. malayi* und *Brugia timori*. *B. malayi* ist in Süd- und Südostasien endemisch. Ihr Lebenszyklus verläuft ähnlich wie der von *O. volvulus*. Unterschiede finden sich im Überträger: *B. malayi* wird von den Gattungen *Anopheles*, *Aedes* und *Mansonia* übertragen. Die Infektionslarven wandern nach Übertragung in den Menschen von der Haut in die Lymphgefäße, wo sie sich ein weiteres Mal häuten und dann zu Adulten heranwachsen. Diese Entwicklung dauert je nach Art 3 oder 12 Monate. Es wird angenommen, dass der Parasit Elastasen und Kollagenasen benötigt, um durch die Haut in die Lymphgefäße zu gelangen. Die Lebensspanne der Adulten umfasst 5-10 Jahre, während der sie Millionen von Mikrofilarien produzieren. Diese befinden sich tagsüber in den kleinen Gefäßen der tiefen Gewebe, meist der Lunge, und wandern nachts zu den peripheren Blutgefäßen, so dass sie dort von Zwischenwirten aufgenommen werden können, die nur periodisch aktiv sind.

Die klinischen Manifestationen der lymphatischen Filariasis werden durch verschiedene Wirtsfaktoren beeinflusst. Lymphödeme und Elefantiasis sind die schwerwiegendsten Symptome. Sie kommen bei zwei Prozent und mehr der infizierten Personen in hochendemischen Gebieten vor (Lammie *et al.*, 2002). Elefantiasis ist durch Hyperplasie und Fibrose des subkutanen Gewebes gekennzeichnet. Diese Patienten zeigen eine erhöhte Anti-Filarien-Antwort, besonders zellvermittelte Immunantworten (Ottesen, 1977) und sind oft Mikrofilarien-negativ.

Nach *Caenorhabditis elegans* und *Caenorhabditis briggsae* ist *B. malayi* der dritte Nematode und der erste parasitische Nematode, dessen Genom vollständig sequenziert worden ist (Ghedin *et al.* 2004). Da *B. malayi* in Nagern kultiviert werden kann, stellt sie einen geeigneten Modellorganismus zur Untersuchung der Filariasis dar. Es gibt außerdem Tiermodelle in Katzen, Hunden, Frettchen und Primaten. Am weitesten verbreitet ist das *Brugia*-Gerbil-Modell.

### 1.3 Die Rolle von Proteinase in parasitären Nematoden

Proteolytische Enzyme spielen bei allen lebenden Organismen eine wichtige Rolle im Proteinstoffwechsel, Zellzyklus, in der Gewebsbildung und -umgestaltung, Zellwanderung, Fruchtbarkeit und Eisprung sowie Gefäßbildung, Blutstillung und Apoptose. Parasitäre Nematoden benötigen Proteinase, um im Wirt zu überleben. Eine wichtige Funktion der Proteinase von Helminthen ist die Invasion des Wirtsgewebes, Verdauung von Wirtspoteinen zur Nahrungsaufnahme, Häutung und Evasion des Immunsystems (McKerrow, 1989). Bei *O. volvulus* wurde bereits eine Aspartat-Proteinase charakterisiert, die im Darm lokalisiert ist und eine Rolle in der Verdauung spielen könnte (Jolodar *et al.*, 2004). Proteinase stellen den Hauptanteil an sekretierten Antigenen während der Infektion dar (Donnelly *et al.*, 2006). Für die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus von *O. volvulus* ist eine Migration des Parasiten essenziell. Der erste wichtige Schritt ist die Etablierung der Infektion mit dem Einwandern der Infektionslarven, die sich häufig weit von der Bisswunde der Simulie entfernen. Außerdem garantiert die Mobilität der Männchen das Fortbestehen der Art, da sie sich von Knoten zu Knoten fortbewegen müssen, um die Weibchen zu begatten. Ein weiterer wichtiger Schritt ist das Auswandern der geschlüpften Mikrofilarien aus dem Knoten und das Erreichen der Dermis, um so den Entwicklungszyklus mit der Aufnahme durch Simulien abzuschließen. Für diese Fortbewegung durch das Wirtsgewebe benötigt der Parasit sekretierte Proteinase, die in

der Lage sind, extrazelluläre Matrixproteine zu spalten. Diese Proteinase stellen wichtige In- und Evasionsfaktoren dar, die geeignete Angriffspunkte für chemotherapeutische oder immuntherapeutische Maßnahmen sein könnten. Eine weitere Aufgabe der sezernierten Proteinase könnte sein, vom Wirt sezernierte Immunmodulatoren zu spalten und so in die Immunantwort des Wirtes einzugreifen.

Bei anderen parasitären Nematoden sind bereits eine Anzahl von Gewebsproteine spaltenden Proteinase nachgewiesen und charakterisiert worden. Petralanda *et al.* (1986) haben außerdem kollagenolytische Aktivität in den Überständen von verschiedenen *O. volvulus*-Infektionsstadien nachgewiesen. Die exkretorisch/sekretorischen Produkte von *Parastrongylus cantonensis* L3 Stadien enthalten proteolytische Enzyme mit Serin- und Metallproteinase-Aktivität, die an der Penetration der Darmwand des Wirts beteiligt sind (Lee & Yen, 2005). Die Infektionslarve von *Trichinella spiralis* scheidet eine Metallproteinase aus, die kollagenolytische Aktivität aufweist (Lun *et al.*, 2003). Von *Ancylostoma caninum* ist eine Astacin-ähnliche Metallproteinase (Ac-MTP-1) bekannt, die stadienspezifisch exprimiert wird (Zhan *et al.*, 2002). Auch in *Ostertagia ostertagi* (De Maere *et al.*, 2005) sind ebenfalls vier Metallproteinase nachgewiesen worden, die zur Gruppe der Astacin-ähnlichen Metallproteinase gehören.

Weiterhin sind auch Elastasen gefunden worden, die zur Gruppe der Serinproteinase gehören, deren aktives Zentrum von den Aminosäuren Histidin, Asparagin und Serin (katalytische Triade) gebildet wird (Sakanari *et al.* 1989, Barrett 1994). Serinproteinase sind in Viren, Bakterien und Eukaryoten weit verbreitet und übernehmen eine vitale Funktion im Organismus. Das Konsensusmotiv Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly findet man bei allen Serinproteinase. Ein Vergleich von eukaryotischen Serinproteinase ergab, dass einige Aminosäuren im Bereich der am aktiven Zentrum beteiligten drei Aminosäuren sowie in Regionen, die für die Stabilität der Sekundär- und Tertiärstruktur von Bedeutung sind, hochgradig konserviert sind (Newport *et al.*, 1988, Sakanari *et al.* 1989). Die Sequenzhomologien von Serinproteinase außerhalb dieser Bereiche sind dagegen gering.

Der Wirkmechanismus der katalytischen Triade besteht in einem nukleophilen Angriff des Serins auf das Substrat. Das Histidin übernimmt dabei ein Proton der OH-Gruppe des Serins und wird von der Carboxy-Gruppe des Aspartats während dieses positiv geladenen Übergangszustands stabilisiert.

Die Zerkarien von *Schistosoma mansoni*, ein parasitärer Vertreter der Trematoden, exkretieren eine elastinolytische Serinproteinase, um in die Haut einzudringen und in der Haut zu migrieren (McKerrow *et al.*, 1983). Pierrot *et al.* zeigten 1996, dass die Elastase während der Hautinvasion exkretiert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Serum von mit rekombinanter Elastase immunisierten Ratten eine zytotoxische Wirkung gegen Schistosomula hat.

#### 1.4 Die Astacin-Familie der Metallproteinasen

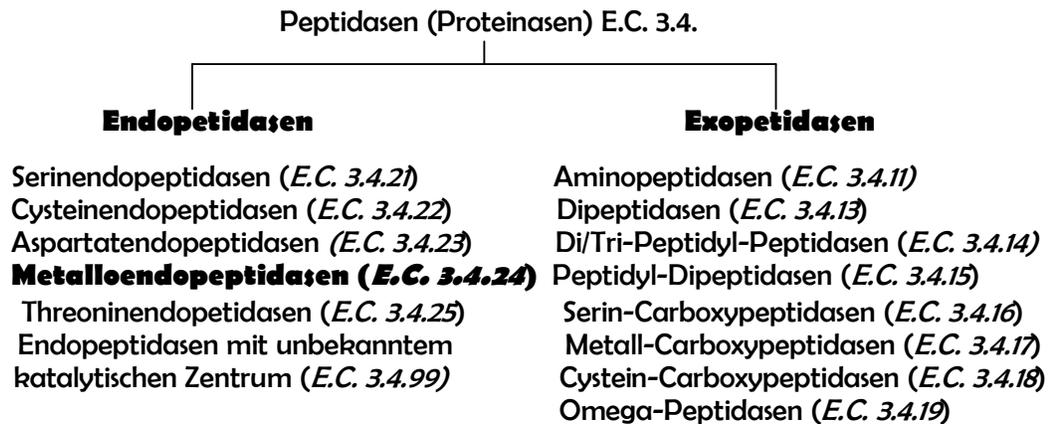


Abb. 1.3:  
Einteilung der Proteinasen

Die Astacin-Protein-Familie (Peptidase-Familie M12A) gründet sich auf eine Zink-Metallendoprotease (E.C. 3.4.24) aus dem Kaumagen des Flusskrebs *Astacus astacus*. Sie wurde erstmals 1967 von Pfeleiderer *et al.* beschrieben. Metallproteinasen enthalten in ihrem aktiven Zentrum ein gebundenes Metallion. Dies ist fast immer ein Zinkion, das ein Wassermolekül aktiviert. Dieses Zink-gebundene Wasser verhält sich ähnlich einer Hydroxy-Gruppe, welche dann als nucleophile Gruppe die Peptidcarbonylgruppe angreift. Gleichzeitig nimmt das Glutamat 93 ein Proton vom Wasser auf, so dass ein negativ geladenes tetraedisches Zwischenprodukt entsteht, das durch die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Zinkatom und der positiven Seitenkette des Arginins stabilisiert wird. Abschliessend wird das Proton des Glutamats auf die Peptid-NH-Gruppe übertragen und so die Peptidgruppe gespalten.

Die Aminosäuresequenz und dreidimensionale Struktur des Flusskrebsenzym zeigten, dass es sich bei diesem Protein um den Prototyp einer neuen Familie von Proteinasen handelt (Titani *et al.*, 1987, Stöcker *et al.*, 1993). Im Unterschied zu anderen

Zink-Metallproteinasen, besitzt das Zinkion des Astacins fünf trigonal bipyramidal angeordnete Liganden, während bis dato nur Metallproteinasen bekannt waren, deren Zinkion im Grundzustand tetraedrisch koordiniert vorliegt. Die dreidimensionale Gesamtstruktur des Astacins ist nierenförmig und besteht aus einer aminoterminalen und einer carboxyterminalen Domäne, die durch einen tiefen Spalt voneinander getrennt sind, in dem eingebettet das aktive Zentrum mit dem katalytisch essenziellen Zink liegt. Die beiden Domänen sind zum einen durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys 42 und Cys 198 miteinander verbunden, zum anderen entsteht nach Aktivierung eine weitere Verbindung durch den neuen Aminoterminus Ala 1, der durch eine Salzbrücke mit Glu 103 verbunden ist. Außerdem zeichnen sich die Astacine durch ein stark konserviertes zinkbindendes Motiv mit der Sequenz HExxHxxGFxHExxRxDRD aus (Bode *et al.*, 1993), das die drei Histidin-Zink-Liganden, die katalytische Glu 93 und das strukturell wichtige Gly 99 enthält. Ein weiteres charakteristisches Strukturelement ist der Methionin-haltige 1,4- $\beta$ -Turn mit dem Motiv SxMHY, der den Zinkliganden Tyr-149 umfasst.

Die Astacin-Protein-Familie wurde bis jetzt in Tieren, Pilzen und Bakterien (Tarentino *et al.*, 1995) nachgewiesen und lässt sich in mehrere Subklassen unterteilen, wie zum Beispiel BMP (bone morphogenic protein)/Tolloid, die im Menschen eine Rolle bei der Knochenbildung spielen und in Tierembryonen für Zelldifferenzierung und Morphogenese zuständig sind (Wozney *et al.*, 1988). Eine weitere Subklasse umfasst Proteinasen, die für den Schlüpfvorgang von Arthropoden und Nematoden essenziell sind (Hishida *et al.*, 1996). Bemerkenswert ist die Abundanz der Astacine in *C. elegans*. Möhrlein *et al.* haben 2003 40 Mitglieder der Astacin-Familie in *C. elegans* identifiziert. Diese lassen sich in sechs Untergruppen aufspalten, die sich durch Unterschiede in ihren regulatorischen Einheiten auszeichnen. Es wird angenommen, dass einige Mitglieder der einzelnen Untergruppen durch Genduplikation entstanden sind und daher ähnliche Funktionen aufweisen. Da in dem Nematoden, der aus 959 Zellen besteht, weitaus mehr Astacine vorhanden sind, als zum Beispiel beim Menschen, wird den Astacinen eine hervorgehobene Rolle bei den Nematoden zugewiesen.

### 1.5 *Strongyloides ratti* als Modellorganismus für parasitäre Nematoden

Die Gattung *Strongyloides* umfasst gastrointestinale Nematoden, die circa 60 Vertebratenspezies und auch den Menschen infizieren. Die Arten *S. stercoralis* und *Strongyloides fuelleborni* befallen den Menschen und man geht von 50-100 bzw. 200 Millionen Infizierten aus. *S. stercoralis* gilt als viertwichtigster parasitärer Nematode des Menschen weltweit. Das Besondere an der Gattung *Strongyloides* ist die Fähigkeit des Parasiten, neben der parasitären Lebensweise einen vollständigen Lebenszyklus außerhalb des Wirts zu durchleben. In der Abbildung 1.4 ist der Zyklus schematisch dargestellt. Die Weibchen leben im Dünndarm des Wirtes, die Eier, die parthenogenetisch gebildet werden, werden mit dessen Kot ausgeschieden. Je nach den Umweltbedingungen entwickeln sich aus den Eiern rhabditiforme L1-Stadien, die sich über das zweite rhabditiforme Larvenstadium zum filariformen dritten Larvenstadium häuten, das das infektiöse Stadium darstellt und freilebend überdauern kann, bis sie einen geeigneten Wirt erreichen.

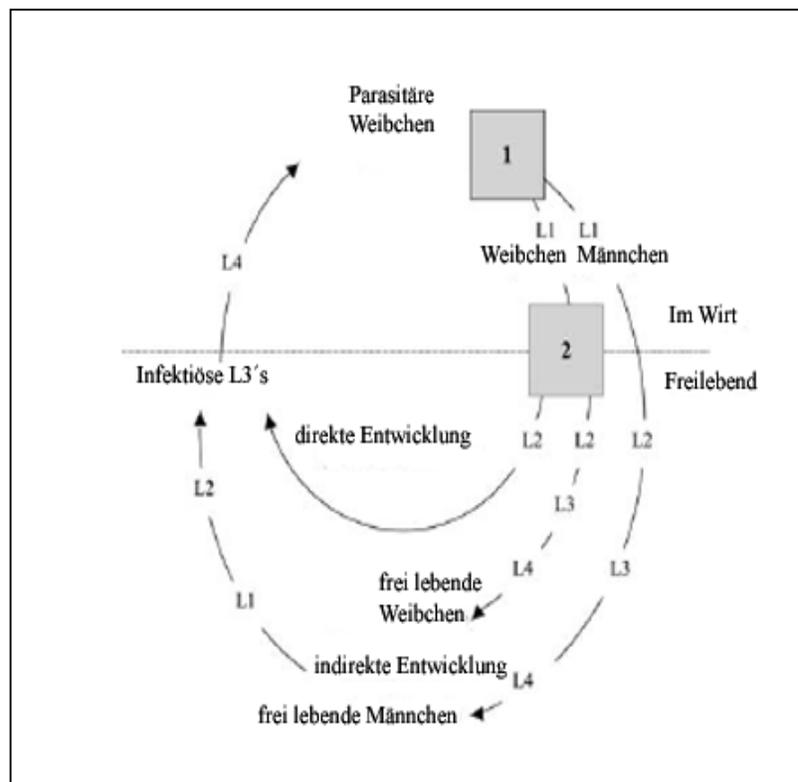


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *S. ratti* (nach Viney, 2006). Die Entwicklung der freilebenden Generation ist abhängig von einem geschlechts-determinierendem Ereignis im Wirt (Box 1) und einer rein weiblichen Linie (Box 2).

Rhabditiform und filariform bezeichnen den Oesophagus-Typ von Nematoden. Während der rhabditiforme Oesophagus muskulös und sanduhrförmig ist und einen ausgeprägten Endbulbus hat, so ist der filariforme Oesophagus muskulös fleischförmig und charakteristisch für infektiöse Drittlarven.

Teilweise vollzieht sich die Entwicklung zur Infektionslarve im Wirt. Dann kann es bei der Stuhlausscheidung zur Reinfektion kommen, wobei die infektiösen L3 die Darmwand oder die perianale Haut penetrieren. Bei der heterogonen Entwicklung, die auch als indirekte Entwicklung bezeichnet wird, häuten sich die L2 zur rhabditiformen L3 und entwickeln sich zu rhabditiformen Männchen und Weibchen, die einen freilebenden sexuellen Zyklus durchlaufen und so eine Generation von infektiösen Larven produzieren. Dadurch wird die Anzahl der infektiösen Stadien erhöht und eine genetische Rekombination des Erbguts gewährleistet. Diese Entwicklung wird als indirekter Weg (heterogon) bezeichnet. Die Außentemperatur und der Immunstatus des Wirts spielen eine Rolle bei der Entscheidung über die Art des Entwicklungswegs (Viney, 1996). Die Morphologie der freilebenden Adulten unterscheidet sich deutlich von der parasitär lebender Weibchen (Viney, 2006). Bei der Infektion penetrieren die infektiösen Larven die Haut und wandern durch das Wirtsgewebe zu den Blutgefäßen, in denen sie zu den Lungenalveolen transportiert werden. Während dieses Prozesses häutet sich die Larve zum L4 Stadium und bricht durch die Lungenkapillaren in die Alveolen, von wo aus sie die Atemwege hochwandern, um im Rachen verschluckt zu werden. Im Dünndarm entwickeln sie sich dann zu Weibchen. Dieser Entwicklungsweg wird auch als direkte Entwicklung bezeichnet (homogon, Grove, 1989).

Die Symptome der *S. stercoralis*-Infektion sind breit gefächert. Die häufigsten Symptome findet man im Intestinalbereich mit Bauchschmerzen, Erbrechen, Durchfall und Gewichtsverlust. Aber es können auch Symptome in der Lunge, Haut und selten im Nervensystem beobachtet werden. Die Pathologie ist jedoch nicht immer offensichtlich. Hat der Befallene allerdings eine Immunschwäche durch immunsuppressive Medikamente oder Virusinfektionen (z.B. Humaner T-Zell Lymphom-Virus), so kann sich die Infektion im Körper verbreiten und bei fehlender Therapie tödlich ausgehen (Keiser & Nutman, 2004).

Die Art *S. ratti* ist der am besten untersuchte Vertreter dieser Gattung. Die verschiedenen Stadien dieser Art können in der Ratte und auf Agar-Platten gehalten

werden und stellen damit einen geeigneten Modellorganismus für parasitäre Nematoden dar, besonders in Bezug auf Expressionsunterschiede in den parasitären im Vergleich zu den freilebenden Stadien. Da sich auch dieser Nematode im Wirtsgewebe fortbewegt, benötigt er ebenfalls gewebspaltende Proteinase. *S. stercoralis* exprimiert im infektiösen Larvenstadium eine Astacin-artige Metallproteinase, der eine Rolle in der Gewebepenetration zugesprochen wird (Gomez Gallego *et al.*, 2005). Eine Charakterisierung des Orthologs dieses Astacins bei *S. ratti* kann dazu beitragen, den Invasionsprozeß der Infektionslarve zu klären.

#### 1.6 Die Rolle der Vakzinentwicklung bei der Bekämpfung parasitärer Nematoden

Wirt und Parasit haben sich über Millionen von Jahren gegenseitig adaptiert. Der Mensch wird krank, wenn das Gleichgewicht zwischen Immunkompetenz des Wirts und Parasitenlast gestört ist (Knox *et al.*, 2001). Die Wurmlast wird bei der Onchozerkose durch die Gabe von Ivermectin oder Albendazol verringert. Beide Wirkstoffe wirken auf die Mikrofilarien. Die adulten Stadien werden nicht getötet, so dass die Gabe der Medikamente nur einige Monate Wirkung hat, da die Mikrofilarienproduktion nach dieser Zeit erneut einsetzt. Außerdem gibt es Nebenwirkungen der Substanzen und es treten Resistenzen auf. Die Suche nach einer alternativen makrofilariziden Therapie oder einem Impfstoff ist also weiter notwendig (Tchakouté *et al.*, 2006).

Die erste erfolgreiche Vakzinierung gegen Nematoden wurde mit UV-behandelten Larven des Lungenwurms *Dictyocaulus viviparus* durchgeführt, die Rindern injiziert wurden (Cornwell, 1960). Zur Zeit stellen verschiedene exkretorisch/sekretorische Produkte des Hakenwurms *Ancylostoma* erfolgversprechende Vakzinkandidaten dar (Hotez *et al.*, 2003). Der Vorteil von rekombinanten Proteinen als Vakzin im Vergleich zu UV-behandelten Larven ist die Verfügbarkeit der Proteine, da diese rekombinant neu produziert werden können und somit einen größeren klinischen Nutzen haben (Abraham *et al.*, 2001). Ein aus Hunden gewonnenes Antiserum gegen Ac-MTP-1, eine Astacin-artigen Metallproteinase aus *A. caninum*, war in der Lage, die Wanderung der Larven um 70-75 % zu hemmen (Williamson *et al.*, 2005). Damit konnte die Hypothese, dass das Antiserum gegen Astacine von parasitären Nematoden eine protektive Wirkung hat, weiter erhärtet werden.

## 1.7 Fragestellung

Die Proteinasen spielen bei der Wirtsinvasion durch parasitäre Nematoden eine zentrale Rolle und stellen darüber hinaus wichtige Pathogenitätsfaktoren dar. Da Infektionslarven von *O. volvulus*, schwer zu gewinnen sind, und es kein Tiermodell für *O. volvulus* gibt, ist die Rolle der Proteinasen bei der Invasion kaum zu untersuchen. Aus früheren Arbeiten (Haffner, 1998) ist bekannt, dass Mikrofilarien und Männchen (beides migrierende Stadien) Enzyme mit proteolytischer Aktivität sekretieren. Durch Hemmversuche in Substratgelelektrophoresen konnten die Autoren zwei Proteinase detektieren werden: eine niedermolekulare Serinproteinase und eine weitaus größere Metallproteinase. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Gene der Enzyme zu identifizieren und zu charakterisieren. Dafür wurden verschiedene Ansätze gewählt:

- Identifizierung der Vollängensequenz des Ov-MTP-1 Gens durch PCR-Versuche mittels cDNA-Banken.
- Bioinformatische Analyse der Nucleotid- und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz, sowohl Datenbankanalyse als auch strukturelle Untersuchungen.
- Pro- und eukaryotische rekombinante Expression und anschließende biochemische Charakterisierung zur Aufklärung des Wirkspektrums der Metallproteinase.
- Antikörperherstellung und nachfolgende immunhistologische Untersuchungen zur Lokalisierung der Metallproteinase in *O. volvulus*-Stadien. Durch Testung von Patientenserum sollte die Immunogenität der Metallproteinase getestet werden. Diese Versuche sollten Aufschluss über die Möglichkeit geben, die Metallproteinase als Vakzinkandidaten zu verwenden.
- Identifizierung der Gensequenz der Serinproteinase, deren Aktivität in Mikrofilarienüberständen nachgewiesen worden war, durch PCR-Strategien mittels degenerierter Primer, die von der Konsensussequenz um das aktive Serin abgeleitet wurden.
- Alternative Identifizierung eines Orthologs aus der verwandten Filarie *B. malayi* mittels cDNA-Screening (EST vorhanden).
- Bioinformatische Charakterisierung des Enzyms sollte die Struktur und Funktion des Enzyms aufklären.
- Rekombinante Expression zur biochemischen Charakterisierung der Serinproteinase.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Geräte

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden hauptsächlich Chemikalien der Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Biorad (München), Sigma (Deisenhofen) und AppliChem (Darmstadt) bezogen. Für die Kultivierung von Bakterien und Pilzen wurden Medienbestandteile von den Firmen Roth, Invitrogen (Carlsbad, Kanada), Difco (Detroit, USA) und Lab M (Bury, England) verwendet. Restriktionsenzyme und andere Enzyme zur Modifikation von DNA stammten von den Firmen New England Biolabs (NEB, Beverly, USA) und Roche (Basel, Schweiz). DNA-Polymerasen wurden von Invitrogen (Carlsbad), NEB (Beverly) und Qiagen (Hilden) bezogen. Nukleotide und DNA- bzw. Protein-Längenstandards wurden von Invitrogen (Carlsbad), MBI Fermentas (St. Leon-Roth, Gene Ruler™ 1kb/100bp DNA Ladder) und Biorad (München, Precion Plus Protein™ Standard) verwendet. Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 1.1 aufgelistet.

Tabelle 1.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage PT1200	Sartorius (Göttingen)
Autocrosslinker UV Stratalinker 1800	Stratagene (La Jolla, USA)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank IG 150	Jouan (Fernwald)
Elektrophoresekammern Perfect Blue Mini	Peqlab (Erlangen)
Elektrophoresekammern Mini-Protean II	Biorad (München)
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa (Köln)
Fluoreszenz-Spektrophotometer Spektraflour	Tecan (Crailsheim)
Geldokumentationsanlage TCT 1	Kaiser (Buchen)
Gene Amp 2400 PCR System	Perkin Elmer
Heizschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf
Kühlzentrifuge Rotanda	Hettich (Tuttlingen)
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman (Krefeld)
Mikroskop Axioskop	Zeiss (Jena)
Mikrotiterplatten-Wasch-Absauggerät, Dynatech MRW	Dynatech, (Denkendorf)
Netzgerät	Biorad

pH-Meter CG 480	Schott (Mainz)
Photometer 1101 M	Eppendorf
Schüttelinkubator Innova 4400	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Sterilarbeitsbank Microflow	Nunc (Wiesbaden)
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultrazentrifuge L8-70 M	Beckman (Krefeld)
Vortex MS 1	IKA (Staufen)
Wasserbäder GFL 1083	Hilab (Düsseldorf)
Wipptisch Rocky	Fröbel (Lindau)

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Stammlösung 30 % (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
Agarose-Gel-Ladepuffer	Na <sub>2</sub> -EDTA 100 mM Glycerin 30 % (v/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v)
B1 Puffer (Southern Blot)	Maleinsäure 100 mM NaCl 150 mM pH 7,5 bei 25 °C
B3 Puffer (Southern Blot)	NaCl 100 mM Tris-HCl 100 mM pH 9,5 bei 25 °C
Bacmid-Lösung I	Tris-HCl 15 mM EDTA 10 mM RNase A 100 mg/ml Lagerung bei 4 °C
Bacmid-Lösung II	NaOH 0,2 N SDS 1 % (v/v) Lagerung bei 4 °C
Blockierungslösung (Western Blot)	Magermilchpulver 5 % (w/v) 1 x PBS
Bradford-Reagenz	Serva Brilliant Blue G 250 0,01 % (w/v) Ethanol 5 % (v/v) Phosphorsäure 10 % (v/v)

Coomassie-Färbelösung	Ethanol	50 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blau	0,05 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie-Entfärber	Ethanol	45 % (v/v)
	Eisessig	10 % (v/v)
ELISA-Beschichtungspuffer	Karbonat pH 9,5 bei 25 °C	100 mM
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid ad 500 ml H <sub>2</sub> O	3 x10 <sup>-4</sup> % (w/v)
Geltrocknungslösung	Ethanol	20 % (v/v)
	Glycerin	10 % (v/v)
His-Tag-Reinigung: Puffer A	Guanidinhydrochlorid	6 M
	Tris-HCl	10 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
	pH 8,0 bei 25 °C	
Puffer B	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
	Tris-HCl	10 mM
	Urea	8 M
	pH 8,0 bei 25 °C	
Puffer C	Puffer B pH 6,3 bei 25 °C	
iFCS	FCS 45 min bei 56 °C inaktiviert; Lagerung bei - 20 °C	
IPTG-Stammlösung	IPTG	1 M
Lysozym-Stammlösung	10 mg / ml PBS	
MOPS-Puffer (10x)	MOPS	200 mM
	Natriumacetat	50 mM
	EDTA	20 mM
	pH 7,0 mit NaOH einstellen	
NET-Puffer	NaCl	100 mM
	EDTA	10 mM
	Tris	10 mM
	pH 8,0 bei 25 °C	
RNA-Probenpuffer	1x MOPS-Puffer	72 µl
	Formaldehyd (37% v/v)	128 µl
	Formamid	360 µl

PBS (10x)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	80,6	mM
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	14,7	mM
	NaCl	1,37	M
	KCl	26,8	mM
	pH 7,0 bei 25 °C		
Proteinase K-Lösung	Proteinase K	20	mg/ml
Säulenpuffer	Tris-HCl	20	mM
	NaCl	200	mM
	EDTA	1	mM
	pH 7,5 bei 25 °C		
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	Trisbase	250	mM
	Glycin	1,9	M
	SDS	1	% (v/v)
SDS-PAGE Probenpuffer (6x)	Tris-HCl	0,125	M
	Glycerin	25	% (v/v)
	SDS	2	% (v/v)
	DTT	50	mM
	Bromphenolblau	0,02	% (w/v)
	pH 6,8 mit HCl einstellen		
SDS-PAGE Sammelgelpuffer (4x Tris/SDS pH 6,8)	Trisbase	500	mM
	SDS	0,4	% (v/v)
	pH 6,8 mit HCl einstellen		
SDS-PAGE Trenngelpuffer	(4x Tris/SDS pH 8,8)		
	Trisbase	1,5	M
	SDS	0,4	% (v/v)
	pH 8,8 mit HCl einstellen		
Silberfärbung: Fixierlösung I	Ethanol	30	% (v/v)
	Essigsäure	10	% (v/v)
Fixierlösung II	Ethanol	30	% (v/v)
	Na-Acetat	0,5	M
	Glutaraldehyd	25	% (v/v)
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,2	% (w/v)
Färbelösung IV	Silbernitrat	0,1	% (w/v)
	Formaldehyd	0,01	% (v/v)
Entwicklerlösung V	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	2,5	% (w/v)
	Formaldehyd	0,01	% (v/v)
	pH 11,3-11,8 bei 25 °C		
Renaturierungspuffer	Tris-HCl	50	mM
	NaCl	100	mM
	pH 7,5 bei 25 °C		

SSC (20x)	NaCl Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl einstellen	3 M 0,3 M
Substrat (Immunhistologie)	Naphtol Fast Red gelöst in 10 ml Tris (pH 8,3 bei 25 °C)	0,002 g 0,01 g
TAE (50x)	Tris Essigsäure EDTA pH 8,3 bei 25 °C	2 M 1 M 50 mM
TBS (10x)	Tris-HCl NaCl pH 7,2 bei 25 °C	100 mM 1,5 M
TFB I	CaCl <sub>2</sub> Glycerin Kaliumacetat Rubidiumchlorid pH 5,8 bei 25 °C	10 mM 15 % (v/v) 30 mM 100 mM
TFB II	MOPS Rubidiumchlorid Calciumchlorid Glycerin pH 7,0 bei 25 °C	10 mM 10 mM 75 mM 15 % (v/v)
Transferpuffer (Western Blot)	Tris Glycin SDS Methanol	25 mM 150 mM 0,5 % (v/v) 20 % (v/v)
Trypanblau-Lösung	Trypanblau-Lösung PBS 1x	62,5 % (v/v) 37,5 % (v/v)
Waschpuffer I (cDNA-Screening, Southern Blot)	SSC SDS	2 x 0,1 % (v/v)
Waschpuffer II (cDNA-Screening, Southern Blot)	SSC SDS	0,5 x 0,1 % (v/v)
Waschpuffer I (GST-Reinigung)	NaCl DTT Triton-X-100	1 M 10 mM 2 % (v/v)
Waschpuffer II (GST-Reinigung)	Waschpuffer I PBS	50 % 50 %

Waschpuffer (His-tag Reinigung nativ)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Tween	0,05 % (v/v)

Alle Puffer und Lösungen wurden vor dem Gebrauch, soweit nicht anders angegeben, auf eine 1x Konzentration verdünnt.

### 2.1.3 Kulturmedien und Medienzusätze

*E. coli:*

LB-Medium	20 g Lennox L Broth Base ad 1 l <i>A. dest.</i> , autoklavieren
LB-Agar	20 g Lennox Broth 15 g Bacto Agar ad 1 l <i>A. dest.</i> , autoklavieren
NZY	22 g NZY Broth ad 1 l <i>A. dest.</i> , autoklavieren
NZY-Agar	22 g NZY Broth 15 g Bacto Agar ad 1 l <i>A. dest.</i> , autoklavieren
SOC-Regenerationsmedium	Invitrogen
Insektenzellen: S9 Medium	TC 100 (PAN Biotech) iFCS 10 % (v/v) L-Glutamin 4 mM
Expressionsmedium (High 5)	Express Five Medium iFCS 10 % (v/v) L-Glutamin 4 mM

Tab.1.2: Medienzusätze

Antibiotikum	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 µg/ml LB-Medium
Chloramphenicol	34 µg/ml LB-Medium
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Alle Lösungen wurden steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

#### 2.1.4 Zellkulturen

*SF9* klonales Isolat aus *Spodoptera frugiperda*-Ovarzellen der Zelllinie IPLB-Sf-21AE von Invitrogen (Carlsbad)

High Five klonales Isolat aus *Trichoplusia ni*-Ovarzellen, ebenfalls Invitrogen

## 2.1.5 Parasiten, Ratten, Bakterienstämme

### Parasiten

*Onchocerca volvulus*-Knoten, fixiert und unfixiert von Patienten aus einem Endemiegebiet in Ghana

*Strongyloides ratti* (Bernhard-Nocht-Institut)

### Ratten

*Rattus norvegicus* Wistar Männchen

### Bakterienstämme

*Escherichia coli*:

SOLR (Genotyp:  $\epsilon 14$ -(McrA-)  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC$

$umuC::Tn5$  (Kanr)  $lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1R$  [F'  $proAB$

$lacq\Delta M15$ ] Su- (non suppressing)

DH10B (Genotyp: F'  $mcrA \Delta(mrr-hsaRMS-mcrBC) \phi 80 lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1$

$endA1 ara\Delta 139 \Delta(ara, leu)7697 galJ gaK \lambda-rp\Delta$  (Str<sup>R</sup>)  $nupG$ )

BL21-CodonPlus-RIL (Genotyp: B F-  $ompT hsdS(rB - mB -) dcm^+ Tetr gal endA$

Hte [ $argU ileY leuW Camr$ ])

BL21(DE3)pLYS (Genotyp: B F-  $dcm ompT hsdS(rB - mB -) gal(DE3)$  [pLysS

Camr])

XL1-Blue (Genotype:  $recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac$  [F'  $proAB$

$lacq\Delta M15 Tn10$  (Tetr)])

Die Stämme wurden, bis auf den DH10B-Stamm, der von Invitrogen bezogen wurde, bei Stratagene (Amsterdam, Niederlande) gekauft.

## 2.1.6 Nukleinsäuren

### Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden selbständig entworfen und von Operon (Köln) und Biometra (Göttingen) in einem Synthesemasstab von 10 nmol bezogen.

T3	attaacacctactaaagggga
T7	taatacgactcactataggg
M13f	gtaaaacgacggccagtagcgcg
M13r	aacagctatgaccatgattacgcc
Bmsp1	tagggcatcgaaatattatc
Bmsp2	acaagtattatttctcatg
Bmsp3r	aaccataaccagttaatcg
Bmsp4f	tggatattgatattaccg
BmSPexpr	atgggcgagaaaatgcatc
BmSP5`rev	ctacagcccatggcattc
BmSPexp3	atgggcgagaaaatgcatctgg
BmSP3`exp1	gaattctgacaagtatttattctcatgacaaatg
SPGST5` (BamHI)	cgggatccggcgagaaaatgcatcacctgg
SPmbp3` (PstI) 2	aactgcagtgacaagtatttattctcatgacaaatg
36217	ggcgacagtggaggtgg
36218	ccacctcactgtcgcc
OvR10	caaaacaatgtcaccttc
OvMPf1	aaggataatattgtgttgaatcctgaa
OvMPf2	agcatttggtcgatatgatgattg
OvMPf3	aggtacgcgactaccaatctc
OvMPr1	aaccgctgtagaacgttttgcg
OvMPr2	cttaccattatcaacatcaactggcaa
OvMPr3	aaccttaccaccacggtagaatg
OvMP5`exp	aatggcattattaacaatccttctgcagc
OvMP3`exp	tgttcacttcgaattatagagtc
MPexp3`neu (XhoI)	ctcgagtgttcacttcgaattatagagtc
MPEOS (NdeI)	catatggatggagcatttttcttaatgatc
MPGST5` (SmaI)	tccccgggtgatggagcatttttcttaatgatc
MPppexp5` (SnaBI)	tacgtaatggatggagcatttttcttaatgatc
MPppexp3` (AvrII)	cctaggtgttcacttcgaattatagagtc
MPmbp5` (BamHI)	cgggatccgatggagcatttttcttaatgatc
MPmbp3` (PstI)	aactgcagtgttcacttcgaattatagagtc
MPmbp5` (XbaI)	gctctagagatggagcatttttcttaatgatc
MPeux5` (SpeI)	gactagtatggccatcatcatc
MPmep5` (NcoI)	catgccatgggatggagcatttttcttaatgatc
SsStart	ttcacagtatTTTTTgtctttatc
SsF1	attatgtcgaggatggaataaatg
SsF2	ttatacatgaaacatctcatgctc
SsF3	ttgtggtatcacaaaatatactgctac
SsR1	aaattaaatctaactcccggattc
SsR2	tgtagtagcagtatatTTTgtgatacc
SsR3	ttatttaaaactTTTgaacttaattg
SrMP3`	ttatttaattcttctgtacttaattt

### Plasmide

Zum Sequenzieren wurden entsprechende Fragmente in den pCR4<sup>®</sup>-TOPO Vektor von Invitrogen kloniert. Für die bakterielle Expression wurden unterschiedliche Plasmide verwendet. Die Vektoren pJC40 und pJC45 enthalten einen His-Tag zur Proteinreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie und wurden von PD Dr. Joachim Clos (BNI) zur Verfügung gestellt. Zur Expression mit GST-Tag wurde das pGEX-4T-1-Plasmid von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Die Expression mit dem Maltose-Binding-Protein als Fusionsprotein wurde mittels der pMAL-c2x und pMAL-p2x-Vektoren von NEB (Beverly, USA) vermittelt. Für die eukaryotische Expression wurde der pFastBac-1-Vektor von Invitrogen verwendet.

### cDNA-Banken

*O. volvulus* Mikrofilarien Lambda Uni-ZAP XR SAW98MLW-OvMF  
*O. volvulus* Infektionslarve Lambda Uni-ZAP XR SAW94WL-OvL3  
*O. volvulus* Männchen Lambda Uni-ZAP XR  
*O. volvulus* Weibchen Lambda Uni-ZAP XR  
*O. volvulus* L2 Lambda Uni-ZAP XR SAW98MLW-Ov-L2

*Brugia malayi* Männchen Lambda Uni-ZAP XR SAW94NL-BmAM  
*B. malayi* Infektionslarve Lambda Uni-ZAP XR SAW94WL-BmL3

*O. volvulus* genomisch Lambda Uni-ZAP XR SAW95WL-OvG

Die cDNA-Banken, sowie die genomische Bank wurden freundlicherweise von Prof. Steven A. Williams (Northampton, USA) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.7 Immunreagenzien

HRP-konjugiert Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (AK)	Biorad
HRP-konjugiert Ziege-anti-Mensch-AK	Jackson ImmunoResearch
HRP-konjugiert Ziege-anti-Maus-AK	(Soham, England)
monoklonal Maus-anti-His-AK	Qiagen
Maus-anti- Penta His-AK	
Schaf-anti-Digoxigenin-FAB-Fragmente	Roche
HRP-konjugiert Ziege-anti-Kaninchen-AK	Stratagene
Maus-anti-Kaninchen-AK	DakoCytomation (Hamburg)
Kaninchen-anti-Maus-AK	
APAAP-Komplex	

### 2.1.8 Patientenseren

In den serologischen Versuchen wurden Seren von 48 Patienten mit Onchozerkose aus den endemischen Gebieten in Ghana, Uganda und Liberia verwendet. 32 Personen hatten eine generalisierte Form der Onchozerkose mit niedrigen ( $n = 16$ ) oder hohen ( $n = 16$ ) Mikrofilariendichten, 16 Personen hatten eine hyperreaktive Form der Onchozerkose (Brattig *et al.*, 1997).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten

#### 2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA (gDNA) wurden 10 Weibchen (*O. volvulus*) in 2 ml NET-Puffer in einem Glas-Glas-Homogenisator zerkleinert bis eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurde die Suspension in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt und 40 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 56 °C wurden 200 µl SDS (10 %) hinzupipettiert und erneut 1,5 bis 2 h bei 56 °C inkubiert. Die DNA wurde nun durch Phenol-Chloroform-Extraktion von dem Gesamtextrakt getrennt. Dazu versetzt man 1 ml des Wurmextraktes mit 1 ml Puffer-gesättigtem Phenol und mischt durch vortexen. Nach fünfminütiger Inkubation folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 21.000 x g). Die wässrige (obere) Phase wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol ausgeschüttelt. Der Überstand wurde einer Ethanol-Fällung unterzogen. Abschließend wurde die gDNA in RNase-haltigem Wasser aufgenommen und nach kurzer Inkubation bei 37 °C gelelektrophoretisch überprüft.

#### 2.2.1.2 Isolierung von RNA

In Trizol gelagerte Würmer (*O. volvulus*), bzw. frische *S. ratt*-L3-Stadien wurden mit 2 ml Trizol in einem Glas-Glas-Homogenisator zerkleinert. Nach Überführung in 1.5 ml Reaktionsgefäße (750 µl pro Tube) wurde das Homogenisat mit 200 µl Chloroform versetzt und nach kurzem vortexen für 10 min bei 21000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Präzipitation der RNA 500 µl Isopropanol zugesetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Abschließend wurde die RNA pelletiert (20 min, 4 °C, 21.000 x g), mit 80 % Ethanol gewaschen und in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese in horizontalen Agarosegelkammern dient der Auftrennung linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente zu analytischen sowie zu präparativen Zwecken. Es wurden Agarosekonzentrationen von 0,7 - 1,5 % (w/v) in TAE-Puffer eingesetzt, in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Die mit einem entsprechenden Volumen an DNA-Ladepuffer versetzte, negativ geladene DNA wandert in dem angelegten Spannungsfeld (80-120 V) von der Kathode zur Anode. Anschließend inkubierten die Gele für 10 min in einem Ethidiumbromid-Färbegrad. Die DNA-Banden wurden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden die in 2.1.1 aufgeführten Längenstandards mit aufgetragen.

### 2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch. Es wurde die Absorption einer zu bestimmenden Nukleinsäurelösung bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten gemessen und mit Hilfe des Wertes für die optische Dichte (OD) die Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  nach folgender Formel berechnet

$$\text{OD}_{260\text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ (DNA) bzw. } 40 \text{ (RNA)}/1000$$

Es wurde für eine OD von 1 bei doppelsträngiger DNA eine Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , bei RNA von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  angenommen.

Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm sowie bei 280 nm ließ sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen  $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$  Wert von 1,8; eine reine RNA-Lösung von 2,0.

### 2.2.1.5 Präzipitation von Nukleinsäuren

In Gegenwart monovalenter Kationen bildet DNA bzw. RNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation abgetrennt werden kann. Hierzu wurden die Ansätze mit 1/10 Vol. 3 M NaAcetat (pH 4,6 für DNA und pH 5,2 für RNA) und 0,7-0,8 Vol. Isopropanol oder 2,5 Vol. 99 % (v/v) EtOH versetzt, für 15 min bei 15.000xg und RT zentrifugiert und anschließend mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen, um die mitgefällten Salze zu entfernen. Die getrocknete DNA bzw. RNA wurde in HPLC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.2.1.6 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von bestimmten DNA-Sequenzen, die durch die Wahl der Matrizen-DNA und der eingesetzten Oligonukleotide bestimmt wird.

Eine Reaktion besteht aus der Abfolge von sich zyklisch wiederholenden Schritten:

1. Denaturierung des DNA-Moleküls
2. Annealing (Hybridisierung der Oligonukleotide)
3. DNA-Synthese (Amplifikation)

50 µl-Ansatz für das Taq Polymerase System von New England Biolabs:

10x Puffer	5 µl
Oligonukleotid 1 (20 pmol)	1 µl
Oligonukleotid 2 (20 pmol)	1 µl
dNTP-Mix	1 µl
Taq. Polymerase	0,2 µl
DNA	0,1-0,5 µg
HPLC-H <sub>2</sub> O	ad. 50 µl

Die Denaturierung erfolgte für 5 min bei 95 °C, die Synthesereaktion in Abhängigkeit von der Fragmentgröße zwischen 1 min bis zu 4 min bei 72 °C. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von Länge und Spezifität der Oligonukleotide. Sie darf allerdings die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) nicht überschreiten. Diese berechnet sich aus der Formel:  $T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$ . Die Zeit für die Hybridisierung der Oligonukleotide betrug zwischen 30-40 sec. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt und die Zyklen 30- oder 35-fach wiederholt. Die Amplifikation wurde gelelektrophoretisch überprüft. Für die Klonierung in den TOPO<sup>®</sup>-Vektor muss das PCR-Produkt Adenosinüberhänge enthalten. Dieses wurde durch einen 10-minütigen Inkubationsschritt bei 72 °C im Anschluss an das jeweilige PCR-Programm erreicht.

### 2.2.1.7 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten, die nach Restriktionsverdau aus Agarosegelen eluiert wurden, erfolgte mit Hilfe des Invisorb DNA Extraction Kit von Invitex (Berlin). Die zu eluierende DNA-Bande wurde aus einem Agarosegel bei UV-Lichtbestrahlung der Wellenlänge 366 nm ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die isolierte DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch überprüft und ihre Konzentration bestimmt (s.Kapitel 2.2.1.1 und 2.2.1.2).

### 2.2.1.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden anhand einer modifizierten Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* 1980 durchgeführt. Der Kettenabbruch erfolgte hierbei durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Es wurde das Big Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die 20 µl Ansätze enthielten 1 µg DNA, 10 pmol Oligonukleotid (M24F oder R, bzw. spezifische Oligonukleotide) und 4 µl Terminator Ready Reaction Mix. Die Reaktion war in drei Schritte unterteilt: 10 sec bei 96 °C, 5 sec bei 50 °C, 4 min bei 60 °C, welche 25-fach wiederholt wurden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl HPLC-H<sub>2</sub>O versetzt und einer Fällung mit NaAcetat und EtOH unterzogen (siehe 2.3.9.4). Die Trennung der DNA in einem denaturierenden Polyacrylamidgel und die Datenanalyse erfolgten mit Hilfe eines ABIPRISM™ 377-DNA-Sequencers der Firma Perkin Elmer.

### 2.2.1.9 DNA-Restriktion durch Endonukleasen

Restriktionsanalysen wurden zur Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Molekülen eingesetzt. Dazu wurde doppelsträngige DNA mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs gespalten und die entstandenen Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.1) getrennt. Die Enzyme wurden in den mitgelieferten Puffersystemen bei den angegebenen Temperaturen eingesetzt. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 1-2 µg DNA und für einen präparativen Ansatz 20 µg DNA eingesetzt und mit 3-10 U Enzym/µg DNA für 45 min bis 12 h inkubiert.

### 2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Enzymatische Ligationen von zu klonierenden DNA-Fragmenten mit linearisierter Plasmid-DNA wurden mit dem T4-DNA-Ligase-System von Roche durchgeführt. Die molaren Verhältnisse lagen in diesen 10 µl-Ansätzen bei 1:3 (Vektor-DNA:DNA-Fragment), wobei ca. 100 ng Vektor-DNA eingesetzt wurden. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurde 1 U Ligase eingesetzt. PCR-Produkte (siehe 2.2.1.6) mit Adenosinüberhängen konnten direkt ohne vorherigen Restriktionsverdau mit Hilfe des TOPO®TA Cloning Kits subkloniert werden.

### 2.2.1.11 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Für die Erststrangsynthese wurde das cDNA cycle Kit von Invitrogen verwendet. Dieses enthält die AMV (engl.: *avian myoblastosis virus*) Reverse Transkriptase. Die RNA wurde zunächst in einem Volumen von 11,5 µl und einem µl Oligo-dT-Primer für 10 min auf 65 °C geheizt, um eventuelle Sekundärstrukturen aufzulösen. Nach Hinzugabe des Standard-Ansatzes wurde die Reaktion 1 h bei 42 °C im Heizblock inkubiert.

#### Standard-Ansatz:

1.0 µl RNase Inhibitor  
4.0 µl 5X RT Puffer  
1.0 µl 100 mM dNTPs  
1.0 µl 80 mM Natrium-Pyrophosphat  
0.5 µl AMV Reverse Transkriptase

### 2.2.1.12 Southern Blotting

Während einer Southern-Blot-Analyse wird restringierte genomische DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (II.2.1.3) und anschließend auf eine Nylonmembran überführt. Als Laufmittel wurde 10x SSC verwendet. Die Hybridisierung fand unter niedrigstringenten Bedingungen statt (niedrige Salzkonzentration, Temperatur 42 °C). Die DNA wurde mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

Die Hybridisierungssonde wurde mittels einer PCR-Reaktion generiert (2.2.1.4). Zunächst wurde das Fragment, das den Bereich der Sonde umfasst, mit herkömmlichen Nukleotiden amplifiziert und anschließend über ein Agarose-Gel aufgereinigt (2.2.1.5). Die so gewonnene DNA wurde als Template in einem weiteren PCR-Synthese-Zyklus eingesetzt, in dem DIG-markierte dNTPs verwendet wurden. Die Sonden wurden bei -20 °C gelagert.

Die restringierte (2.2.1.7) und anschließend gefällte (2.2.1.3) genomische DNA wurde in einem 1% TAE-Agarose-Gel bei 100 V aufgetrennt. Zur Größenabschätzung und Positivkontrolle der Detektion wurde ein DIG-markierter Längenstandard verwendet. Anschließend wurde das Gel kurz in *A.dest.* gewaschen und 30 min unter Schütteln denaturiert. Es folgten ein 15-minütiger Neutralisierungsschritt und ein 15-minütiger Waschschrift in 2 x SSC.

Das Gel wurde kurz in 10 x SSC äquilibriert. Die Übertragung der genomischen DNA auf die Nylonmembran (Hybond-N+, Hybond, Escondido, Kanada) erfolgte nach der Kapillarblotmethode und wurde folgendermaßen vorbereitet: Eine Plastikschale wurde mit 10 x SSC gefüllt und darüber eine Glasscheibe gelegt. Ein Whatman-Papier wurde so

zurechtgeschnitten, das beide Enden in den Puffer ragen, und auf die Scheibe gelegt. Darauf folgte das Gel, das mit Parafilmstreifen abgedichtet wurde, um ein Austrocknen der Whatman-Brücke zu verhindern. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde die Membran auf das Gel gelegt. Darüber wurden fünf Lagen Whatman-Papier und abschließend ein Stapel Papiertücher geschichtet, die mit einem Gewicht (ca. 0,5 kg) beschwert wurden. Die Übertragung der DNA auf die Nylon-Membran erfolgte über Nacht (ü. N.) bei Raumtemperatur (RT).

Die Membran wurde bei RT getrocknet und von beiden Seiten in einem „Autocrosslinker“ mit UV-Licht bestrahlt (1200 mJ). Um unspezifische Bindungen der Sonde an die Membran zu verhindern, wurde die Membran für mindestens 3 h in Prähybridisierungspuffer bei 54 °C inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte des PCR-Ansatzes der Sonde auf ein Endvolumen von 200 µl mit *A. dest.* aufgefüllt und der Ansatz dann für 10 min denaturiert. Um eine Renaturierung zu verhindern, wurde die Sonde schnell auf Eis abgekühlt und dann in die Prähybridisierungslösung pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 54 °C ü. N. Nach der Hybridisierung wurde die Membran in mehreren Waschschritten (2x 5 min W1 bei RT, 2 x 15 min W2 bei 54 °C) von nicht gebundenen Sonden-Molekülen gereinigt. Es folgte eine Äquilibrierung der Membran in B1 für die anschließende Blockierungsreaktion (30 min bei RT) in Blockierungsreagenz von Roche, um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren. Die Membran wurde daraufhin eine halbe Stunde mit dem Antikörper inkubiert. Um die nicht gebundenen Antikörpermoleküle von der Membran zu entfernen, folgten zwei Waschschrritte à 15 min in B1. Nach Äquilibrierung der Membran in B3 wurde die Membran mit 1 ml der CSPD-Lösung benetzt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran nach Abnehmen der überschüssigen Flüssigkeit in Klarsichtfolie eingeschweisst und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit betrug in der Regel 20 min bei 37 °C. Waren die Signale auf der Membran zu stark, bzw. zu schwach, wurde die Belichtungszeit entsprechend variiert.

## 2.2.2 Arbeiten mit *E. coli*

### 2.2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Die verschiedenen *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium (siehe 2.1.3) aerob bei 37 °C in Reagenzgläsern in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm angezogen. Die Zellzahlen der Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600 \text{ nm}$  bestimmt. Dabei entspricht eine  $\text{OD}_{600} = 1$  einer Zellzahl von ca.  $1\text{-}2 \times 10^9$  Zellen. Bei Plasmidtragenden Bakterienstämmen wurde Ampicillin bzw. Chloramphenicol als Selektionsmarker zum Medium dazugegeben. Um Bakterienstocks anzulegen, wurden die Zellen nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit 1/5 Vol. sterilem Glycerin versetzt und bei  $-70 \text{ °C}$  gelagert.

### 2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien und Transformation

Damit Bakterien in der Lage sind, fremde DNA-Moleküle mit großer Effizienz aufzunehmen, gibt es die Möglichkeit, die Zellen durch Behandlung mit hohen Konzentrationen an Rubidiumchlorid kompetent zu machen. Hierzu wurden verschiedene *E. coli*-Stämme in 400 ml Kulturen in LB-Medium bei 37 °C bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,6 (logarithmische Wachstumsphase 0,4-0,7) angezogen. Die Zellen wurden nach Abkühlung auf Eis bei 3000  $\times g$  und 4 °C für 10 min sedimentiert und in 30 ml eiskaltem TFB I resuspendiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt, das Sediment wurde in 2 ml eiskaltem TFB II aufgenommen und die Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt. Vor der Lagerung bei  $-70 \text{ °C}$  wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zusätzlich zu den kompetenten Bakterien wurden außerdem die käuflich erworbenen OneShot™ TOP10 Zellen verwendet. Hier erfolgte die Transformation nach Anleitung des Herstellers. Dieses Klonierungssystem ermöglichte eine Blau-Weiß-Selektion durch den Zusatz von 50  $\mu\text{l}$  2% X-Gal und 10 mM IPTG zum Transformationsansatz.

Die Transformation der kompetenten Bakterien erfolgte ebenfalls nach der Hitzeschockmethode. 100  $\mu\text{l}$  Zellen wurden mit 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz (siehe 2.2.1.10) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 90 sec Hitzeschock bei 42 °C, die Bakterien wurden kurz auf Eis abgekühlt und 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium zugegeben. Nach 60 min Schütteln bei 37 °C wurde der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.2.3 Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab

Für die Schnellpräparation geringer Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I von Peqlab (Erlangen) verwendet. Die Präparation erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dabei werden Bakterien mit Hilfe von SDS lysiert und die DNA durch Natriumhydroxid denaturiert. Zugabe von Kaliumacetat neutralisiert die Lösung. Denaturierte Proteine und chromosomale DNA präzipitieren mit dem Kaliumsalz des Dodecylsulfats. Die niedermolekulare Plasmid-DNA bleibt in Lösung und kann so isoliert werden.

### 2.2.2.4 Plasmid-Präparationen im großen Maßstab

Für die rekombinante Expression in Bakterien wurden größere Mengen hochsaubere Plasmid-DNA benötigt. Hierzu erfolgte die Isolierung mit Hilfe des NucleoBond<sup>®</sup> PC 100-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Anleitung des Herstellers. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Isolation nach dem oben beschriebenen Prinzip der alkalischen Lyse. Die gewonnene DNA wurde in HPLC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.5 cDNA Phagenbank-Titer erstellen

Zur Identifizierung neuer Gene ist das cDNA Phagenbank Screening eine geeignete Methode, sofern man bereits zumindest einen Teil der Sequenzinformation des Gens besitzt. Das Prinzip des Screenings basiert auf der Southern Blot-Methode, das heißt, man detektiert die gesuchte DNA, die zunächst auf eine Nylonmembran übertragen worden ist, durch eine DIG-markierte Sonde. Ausgehend von dem Chemilumineszenzsignal kann man dann den gesuchten Klon vereinzeln und schließlich die Plasmid-DNA aus den Phagen isolieren. Zunächst wurde der Bakterienstamm XL1-Blue in 50 ml NZYDT Medium bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,5 herangezogen. Nach Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 4 °C und 400xg wurden diese Zellen in 50 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. Die Zellen waren jetzt auf das Anheften der Phagen vorbereitet. Anschließend wurden mit SM-Puffer verschiedene Verdünnungen der Phagenbank erstellt: 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:5000. 10 µl der Phagensuspension wurden zu 600 µl der XL1-Blue-Zellen gegeben und anschließend zur Anheftung der Phagen 15 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Lösung wurde mit 8 ml Topagar, der auf 45 °C temperiert ist, gemischt und auf eine 135 mm NZY-

Agarplatte gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, nach 8 h erschienen die Lysehöfe der Phagen im Bakterienrasen des Topagars. Nun wurde eine entsprechende Verdünnung der Phagensuspension gewählt und die plaque forming units (pfu) pro Mikroliter ermittelt.

#### 2.2.2.6 cDNA Phagenbank Screening

Um eine cDNA-Bank komplett erfasst zu haben, sollte man 10 x 5000 pfu pro 135 mm Platte ausplattieren (siehe 2.2.2.5). Hatten die Plaques die erwünschte Größe erreicht, wurden die Platten zunächst kalt gestellt und dann Nylon-Filter auf den Agar gelegt, wobei die Position der Filter individuell markiert wurde. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Filter vorsichtig abgezogen. Die sich auf den Filtern befindende DNA der Phagen wurde zunächst für 5 min denaturiert. Nach 5-minütiger Neutralisation erfolgte ein 15-minütiger Waschschriff in 2x SSC. Die Membranen wurden getrocknet und die DNA durch Crosslinking bei UV-Licht (1200 mJ) kovalent gebunden. Anschließend wurden die Filter bei 42 °C in DIG Easy Hyb von Roche mindestens 2 h prähybridisiert. Nach Denaturierung der Sonde durch 5-minütiges Aufkochen und Abkühlung auf Eis wurde diese in die Prähybridisierungslösung gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen in mehreren Waschschriffen (2 x 5 min, Puffer I, RT, 2x15 min, Puffer II, 42 °C) von ungebundenen Sondenmolekülen gereinigt. Die Filter wurden kurz in Maleinsäurepuffer äquilibriert und 1 h mit 2 % „Blocking“ Puffer (Roche) in Maleinsäurepuffer blockiert. Anschließend inkubierten die Filter 1 h bei RT in der Anti-DIG-Antikörper-Lösung. Nach zwei weiteren Waschschriffen (15 min) bei RT in Maleinsäurepuffer konnten die Membranen in Detektionspuffer äquilibriert und nach fünfminütiger Inkubation mit CSPD eingeschweißt werden, um einen Röntgenfilm aufzulegen. Die Exposition betrug in der Regel 20 min bei 37 °C. Waren die Signale auf der Membran zu stark oder zu schwach, wurde die Belichtungszeit entsprechend variiert.

Zum Ausstechen der Plaques, die ein positives Signal gegeben haben, wurde der Röntgenfilm mit der richtigen Orientierung auf die Platte gelegt und die Plaques markiert. Zum Ausstechen wurde nach dem ersten Screening zunächst das große Ende einer blauen Pipettenspitze verwendet und das Agarstück in 500 µl SM-Puffer eluiert. Diese Phagensuspensionen wurden nun ebenfalls nach 2.2.2.5 ausplattiert und die Phagen-DNA auf eine Membran übertragen, um die positiven Klone weiter anzureichern. Während des dritten Phagenscreenings waren die positiven Plaques nun soweit vereinzelt, dass sie einzeln ausgestochen werden konnten.

### 2.2.2.7 *In vivo*-Exzision der Plasmid-DNA aus dem Bakteriophagen

Zunächst wurde eine XL1-Blue-Kultur in 50 ml LB-Medium + 2 % Maltose + 10 mM MgSO<sub>4</sub> bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,2-0,5 angezogen und nach Sedimentation der Zellen mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine optische Dichte von 1 eingestellt. Parallel wurden 50 ml LB-Medium mit SOLR-Zellen (s. 2.1.5) beimpft und die Zellsuspension bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 inkubiert. Die aus dem dritten Screening gewonnene Phagensuspension wurde 1:5 in SM-Puffer verdünnt. 200 µl der XL1-Blue Zellen wurden nun mit 250 µl des verdünnten Eluats und 1 µl der ExAssistant Helferphagen infiziert. Nach 15 min bei 37 °C wurde der Lösung 3 ml vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt. Nach weiteren 2,5 h Schüttelinkubation bei 37 °C wurden die Zellreste bei 2000 x g für 10 min und 4 °C pelletiert. Der Überstand inkubierte anschließend 10 min bei 70 °C und wurde dann erneut bei 3220 x g 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Phagen mit dem cDNA-Klon befanden sich nun im Überstand. 200 µl der auf Eis abgekühlten SOLR-Zellen wurden mit 20 µl des Phagenüberstands infiziert und nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C auf LB<sub>amp</sub>-Platten ausgestrichen. Die entstandenden Kolonien konnten nun zur Isolierung von Plasmiden verwendet werden.

### 2.2.2.8 Überexpression in *E. coli*

Die Herstellung des rekombinanten *O. volvulus*-Proteins *Ov*-MTP-1 und des *B. malayi*-Proteins *Bm*-SPR-1 erfolgte in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Die PCR-amplifizierten kodierenden Regionen wurden in die bakteriellen Expressionsvektoren pJC45/pJC40, pGex-4T-1 und pMAL-p2x/pMAL-c2x ligiert. Die entstandenen Plasmide pJC45/MTP und pJC45/SPR wurden in pAPlac-Zellen transformiert. Die pGEX-Konstrukte wurden in BL21(DE3)pLYS transformiert. Die Konstrukte mit dem MBP-Fusionsprotein wurden in BL21-CodonPlus-RIL exprimiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienklone von den LB-Amp-Agarplatten in 500 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin; 100 µg/ml Kanamycin) plus 50 ml 20 % Glukose überführt und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 in der Suspension wachsen gelassen. Die Synthese der Proteine wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und die Bakterien über Nacht bei 18 °C geschüttelt. Anschließend wurden sie 20 min bei 8000xg zentrifugiert und das Sediment bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3 Rekombinante Expression mit dem Baculovirus-System

#### 2.2.3.1 Zellkultur

Da die prokaryotische Expression kein aktives Protein hervorbrachte, wurde mit der Kultur von Insektenzellen begonnen, die als eukaryotische Zelllinie in der Lage sind, posttranslationelle Veränderungen an Proteinen vorzunehmen. Zur Vermehrung des rekombinanten Virus wurden Sf9-Zellen angezogen, die in 85 mm Kulturflaschen unter adherenten Bedingungen bei 27 °C inkubiert wurden. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellen bei Konfluenz passagiert, wobei sie 1:2 bis 1:3 verdünnt wurden. Zur Expression wurden entweder High 5 Zellen oder Sf9 Zellen verwendet, die zunächst adherent angezogen wurden. Für die Expression wurden Flüssigkulturen beimpft, die bei 27 °C und 80 rpm in Spinnerflaschen inkubiert wurden. Die Suspensionskulturen wurden in einem Volumen von 30 ml gestartet und mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml beimpft. Die Kultur durfte eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen pro ml nicht überschreiten. Zum Zählen der Zellen wurde ein 10  $\mu$ l Aliquot entnommen und mit 10  $\mu$ l Trypanblau versetzt. Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, die Färbung ist somit eine Methode zur Feststellung der Viabilität der Zellen. Die Gesamtzellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer ermittelt und die Viabilität durch folgende Formel bestimmt:

$$\text{Lebende Zellen [\%]} = [1 - (\text{Anzahl blauer Zellen} / \text{Gesamtzellzahl})] * 100$$

#### 2.2.3.2 Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA

Bacmid-DNA bezeichnet die in *E. coli* replikationsfähige Form des Baculovirus-Genoms. Das Plasmid-Konstrukt pFastbac/MP wurde in *E. coli* DH10 Bac-Zellen transformiert. Dieser Stamm enthält das Bacmid bMON 14272 und das Helferplasmid pMON 7124, das eine Transposase exprimiert, die für die sequenzspezifische Transposition des rekombinanten Plasmids mit dem Bacmid sorgt. Zur Transformation siehe 2.2.2.2.

### 2.2.3.3 Isolierung rekombinanter Bacmid-DNA

Von den transformierten *E. coli* DH10 Bac-Klonen wurden 2 ml Übernacht-Kulturen angeimpft, über Nacht bei 37°C inkubiert und pelletiert. Der Zelniederschlag wurde vorsichtig in 300 µl Bacmid-Lösung I resuspendiert, um die Schädigung der Bacmid-DNA durch Scherkräfte zu vermeiden. Nach Zugabe von Bacmid-Lösung II und Mischen wurde der Ansatz zur Zelllyse fünf Minuten bei RT inkubiert und anschließend 300 µl einer 3 M Kaliumacetat-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde für 5-10 min auf Eis präzipitiert und dann 10 min bei RT und 10.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde nun mit Isopropanol gefällt (siehe 2.2.1.5).

### 2.2.3.4 Transfektion von Sf9-Zellen

Liegt die Lebendrate bei 95 %, so können die Zellen für die Expression mit dem Virus infiziert werden. Die Transfektion wurde in beschichteten 6-Well-Platten durchgeführt. Pro Well wurden  $9 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Medium ausgesät und zur Anheftung 1 h bei RT inkubiert. Währenddessen wurden 5 µl der rekombinanten Bacmid-DNA in 100 µl TC 100-Medium mit 6 µl Cellfectin-Reagenz in 100 µl TC 100-Medium vermischt und 15 bis 45 min bei RT inkubiert. Vor der Verwendung wurde dieses Lipid-DNA-Gemisch mit 800 µl Medium verdünnt. Die adhären Zellen wurden mit je 2 ml Antibiotika-freiem Medium gewaschen und der verdünnte Lipid-DNA-Komplex wurde auf die Zellen gegeben. Nach fünf Stunden Inkubation bei 27 °C wurde das Transfektionsgemisch wieder entfernt und die Zellen mit 2 ml Antibiotika-haltigem Medium überschichtet. 72 h nach der Transfektion konnte der Überstand, der die rekombinanten Baculoviren enthielt, abgenommen und für die Amplifikation verwendet werden.

### 2.2.3.5 Amplifikation von rekombinanten Viren in Sf9-Zellen

Zur Amplifikation wurden Sf9-Zellen in 185 mm Schalen bis zu einer Konfluenz von mindestens 70 % angezogen. Die Zellen wurden mit 4 ml des Virusüberstandes (siehe 2.2.3.4) und 20 ml frischem Medium überschichtet und 72 h bei 27°C inkubiert. Das Viren-haltige Medium wurde abgenommen und 5 min bei 4°C und 2000xg zentrifugiert, um die Viren von Zellen und Zelltrümmern zu befreien. Der Virusüberstand wurde bei 4°C gelagert.

#### 2.2.4 Larvengewinnung von *S. ratti* nach der Baermann-Methode

Die infektiösen Larven von *S. ratti* wurden aus dem Kot der Wirtstiere gewonnen. Dazu wurde der Kot gesammelt und in dechloriertem Wasser eingeweicht. Nach 3 h bei RT wurde der Kot 1:1 mit Aktivkohle vermischt und das Gemisch in abgedeckten Petrischalen für 5 Tage bei 26 °C inkubiert. In dieser Zeit entwickelten sich die Eier im Stuhl zu heterogonen Adulten, die Nachkommen produzierten, aus denen sich infektiöse Larven (drittes Larvenstadium) entwickelten. Um die Larven aus dem Kot-Kohle Gemisch zu isolieren, wurde dieses in ein mit einem Leinentuch ausgelegten Sieb gegeben, mit vorgewärmten (ca. 30 °C) Kongowasser bedeckt und in einen Trichter gehängt. Der Ansatz wurde mit einer Lampe beleuchtet für eine Stunde stehen gelassen. Der Trichter war mit einem abgeklemmten Schlauch versehen, in dem sich die Larven unten sammelten (Whitehead & Henning, 1965).

#### 2.2.5 Allgemeine biochemische Methoden

##### 2.2.5.1 Reinigung der rekombinant exprimierten Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Bindung eines Proteins an einen Liganden, der kovalent an eine Trägermatrix gebunden ist. Die rekombinante Serinproteinase, der durch Expression mit Hilfe des pJC40-Vektors N-terminal ein Histidin-*tag* bestehend aus 10 Histidinen angefügt wurde, wurde mit Hilfe der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie über eine Säule mit Ni-NTA superflow gereinigt. Das Bakteriensediment aus 3 l Kultur wurde dafür in 15 ml Puffer B, der Harnstoff zur Denaturierung enthält, aufgenommen und die Zellen durch eine Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (15.000 $\times$ g, 45 min, 4 °C) wurden die Zellreste pelletiert und die Proteine im Überstand dann mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Bei dieser Methode binden die Proteine über ihren His *tag* an eine mit Nickelionen beladene Säulenmatrix. Nach dem Entfernen der ungebundenen Proteine erfolgt die Elution durch Steigerung der Imidazol-Konzentration, wodurch das gebundene Protein kompetitiv von der Säulenmatrix verdrängt wird. Die Säulenmatrix wurde hierbei mit dem 10-fachen Volumen an Puffer A äquilibriert, bevor sie mit Proteinlösung beladen wurde. Es folgte ein Waschschriff mit dem 10-fachen Volumen an Puffer C + 20 mM Imidazol, danach wurden die Zielproteine mit 20 ml Puffer C + 100 mM Imidazol und 12 ml Puffer C + 500 mM Imidazol in 1 ml Aliquots eluiert. Die Fraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese auf ihre Reinheit und ihren Proteingehalt überprüft.

### 2.2.5.2 Reinigung der rekombinanten Proteine durch Glutathion-Affinitätschromatographie

Das Plasmid pGEX-4T-1 enthält die Gensequenz für eine Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* und den Polylinker mit diversen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, der eine Klonierung des zu exprimierenden Gens auf verschiedene Arten zulässt. Die Expression des Fusionsproteins (GST + exprimiertes Protein) kann durch das Laktoseanalogon IPTG induziert werden, da sie unter der Kontrolle eines lac-Promotors steht. Die Reinigung erfolgt durch die Bindung des GST-Anteils an immobilisiertes Glutathion (Beads). Von dort kann das klonierte Protein entweder durch die Protease Thrombin abgespalten werden, da sich hinter dem GST eine entsprechende Spaltstelle befindet, oder es kann durch die Zugabe von Glutathion-haltigem Elutionspuffer als GST-Fusionsprotein von den Beads eluiert werden.

Das Sediment aus 100 ml Kultur wurde in 2 ml PBS/ 10 mM DTT resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2,2 ml PBS/DTT/Triton-X-100 hinzugefügt und nochmals 10-15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde nun 15 x je 1 min lang beschallt und dann bei 4°C für 25 min und 15.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4 ml Waschpuffer versetzt und zu 1 ml äquilibrierten Glutathion-Sepharose gegeben. Die Bindung des Fusionsproteins an die Säule erfolgte für 1 h bei RT. Die Säule wurde mit jeweils 5 ml Waschpuffer II und PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 mM Tris-HCl (pH 9 bei 25°C) und 20 mM reduziertem Glutathion.

### 2.2.5.3 Reinigung der rekombinanten Proteine durch MBP-Affinitätschromatographie

Das Maltose Binding Protein hat Chaperoneigenschaften und steigert somit die Löslichkeit von unlöslich exprimierten Proteinen. Außerdem kann es mittels Affinitätschromatographie als Fusionsprotein angereichert werden.

Das Pellet aus 1 l Epressionskultur wurde in 50 ml Säulenpuffer resuspendiert und mit 1 ml Lysozym versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Zellreste 30 min bei 9000 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde mit 2 ml äquilibrierter Amylose-Sepharose versetzt und 1 h bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurde der Resin mit 2x 50 ml Säulenpuffer gewaschen und das Protein im Batch-Verfahren 1 h mit 2 ml Säulenpuffer + 10 mM Maltose eluiert.

#### 2.2.5.4 Reinigung rekombinant exprimierter Proteine aus dem Baculovirus-System mittels Ni-NTA-Agarose unter nativen Bedingungen

Die aus 2.2.3.5 gewonnenen Zellüberstände wurden zunächst von Zellen und Zelltrümmern befreit. Dafür wurden sie für 20 min bei 2.000xg zentrifugiert und die Sedimente verworfen. Um die Lösung einzuengen, wurden die Proteine bei 4°C unter Rühren ü.N. mit 60% Ammoniumsulfat gefällt und tags darauf bei 9.000xg und 4°C für 2 h pelletiert. Das Sediment wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens im Waschpuffer + 10 mM Imidazol aufgenommen. Das Ammoniumsulfat wurde durch Dialyse gegen Waschpuffer entfernt. Um eventuell aufgetretenes Präzipitat zu entfernen, wurde die Lösung erneut für 10 min zentrifugiert und der Überstand auf die äquilibrierte Nickel-Säule gegeben. Pro 4 ml Lysat wurden 200 µl Säulenmatrix verwendet. Die Bindung erfolgte über Nacht im Batch-Verfahren bei 4°C. Anschließend wurde die Säulenmatrix von nicht gebundenen Proteinen mit 5 ml Waschpuffer + 30 mM Imidazol gereinigt, bis der Durchlauf nach photometrischer Analyse eine optische Dichte ( $\lambda=280$ ) von 0 hatte. Das Protein wurde mit Waschpuffer + 100 mM Imidazol eluiert, bis das Eluat eine  $OD_{280}=0$  hatte. Anschließend wurde das Eluat über eine Zellulose-Ausschluss säule von Amicon (Ausschlussgröße 10 kDa) eingengt und dabei der Puffer gewechselt.

#### 2.2.5.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

In Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau von 465 zu 595 nm. Durch den Vergleich mit einer Eichgeraden kann anhand der Extinktionsänderung unbekannter Lösungen deren Proteinkonzentration bestimmt werden.

5-100 µl Proteinlösung wurden mit 900 µl Bradfordreagenz für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Eichkurve wurde mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (0-0,5 mg/ml) aufgenommen.

### 2.2.5.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Die gelelektrophoretische Trennung von Proteinen erfolgte im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970). Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich die Proteine in Abhängigkeit ihrer molekularen Massen trennen. Es wurden Gelvorrichtungen der Firma Biorad mit der Abmessung 8,3x7,3 cm benutzt. Je nach gewünschtem Trennungsbereich wurden 7,5 - 10 %ige Trenngele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist Tabelle 1.4 zu entnehmen.

Tab. 1.3: Zusammensetzung von SDS-Gelelen. Die Angaben beziehen sich auf ein Gel.

	Trenngele		Sammelgele
Acrylamidkonzentration (%)	7,5	10	4
4 x Gelpuffer (ml)	1	1	0,5
Acrylamid-Lösung (ml)	1	1,33	0,26
A. dest. (ml)	2	1,67	1,24
APS (10 % w/v) (µl)	30	30	15
TEMED (µL)	10	10	6

Zuerst wurde die Gelapparatur mit 70 % EtOH gereinigt und zusammengebaut, anschließend das Trenngel gegossen und zur Erhaltung einer geraden Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel auf das Sammelgel gegossen, in welches ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt wurde.

Die Proben wurden, soweit nicht anders angegeben, mit 1 Vol. SDS-Probenpuffer versetzt. Vor dem Auftragen wurden die versetzten Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Trennung erfolgte bei 25 mA/Gel, als Laufpuffer diente Elektrophoresepuffer, die Größenbestimmung erfolgte anhand der in 2.1.1 aufgeführten Proteinstandards. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau bzw. Silberfärbung gefärbt oder für Western Blot-Analysen auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe 2.2.7.2).

### 2.2.5.7 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung und Gelrocknung

Die Proteingele wurden mindestens 1 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend durch Schwenken in Entfärber-Lösung der Hintergrund entfärbt, bis deutliche Proteinbanden sichtbar wurden (die Lösung wurde dabei mehrfach gewechselt). Danach wurden die Gele mit *A. dest.* gespült, in Gelrocknerlösung vorbereitet und zwischen zwei Cellophanfolien eingespannt getrocknet.

### 2.2.5.8 Silber-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Alle Schritte für die Silber-Färbung wurden in einem Volumen von 25-50 ml der jeweiligen Lösung, bzw. *A. dest.* bei RT durchgeführt. Vor der Inkubation der Gele zur Fixierung wurde das Sammelgel entfernt und die Gele kurz in *A. dest.* geschwenkt. Alle Inkubationen wurden für 10 min durchgeführt. Nach Inkubation in Fixierlösung I und II wurden die Gele gründlich mit *A. dest.* gewaschen und darauffolgend in Silbernitratlösung geschwenkt. Die Entwicklung zur gewünschten Bandenintensität wurde in Entwicklerlösung durchgeführt, bevor diese durch Waschen des Gels in *A. dest.* gestoppt wurde. Die Entwicklungszeit hing von der Menge an Protein ab und variierte zwischen 3-20 min. Die Gele wurden dann bis zur Trocknung in *A. dest.* gelagert.

## 2.2.6 Protease Assays

### 2.2.6.1 Gelatine Substratgelelektrophorese

Bei der Substratgelelektrophorese wird während der Präparation des Gels 1 % Gelatine als Substrat hinzugegeben. In diesen Gelen wurden zunächst die zu testenden Proteinase unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 2.2.5.6). Da SDS die Aktivität von Enzymen hemmt, wurde dieses nun durch Inkubation in Triton-X-100 (2,5 %) für 3x20 min bei RT entfernt. Anschließend wurde das Gel 3x 5 min in *A. dest.* gewaschen und 15 min in Renaturierungspuffer inkubiert. Nach Wechseln der Lösung wurde das Gel zur Entwicklung der proteolytischen Aktivität über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, die proteolytischen Banden erschienen gegenüber dem blau gefärbten Gel durchsichtig.

### 2.2.6.2 Gelatine Mikrotiter Assay

Eine andere Möglichkeit zur Messung von Gelatinase-Aktivität und Inhibitorscreening stellt das EnzChek<sup>®</sup> Gelatinase/Collagenase Assay Kit von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) dar. Hier ist das Substrat Gelatine an Fluoreszeinisothiozyanat gekoppelt. Die Markierung ist so stark, dass das FITC gequenched ist. Nach Proteolyse fluoresziert das freigesetzte Fluorochrom in UV-Licht. Der Anstieg an Fluoreszenz ist proportional zur proteolytischen Aktivität der Proben. Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers in schwarzen Mikrotiter-Platten durchgeführt und bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 485$  nm gemessen.

### 2.2.6.3 Substrat-Verdau

Um die Substratspezifität des *O. volvulus* Astacins (im Folgenden als Onchoastacin bezeichnet) zu bestimmen, wurde Fibronectin aus menschlichem Plasma in Proteolysereaktionen getestet. Dazu wurden 20  $\mu$ l Ansätze pipettiert. Die Proteinmenge variierte unter den Substraten von 2,5 – 10  $\mu$ g pro Ansatz, Onchoastacin wurde in einer Menge von bis zu 3  $\mu$ g eingesetzt. Die Reaktion fand im Renaturierungspuffer bei 37 °C über Nacht statt. Anschließend wurden die Proben denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

## 2.2.7 Immunologische Nachweise

### 2.2.7.1 Herstellung von Kaninchen-Antikörpern

Die Herstellung der Antikörper wurde von der Firma Eurogentec (Köln) übernommen. Es wurden pro Antigen zwei Peptide mit putativ hoher Immunogenität ausgewählt, die von Eurogentec hergestellt und in vier Injektionen pro Kaninchen eingesetzt wurden. Das Immunisierungsschema ist in Tabelle 1.5 dargestellt. Es wurden pro Antigen jeweils zwei Kaninchen immunisiert. Die Peptide hatten folgende Sequenz:

*Ov*-MTP-1:

EP051173 H<sub>2</sub>N -PIV YSF DGS HTR REQ R -CONH<sub>2</sub> (16 AS)

Aminosäuren 198-214, am N-Terminus der katalytischen Domäne gelegen

EP051174 H<sub>2</sub>N -CQR GGY TDP RRC GRC R -CONH<sub>2</sub> (16 AS)

Aminosäuren 393-408, am C-Terminus der katalytischen Domäne gelegen.

*Bm*-SPR-1:

EP051175 H2N -ESG VAS TCR GDS GG -CONH2 (14 AS)

Aminosäuren 193-207, schließt den konservierten Bereich um das katalytische Serin mit ein

EP051176 H2N -CKE LRR GNP PKA QVY T -CONH2 (16 AS)

Aminosäuren 229-244, am C-Terminus des Enzyms gelegen

Tab.1.4: Immunisierungsschema der Kaninchen

Tag	0	14	28	38	56	66	87
Injektion	1.	2.	3.		4.		
Blutung	prä-immun			2 ml		2+20 ml	50-60 ml

### 2.2.7.2 Western Blot-Analysen

Den Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Nitrozellulosemembran, um deren immunologischen Nachweis zu ermöglichen, bezeichnet man als Western Blot Analyse. Es wurde die Technik des Semi-Dry-Blottings verwendet. Als Transferpuffer diente der Elektrophoresepuffer. Auf die Kathodenseite der Blotkammer wurden drei in Laufpuffer mit Methanol getränkte Whatmanfilterpapiere gelegt, darauf das Gel, dann die ebenfalls getränkte Membran und wiederum drei feuchte Whatmanpapiere. Die Bildung von Luftblasen wurde dabei vermieden. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte nach Auflegen der Anodenplatte für 55 min bei 2 mA/cm<sup>2</sup>.

Auf Membranen immobilisierte Proteine können durch spezifische Antikörperreaktionen indirekt nachgewiesen werden. Dazu wurden freie Proteinbindungsstellen auf einer Western Blot-Membran durch eine mindestens halbstündige Inkubation mit einer Blockierlösung gesättigt. Anschließend erfolgte die spezifische Bindung des ersten Antikörpers (entsprechend verdünnt in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei RT. Nach zweimaligem Waschen (10 min) in PBS/0,05 % Tween 20 und einem Waschschriff in PBS wurde der zweite Antikörper (Peroxidase-konjugiert, ebenfalls in Blockierlösung verdünnt) zugegeben und für 1 h inkubiert. Es folgten nochmals zwei Waschschriffe mit TBS/0,05 % Tween 20 und PBS, dann erfolgte die Detektion durch eine Chemilumineszenzreaktion. Zur Entwicklung wurde das ECL Detection System nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.2.7.3 ELISA (Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay)

Der ELISA ist eine immunologische Nachweismethode von Proteinen oder Antikörpern mit dem Vorteil, dass man mit ihr eine große Anzahl an Proben gleichzeitig messen kann. Die Reaktion findet in einer Mikrotiterplatte mit 96 Wells statt. Der erste Schritt besteht in dem Beschichten der Wells mit dem zu untersuchenden Antigen. Dazu wurden 200 ng Protein in einem Volumen von 100 µl Beschichtungspuffer pro Well pipettiert und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Die Wells wurden nun 3x5min mit 200 µl PBS/Tween gewaschen und anschließend wurden die nicht besetzten Bindungsstellen der Platte durch Inkubation mit 200 µl 5 % Rinderserumalbumin in PBS für 1 h bei RT blockiert. Nach erneutem Waschschrift wurden 100 µl der Antiseren in unterschiedlichen Verdünnungen in 0,5 % BSA/PBS in die Wells pipettiert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach neuerlichem Waschen wurde der sekundäre, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 0,5 % BSA/PBS in die Wells portioniert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die nicht gebundenen Antikörper durch einen letzten Waschschrift entfernt. Die Entwicklung erfolgt mit dem BD bioscience Kit BD OptEIA™ nach Angaben des Herstellers. Die Reaktionen wurden in einem ELISA Reader bei 450 nm gemessen und die Reaktionsstärke anhand negativer und positiver Kontrollen ermittelt.

### 2.2.7.4 Immunhistologie

*Onchocerca volvulus*-Knoten wurden in 80 % Ethanol oder 4 % gepuffertem Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend in 4 µm dicke Sektionen geschnitten. Darauf folgte zunächst die Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte:

Rotihistol	4 x 5 min
100 % Ethanol	3 x 2 min
96 % Ethanol	2 x 2 min
80 % Ethanol	1 x 2 min
70 % Ethanol	2 x 2 min
<i>A.dest.</i>	1 x 2 min
TBS	1 x 5 min

Die Schnitte waren nun bereit zur Blockierung, die in drei verschiedenen Schritten stattfand:

0,1 % BSA	1 x 5 min
10 % BSA	1 x 30 min
0,1 % BSA	1 x 5 min

Anschließend wurden die Schnitte mit dem zu testenden Antikörper gefärbt, die Inkubation mit einer 1:100 Verdünnung fand über Nacht bei 4 °C statt. Darauffolgend wurden die Schnitte für 30 min mit einem sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper aus Mäusen (1:25) inkubiert, auf den für weitere 30 min ein Anti-Maus-Antikörper aus Kaninchen (1:25) folgte, an den der APAAP-Komplex (1:50) binden sollte, der ebenfalls 30 min inkubierte. Zwischendurch erfolgte jeweils ein Waschschrift mit TBS für 5 min. Die Schnitte waren nun bereit für die Substratreaktion mit Fast red TR Salz (Sigma).

Substratlösung (frisch ansetzen)	1 x 15 min
TBS	1 x 5 min
<i>A.dest.</i>	1 x 5 min

Abschließend erfolgte noch die Kernfärbung und das Eindecken der Objekte:

“Merckspezial“ Hämalaun nach Mayer	1 x 1 min
Nachfärbung Hämalaun nach Mayer	1 x 10 min
Bläuen in Leitungswasser	1 x 20 min
Eindecken mit Deckglas und Merck “AQUATEX“	

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung eines für eine Metallproteinase kodierenden Gens von *O. volvulus*

##### 3.1.1 PCR-Versuche zur Identifizierung der Nukleotidsequenz mit Hilfe von cDNA-Bibliotheken

Metallproteinasen können ebenso wie Serinproteinasen extrazelluläre Matrixproteine spalten und können daher bedeutende Pathogenitätsfaktoren von *O. volvulus* darstellen. In den Überständen von *O. volvulus*-Mikrofilarien-Kulturen wurde durch Substratgelelektrophorese neben Serinproteinaseaktivität auch Metallproteinaseaktivität detektiert (Haffner *et al.*, 1998). Um die Sequenzinformation für ein Gen, das für diese Metallproteinase kodiert, aufzuklären, wurde die NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nach „Expressed Sequence Tags“ (EST) von *O. volvulus* durchsucht. Es wurde ein EST (SWOcl3CA420SK) von *O. volvulus* mit Homologie zu Metallproteinasen gefunden.

Mit Hilfe dieser Sequenzinformation wurden zwei Primer (OvMP<sub>r3</sub> und OvMP<sub>f3</sub>, siehe 2.1.6) entwickelt, mit denen PCR-Versuche mit cDNA-Banken unterschiedlicher Entwicklungsstadien (Mikrofilarien, 2. Larvenstadium, 3. Larvenstadium, Männchen und Weibchen) von *O. volvulus* durchgeführt wurden. Als Primer wurden ein genspezifischer Primer und ein Primer aus der flankierenden Vektorsequenz verwendet. Aus einer cDNA-Bank von Mikrofilarien konnte das 3′ kodierende Ende mit dem Stopcodon amplifiziert werden. Auch die Sequenz aufwärts der bekannten Region wurde erweitert. Die nun bekannte Sequenz umfasste 1085 Basenpaare. Um die Sequenzinformation des 5′ kodierenden Endes zu erhalten, wurden 5′ RACE-PCR Experimente durchgeführt. Die Experimente schlugen fehl, es konnte aus der cDNA kein Vollängenklon amplifiziert werden. Daher wurden aufgrund der neuen Sequenzinformationen weitere Primer entwickelt (OvMP<sub>f1</sub> und -2 und OvMP<sub>r1</sub>, -2). Die beiden reverse-Primer wurden in Kombination mit dem Vektor-kodierenden T<sub>3</sub>-Primer in PCR-Versuchen mit einer weiteren, qualitativ hochwertigeren cDNA-Bank aus Mikrofilarien eingesetzt. Hier konnte ein 3 kb großes Fragment amplifiziert werden (siehe Abb. 3.2). Das PCR-Produkt wurde in den TOPO-TA Vektor kloniert und zur Sequenzierung gegeben. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens der putativen Metallproteinase ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

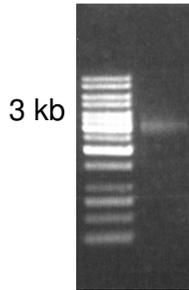
```

atggcattattaaaaatccttctgcagcaaatatTTTTTcaaatTTTatcgactgctact
M A L L K S F C S N I F S N F I S T A T      20
ggaattgaaatctagcattaatcatttcgaatgattactggctgatatttgcctaatc
G I R N L A L I I S N D Y W L I F V L I      40
atTTTgtgcacctgtagtacatctatcgatggagcattTTTTTcttaatgatcctcttcta
I L C T C S T S I D G A F F L N D P L I      60
tcatcaaacatcatttcacgatgaaaaaggatcgaatccagcagaattaccgcaactcag
S S T S F H D E K R I E S S R I T A T Q      80
Agaataattcgagaaaaagcgaaaacatttgggcaaactcggaagagattcagaaagtc
R I I R E K A K T F G Q T A E E I Q K V      100
aatattatctggaagattcgaaaatttgaagctaacaacatccagaagaagctgtt
K Y Y L E K I R K F E A K Q H P E E A V      120
caacgatataccgcaaacgttctacagcggttggaacagaaattgcaaaattcgaaaga
Q R Y T A K R S T A V G T E I A K F E R      140
cgacaaaaggataatattgtgTTgaatcctgaagaaatggTcgatactatgaaggtgac
R Q K D N I V L N P E E N G R Y Y E G D      160
attgTTTggatgcagaacaagcttatcagatctatgagagtacgatacagcatggacga
I V L D A E Q A Y Q I Y E S T I Q H G R      180
cgtataaaacggaaattcatccgTtctgaattacgtcgatgggattctcaciaaccgatc
R I K R K F I R S E L R R W D S H K P I      200
gtttacagTtctgcagcggTcacatactagaccgcaacaacgggtaatcgaattggcgctt
V Y S F D G S H T R R E Q R V I E L A L      220
gaacattggcaaaatataacatgtttaaatttggagcgtcgaatgatgagattcaggaa
E H W Q N I T C L N F E R R N D E I Q E      240
aatcgaatcatctttacggatattgacggatgcgatcaaacgTtggcagacatcctctt
N R I I F T D I D G C A S N V G R H P L      260
ggcgagcacaatttgtctcattggcaccagaatgcattcgattaggagtgatagctcat
G E P Q F V S L A P E C I R L G V I A H      280
gaagTtgcgatgcattgggttcttggcatgaacaatcacgacctgatcgtgataactat
E V A H A L G F W H E Q S R P D R D N Y      300
gttacggTtctgTggagaatattgTcgtgatagcaagggacaattTTTaaagaattg
V T V R V R W E N I D R D S K G Q F L K E L      320
ccagTtTgatgttgataatggtaatgtaccctatgattatggcagTattatgcattacagg
P V D V D N G N V P Y D Y G S I M H Y R      340
agTaaagcatttggTcgatgatgatTtTgtttacattaaacacgcaacataatggattat
S K A F G R Y D D L F T L N T N I M D Y      360
caaaagaccattggacagcgtgatcaattatcgttcaacgatattcgtcttatgaatgtg
Q K T I G Q R D Q L S F N D I R L M N V      380
atataTtTgagcattcatgtccacggaaattaccctgtcaacgtggaggatatacggat
I Y C S D S C P R K L P C Q R G G Y T E      400
ccaagcggatgtggcagatgtcgttgcggatggattcactggaaaactTtTgcaattg
P R R C R C R C P D G F T G K L C Q L      420
gtaatgccaggatttggagcagatttggTggtcgtatagaattgacatcaagTtggagg
V M P G F G A D C G G R I E L T S S W R      440
cgtattacaagTccaattatcccagagaatttaagaaggacaagaatgtagTtggctt
R I T S P N Y P R E F K E G Q E C S W L      460
ctagtagctccacctggTcaacgtgtacagTtacgcttctatggTgaattcgagatgtac
L V A P P G Q R V Q L R F Y G E F E M Y      480
tgtaagTtacggcattcactTtTgcatggattatatacgaatcgcgaattcgactgattc
C K V R H S L C M D Y I E I R N S T D E      500
gctaactcgggaatgagatattgTtTatggaacaccaaattcatcgattatgtcagct
A N T G M R Y C C Y G T P K S S I M S A      520
actgaagatattgTgTgctatttTcattctaccgTgTgTaaaggTtTccaggcg
T E D M L V L F R S F Y R G G K G F Q A      540
caggTaccgcaactaccaatctccgcaactgaacattcggagaacagatctgcaaatgag
Q V R A L P I S A L N I R R N R S A N E      560
ctcaatgcaaaatttgaacgaatacgcgacgatga
L N A N L N E Y A T T      571

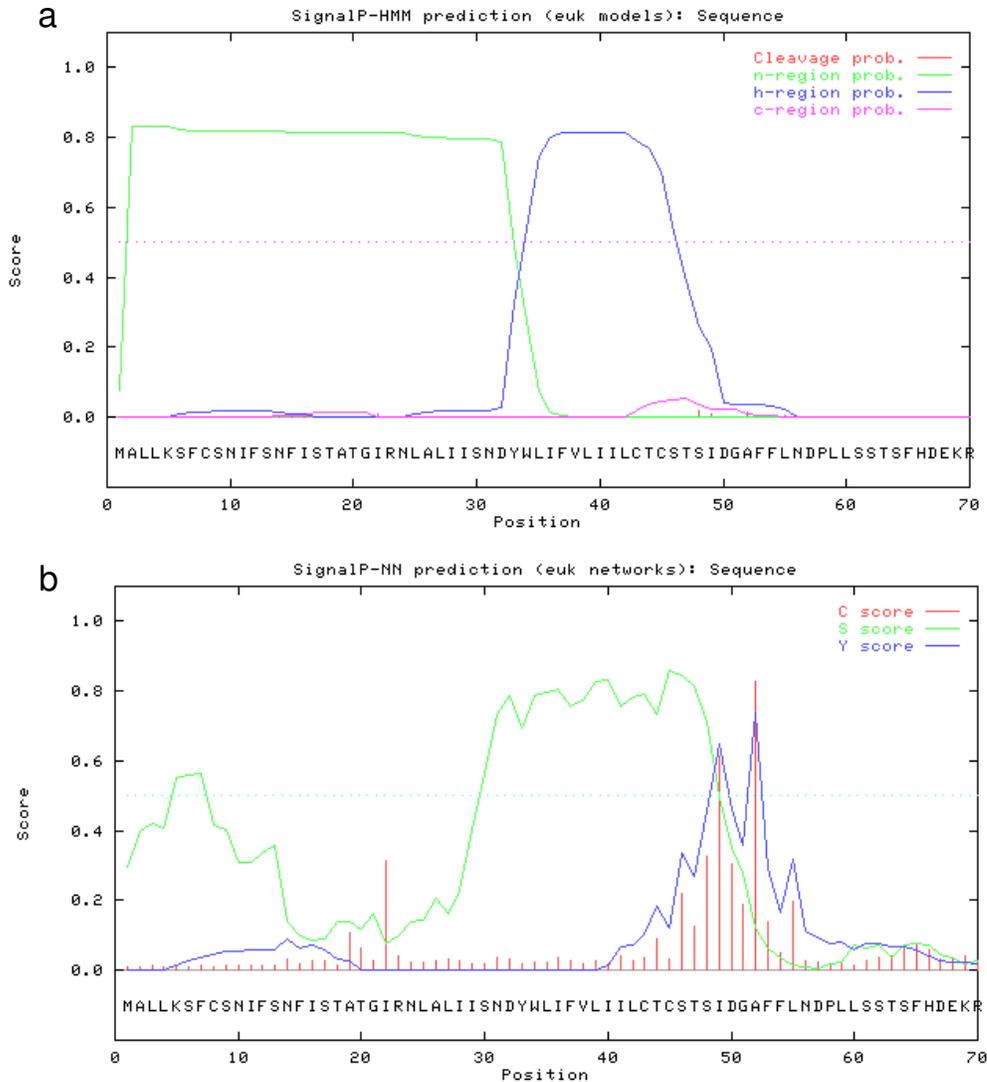
```

Abbildung 3.1

Die Nukleotidsequenz des Onchoastacins. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode wiedergegeben. Die Sequenz des Signalpeptids ist pink unterlegt, der hydrophobe Kern gelb. Das Propeptid ist grau hervorgehoben, die Astacindomäne türkisch mit den rot unterlegten Konsensussequenzen für die Zink-Bindungsstelle und den Astacin-charakteristischen Met-Turn. Die EGF („epidermal growth factor“-artige Domäne ist grün dargestellt, die CUB („complement/sea urchin/BMP 1)-Domäne grünblau. Die N-Glykosylierungsstellen sind grün-braun unterlegt.



**Abb. 3.2**  
PCR-Produkt des vollständig amplifizierten cDNA-Klons, der die gesamte kodierende Sequenz der Metallproteinase enthält.



**Abb. 3.3**

a) Analyse des Signalpeptids durch das SignalP-HMM (*hidden Markov model*) für Eukaryonten. Der Score für die h-Region (blau) gibt die Hydrophobizität jeder dargestellten Aminosäure an, die n-Region (grün) stellt den positiv geladenen N-Terminus des Peptids dar und die c-Region die Wahrscheinlichkeit der Spaltstelle (pink, *cleavage site*).

b) Analyse des Signalpeptids durch die Vorhersage von SignalP-NN (*neural networks*). Die Höhe des C-Wert (C-score) gibt die Wahrscheinlichkeit der Spaltstelle an, der S-Wert (s-score) gibt die Wahrscheinlichkeit für die einzelnen Aminosäuren an, ob die im Signalpeptid liegen und der Y-Wert (y-score) kombiniert beide Aussagen miteinander.

### 3.1.2 Sequenzanalyse der *O. volvulus*-Metallproteinase

Der offene Leserahmen umfasst 1716 Basenpaare, das Genprodukt („ExPASy translate tool“ (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>)) ist 571 Aminosäuren lang und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 66 kDa (Peptide Mass, <http://us.expasy.org/tools/peptide-mass.html>). Die Aminosäuresequenz der Metallproteinase, die von der vorliegenden cDNA-Sequenz abgeleitet worden ist, wurde im Hinblick auf funktionelle Domänen untersucht (Abb. 3.3) Sie enthält ein Signalpeptid (AS 1-51, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), aufgrund dessen anzunehmen ist, dass das Enzym sezerniert wird. Das Signalpeptid zeichnet sich durch einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren aus und enthält einen zentralen hydrophoben Kern (AS 33-42).

Die Domänenstruktur des Onchoastacins wurde mit Unterstützung des „Eucaryotic Linear Motive“-Programms (<http://elm.eu.org/>) untersucht, das ein Hilfsmittel zur Analyse linearer eukaryotischer Motive darstellt. An die Spaltstelle des Signalpeptids fügt sich eine Pre-Prostruktur an, die zur Aktivierung des Enzyms proteolytisch abgespalten werden muss. Die entscheidende, zentrale Domäne, die charakteristisch für neutrale Metallproteinasen ist, umfasst die Aminosäuren 6-199. Diese Domäne enthält die Zink-Bindungsstelle mit der Konsensus-Sequenz HexxH. Enzyme, die diese Domäne aufweisen, gehören zur Superfamilie der Metzincine, die in 40 Unterfamilien unterteilt wird. Die Aminosäuresequenz dieser Domäne zeichnet sich durch eine hohe Homologie zu einer Metallproteinase aus dem Flusskrebs *Astacus astacus* (E.C.3.4.24.21) aus, welches das namensgebende Enzym der Astacin-Protease-Familie darstellt. Die Konsensus-Sequenz für die Zink-Bindungsstelle ist in dieser Familie verlängert: **HExxHxxGFxHExxRxDRD**. Das Zink-Bindungs-Motiv der Metallproteinase aus *O. volvulus* stimmt mit dieser Konsensus-Sequenz überein. Damit ist die *O. volvulus* Metallproteinase ein Mitglied der Familie der Astacine. Des Weiteren ist der Met-Turn hervorzuheben, der zur strukturellen Integrität des aktiven Zentrums beiträgt (Jiang & Bond, 1992) und ebenfalls in die Astacin-Domäne eingebettet ist.

Die Astacin-Familie (Peptidase-Familie M12A) ist eine Unterfamilie der Metzincine. Mitglieder dieser Familie enthalten überwiegend eine Pre-Prosequenz am aminoterminalen Ende, nach deren Abspaltung das Enzym aktiv ist und zwei konservierte Disulfidbrücken innerhalb der Astacin-Domäne (AS 6-199). Die Aminosäuren 201-233 umspannen die EGF („epidermal growth factor“)-Domäne, die häufig in sezernierten Proteinen zu finden ist. Direkt an die EGF-Domäne schließt sich die CUB („complement/sea urchin EGF/BMP1“)-Domäne an (AS 244-360). Die CUB-Domäne ist ebenfalls

charakteristisch für Astacine. Sie enthält 116 Aminosäuren, darunter vier Cysteine, die zwei Disulfidbrücken bilden. Es wird postuliert, dass die CUB-Domäne eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielt, zum Beispiel bei der Multimerbildung oder der Substratfindung (Bond & Beynon, 1995). Somit könnte die CUB-Domäne eine entscheidende Funktion bei der Substrat-Bindung der Protease darstellen. Die Aminosäuresequenz des Onchoastacins enthält insgesamt 16 Cysteine, die in der Astacin-Protease-Familie konserviert sind und die an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt sein könnten. Die Anordnung der Domänen ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt.

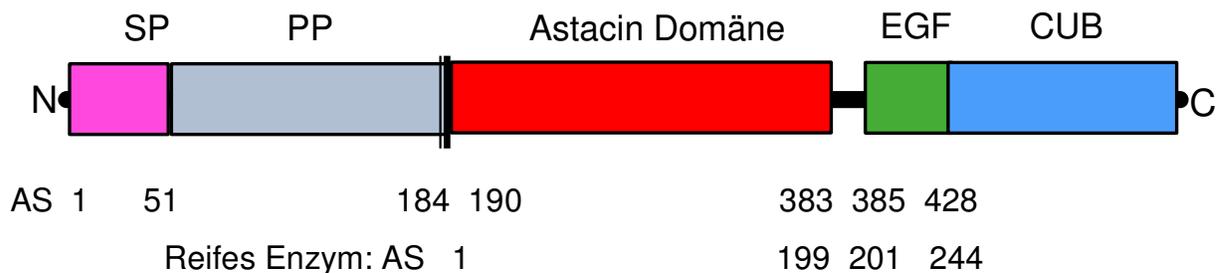


Abb. 3.4

Schematische Darstellung Domänenstruktur des Onchoastacins. SP = Signalpeptid, PP=Propeptid, EGF=„epidermal growth factor“-ähnliche Domäne, CUB=„complement/sea urchin“ EGF/BMP1)-Domäne.

### 3.1.3 Phylogenetische Analyse des Onchoastacins

Um Aussagen über die Evolution des Onchoastacins im Vergleich zu anderen Astacinen zu machen, wurden vergleichende Sequenzuntersuchungen durchgeführt. Dafür wurde die Aminosäuresequenz zunächst mit dem BLAST-Programm der NCBI-Datenbank (Basic Local Alignment Search Tool) untersucht. Aufgrund der stark gestiegenen Anzahl an veröffentlichten Sequenzen und dem steigenden Interesse an der Astacin-Protease-Familie stieg die Anzahl der Hits auf 904 homologe Sequenzen (02/2006). Die höchste bekannte Homologie des Onchoastacins besteht zu dem NAS („nematode astacins“) 35 von *C. elegans* (71 % Identität). Dieses Protein ist für den saprophytischen Organismus nicht essenziell, wie Suzuki und Mitarbeiter (2004) durch RNAi Analysen ermittelt haben. Das bis heute am engsten verwandte Astacin eines parasitären Nematoden entstammt der humanpathogenen, als Larve intrazellulär lebenden *Trichinella spiralis* (59% Identität). Als nächstes wurde ein Mehrfach-Sequenzvergleich („multiple alignment“) der gesamten Proteinsequenz von *O. volvulus* und mehreren anderen parasitären Nematoden, sowie dem namensgebenden Enzym aus *A. astacus* mit Hilfe des BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) durchgeführt. Das Alignment ist in Abbildung 3.5

dargestellt, die Identitäten der einzelnen Sequenzen zum Onchoastacin sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Stark konserviert sind die Aminosäuren insbesondere im Zinkbindungsmotiv, in dem Met-Turn und die für die Struktur wesentlichen Cysteinreste.

Tab. 3.1:  
Verwandtschaftsgrade der Sequenzen aus dem Mehrfach-Sequenzvergleich mit dem Onchoastacin

Organismus	Identitäten zu Onchoastacin	Identitäten zur Onchoastacin-Astacin-Domäne
<i>C. elegans</i>	71 %	81 %
<i>T. spiralis</i>	59 %	66 %
<i>S. stercoralis</i>	32 %	34 %
<i>A. caninum</i>	31 %	33 %
<i>A. astacus</i>	38 %	38 %

```

O. volvulus      1 MALLKSFCSNIFSNF ISTATGIRNLALI ISNDYWLIFVLI I LCTCSST I DGAFF I NDPLL
T. spiralis      1 -----MNENHFKSNSEFCANKSTFLCNVILFKCKNE
C. elegans       1 MYMIQGCYIPAKSDK ILETIFSDAPPVYRQPRTKAEK I ERFNRNIAR I FSPFVYE I NNTTPP
S. stercoralis   1 -----FTVFFL
A. astacus       1 -----MQCAVLLV I LGVVAASPIIP
A. caninum       1 ---MRVLLLLLLLS I CASAGFLDTKFGQKIKKTLDK I KAV I LNGTAL I AIREK I RLREK
consensus       1             i             v i t i v l
    
```

```

O. volvulus      61 SSTS F HDEKRI E SSR -----IT
T. spiralis      32 QV A F F Q I E A N I Y Q S E -----DS
C. elegans       61 HFDNF I WQONAPAVTPEPFTFAPFSFPTLATVAPPAPGGPPTLEPFLPTTASP KLLAHN
S. stercoralis   7  SL S I C M I L G D I N S N R -----
A. astacus       21 EAARALYNDGMFEG -----
A. caninum       57 IKAKLT I SPARKAILD -----
consensus       61  a f i i i
    
```

```

O. volvulus      78 ATQR I IREKAKTFGQTA B E I Q R V K Y Y L E K I R K F E A K Q H P E E A V Q R Y T A K R S T A V G T E I A K
T. spiralis      49 FHRRLQDQRKNASNSIDY L K K K P H K E Q P G R F M D S D P H -----
C. elegans       121 TARM I R E I A S F S D G G R S R D Q D F G A V Q T L M Q A F F E A V S S G N N G G A G A A A G A G T A L G D A P M L
S. stercoralis   22 -----N--N-----I E S I E T -----
A. astacus       36 -----D-----I K I R A G R Q P -----
A. caninum       73 -----EVMKH I K M I K I D K I Q E K G D S I D E I N E K S A I C -----
consensus       121  i             e i k             r m e a h a
    
```

```

O. volvulus      138 F E R R Q K D N I V L N P E N G R Y Y E G D I V L D A E Q A Y Q I Y E S T I Q H G ---R R I K R K F I R S E L R R W
T. spiralis      87 -GKS-----P E E S G S H Y E G D I V L T P E Q A E E I Y S S L V H K M ---I R Q K A Q F I A L N A R H W
C. elegans       181 Q A H R D G T E L G A N R A L T N K L F E S D M V L T V K Q M K A I V L A A Q E A R N P H G R K R K R V I T G S V Y R W
S. stercoralis   30 ---R-----V K K S V T I N L P L K W
A. astacus       46 ---AR-----V G A A I L G D E Y L W
A. caninum       104 ---Q-----L L Y Q G D I V L T E K Q A Q Q I T E D I E N D K G ---D R E K R Q A F I D R N Y P R
consensus       181  rr             y e g d i v l t q a i             r k r i r y r w
    
```

```

O. volvulus      195 D S - H K P I V Y S F D G S H T R R E Q R V I E L A L E H W O N I T C L N F E R R N D E I Q E N R R I I F T D I D G C A S
T. spiralis      135 D S - S V P I D W S F D G S H T S K Q E R L I E L A L K H W E N V T C I R F R R F D T P K G N R I I F T D V D G C A S
C. elegans       241 K S - V I P F R E K G - G - - D A K W K L I R E G L G L W E K E T C V R W S E - - N G P G K D Y V I F R G S G C Y S
S. stercoralis   44 S - - - F P I D Y Y V E D G - - - I N E D T I T K G L T L E R D T C I R F R I T - N R F T K G G I V Y R P G N R C V S
A. astacus       60 S G G V I P Y T F A G V S G - - - A D Q S A I L S G M Q E L E E K T C I R F V P R - T T E S D Y V E I F T S G S G C W S
A. caninum       146 I L W S K G V Y E H F H R N A T P E V R S V F V K G A K L W M K D T C I D F F E - - S N S A P D R I R V F K E N G C W S
consensus       241  s s v p i y f d g t r r v i g l k w e k e T C i r f r r             r i i f t g g C y S
    
```

```

O. volvulus      254 NVGRHPLGEPQFVSLAPECRRLGVI AHEVAHALGFWHEQSRPDRDNYVTVRWENIDRDSK
T. spiralis     194 NVGRNPKKEPQYVSLSLDC KRLGVI AHEVAHALGFWHEQSGADKDRFVNVVWRNIDEGSL
C. elegans      295 SVGR--TGGSQLISITGYCEDKGI VAHEVGHSLGFWHEQSRPDRDDYIHLRKDWLIKGTID
S. stercoralis  97  FIGKISKINPQETIQISNECDIVIVVIHEITSHALGVITHEMTRHRRNNYTDILYQNMNPQVGR
A. astacus     116 YVGR-ISAQOVSLQANGCVYHGTTIHELMHAIGFYHEHTRMDRDNYVTINYNQVDPDPSMT
A. caninum     204 YVGR--LGGEQDLSLGECCQSVGTAAHEIGHAIGFYHTHARHDRDNFTIFNAQNVKPDWL

consensus      301 fvGr lggpQ vsla gCl lgviaHHvaHalGfwHeqsr Drdnyvtv wqnidpqs
O. volvulus     314 GQFLKELPVDVDNGNVPYDYGSIIMHYRSKAFGRYD--DLFTLNTNIMDYQKTIGORDQLS
T. spiralis     254 AQFLKEQTRFVDSKGIPTDYGSIIMHYRSKAFKNG--DLYTLTNTVQNYQRTIGORDHLS
C. elegans      353 GNFEKRSWEEIEDMGVPHYDYSVMHYGSNAFTKW--DQITITETKDSRYQGTIGORQKLS
S. stercoralis  157 FNFIDINSLDETLPYGTRYDYGSIIMHYDRLAGSFN---RGVVMSPKKNQYLKTIQGTTEYG
A. astacus     175 SNFDIDTYSRY--VGEDYQYYSIMHYGYSFSIQWGVLETIVPLQNGIDLTDTPYDKAHML
A. caninum     262 DQFTLQTPATNENYCTIYDYGSIIMHYGANSASQNG---RPTMVPHPDKYVETLGSPIISF

consensus      361 gqFekes evd gvpYdygSiIMHYgs afsrn d tl t yqktigqr hls

O. volvulus     372 FNDIRLMNVITYCSDS CPR--KLP CQRGGYTDPRRCGRRCRCPDGGFTGKLCQLVMPGFGADC
T. spiralis     312 FNDIRLMNQTICSHVGT---PLNCQRGGYTDPKCTVAVALTGLQANFVKASLVLMQIV
C. elegans      411 FIDVKQVNRLYCNSVCPV--ALPCMGGYPDPNNAVCKCPDGLGGKLCGRAAKGTDHDK
S. stercoralis  214 FNDAKRLNMHECNHCKPK--KLVCAANGYTNPNNKVCKCPRMFTGVL CASVRPSHRSCG
A. astacus     233 QTANQINNLTYNECSLR---H-----
A. caninum     319 YELLMINKHYDCTKNCDPATSAQCKMGGCPHPRDCTRICPSSGYGKLCQDKPACCGSIY
consensus      421 fndirlmn iychn cpr kl c rgytdpr c vcrcp gf gklc g

O. volvulus     430 GERIELTSSWRRITSPNYPREFKEGQ-EC SWL VAPPGQRVQLRFYGEFEMYCKVRHSLC
T. spiralis     369 VDWLQLKVDGIIITSPNYPKAFKAATRIASWLFRA SDGLRVELEFIERFDIYCKAEHSLC
C. elegans      469 CE-----GELTATAEWQEMVYKGRITCNWVKKSPSGGRVRLVLTETLR----YQCAPAC
S. stercoralis  272 IT-----KYTATNNYKFIQTKGKRYCYIYQLTAPKGFVRLTISNLN--VADSFVCQP
A. astacus     -----
A. caninum     379 QATNQYQTLHDEICDKRAGQRPREDMDFCYIYWTAPKGSKTEIKTAGLSQG--AAVEGCQ
consensus      481 g ias ny k g r c w l ap g rv l l l c

O. volvulus     489 MDYIEIRNSTDFANTGMRYCYGTP-KSSIMSAIEDMLVLF RSYFYRGKGFQAVRALP-
T. spiralis     429 MDYIEIRNSSDFANTGMRLCCHNIP-KQRIYSSITDMLVLF RSYFYRSGLGFRAVRVAVVK
C. elegans      518 KAYIEIKHNTDFQOTGFRVCCFNKT-YDVISDQSEALILSNANIVDYEVSYKLOWIQGTP
S. stercoralis  322 GSGLEIKYLADKAVSGAMLCKGISAK-KEFVSENNYIVIRYVKGKSFSDLSIKFISFK---
A. astacus     -----
A. caninum     437 YWGV EIKTHADQRLTGYRF CAPEDVGVRLLVSNFNIVPIITINIFAYATYVDIQRIVGDN-
consensus      541 yieik tdfantg rlcc k is t miv f fy l fr rv a

O. volvulus     547 -----ISALNIRRRNRSANELNANLNEYAT
T. spiralis     488 GER-----LRSIRSVPSPGWEKWEWSPCSVSCGGCVQTRQRKCPKDSL CAGESTSVQ
C. elegans      577 PPPPFLSIERTFFQTTEKLFHHRNPRRPGCEKRIDHSAEWRTRAAPSKSSSSCKRSQRSE
S. stercoralis  -----
A. astacus     -----
A. caninum     496 -----VGGPMPQPQPN SNCVDNEQCA
consensus      601 r p

O. volvulus     571 T-----
T. spiralis     543 SCG-----NVPCGNVPECKCKEKLVSVCGLWGLFRCEAMQSV EPCKEKCCCT
C. elegans      637 TRIGHWRVLLVLLRNMV SQRYLVYRIMESSPFGTIFAIVRGIYIYICKFCTIIPKIQFFFH
S. stercoralis  -----
A. astacus     -----
A. caninum     517 TLVR-----TKN----FCQSRFFTESVKRGLCPKSSGFRCR
consensus      661 t p

```

```

O. volvulus      -----
T. spiralis     592 GYTVVNGVCEPVTL
C. elegans      697 NFQNLILIFHNYSG-
S. stercoralis  -----
A. astacus      -----
A. caninum      548 -----
consensus       721

```

### Abbildung 3.5

Sequenzvergleich der Astacin-artigen Metallproteinasen von *O. volvulus*, und einigen anderen parasitären Nematoden (*Trichinella spiralis* Accession Nr. AAM09529, *Strongyloides stercoralis* Accession Nr. AAK 55800, *Ancylostoma caninum*, Accession Nr. AAG 29103), *Caenorhabditis elegans* Accession Nr. AAF60901 und das namensgebende Enzym aus dem Flusskrebs *Astacus astacus* (Accession Nr. CAB43519). Identitäten sind schwarz unterlegt, Ähnlichkeiten grau, das Zink-Bindungsmotiv und der Met-Turn sind mit Boxen markiert. Die konservierten Cysteinreste sind rot unterlegt.

Um die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen dem Onchoastacin und anderen Mitgliedern der Astacin-Protease-Familie aufzuklären, wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit Hilfe des Programms Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) erstellt. Der phylogenetische Stammbaum (Abb. 3.6) ist eine Darstellung der Abstammungslinien mehrerer Arten bezogen auf ein Protein. Die Länge der Äste ist proportional zu der evolutionären Änderung der Art.

Das *O. volvulus*-Astacin ist im selben Cluster zu finden wie Astacin-ähnliche Metallproteinasen von *T. spiralis*, *C. elegans* und *C. briggsae*. Die scheinbar engere Verwandtschaft des Onchoastacins zu Astacinen von protozoischen Parasiten ist eine Folge der Darstellung des Stammbaums durch Clustal W und entspricht nicht den tatsächlichen Identitäten. Außerdem ist anzumerken, dass die Diversität der Proteine im Wesentlichen durch die Tatsache zu erklären ist, dass die einzelnen Organismen mehrere Astacine haben. Wenn also Astacine einer Art stark voneinander abweichen, so ist es möglich, dass Einzelne ihrer Funktion entsprechend näher an ihren Orthologen anderer Spezies liegen. Von der nah verwandten Filarie *B. malayi* ist trotz vollständiger Sequenzierung noch keine Astacin-artige Metallproteinasen annotiert worden. Daher konnte sie nicht mit in den Stammbaum einbezogen werden.

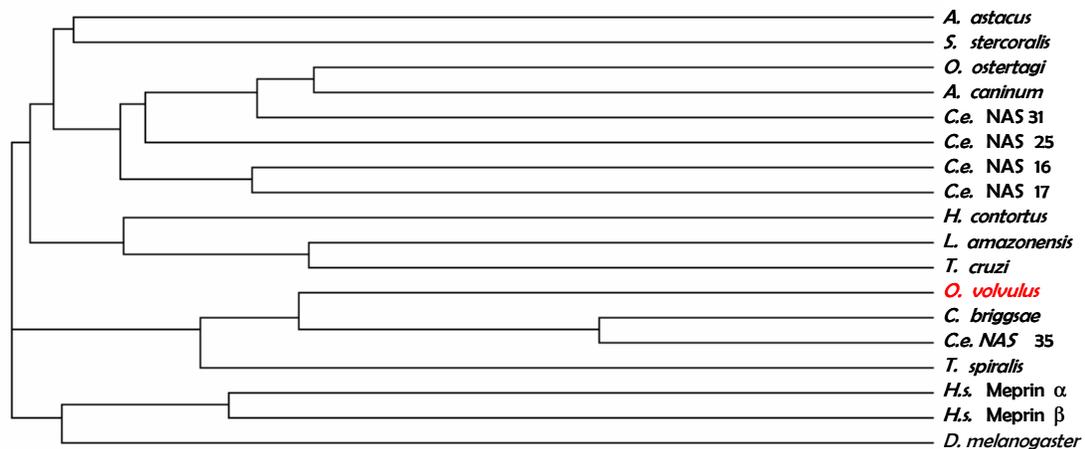


Abb. 3.6:

Phylogenetischer Stammbaum einiger Mitglieder der Astacin-Protease-Familie. Der Baum beinhaltet folgende Proteine: *A. astacus* (CAB43519), *S. stercoralis* (AAK 55800), *O. ostertagi* (AAS47831), *A. caninum* (AY036056), *C. elegans* NAS 31 (NP\_001023994), *C. elegans* NAS 25 (CAA91045), *C. elegans* NAS 16 (CAA98503), *C. elegans* NAS 17 (CAA98501), *H. contortus* (CAA 99352), *Leishmania amazonensis* (AAA82695), *Trypanosoma cruzi* (AAF15093), *C. briggsae* (CAE70154), *C. elegans* NAS 35 (accession no. P98060), *T. spiralis* (AAM09529), humanes Meprin  $\alpha$  (NP\_005579), humanes Meprin  $\beta$  (NP\_005916), *D. melanogaster* (AAV55427). Das Astacin von *O. volvulus* ist rot markiert und befindet sich im selben Cluster wie *T. spiralis*, *C. elegans* und *C. briggsae*. Die Länge der Äste ist proportional zu der evolutionären Änderung der Art.

### 3.1.4 Dreidimensionale Struktur des Onchoastacins

Zur Aufklärung der 3D-Struktur des Onchoastacins wurde von Dr. Christoph Becker-Pauly (Universität Mainz) mit Hilfe des Swiss Model Servers ein theoretisches Modell der aktiven Form erstellt. Das Molekül ist, wie bei den Astacinen verbreitet, nierenförmig mit einer tiefen Spalte zwischen der aminoterminalen und der carboxyterminalen Domäne. In dieser Spalte befindet sich das aktive Zentrum, an dessen Grund das Zink durch die Histidine 96, 100 und 106, sowie das Glutamat 97 und Tyrosin 155 komplexiert ist. Die N-terminale Domäne ist geprägt von vier parallelen  $\beta$ -Strängen und einem antiparallelen  $\beta$ -Strang (in blau dargestellt), sowie zwei  $\alpha$ -Helices. In der C-terminalen Domäne findet man lediglich eine  $\alpha$ -Helix (grün). Siehe Abb.3.7.

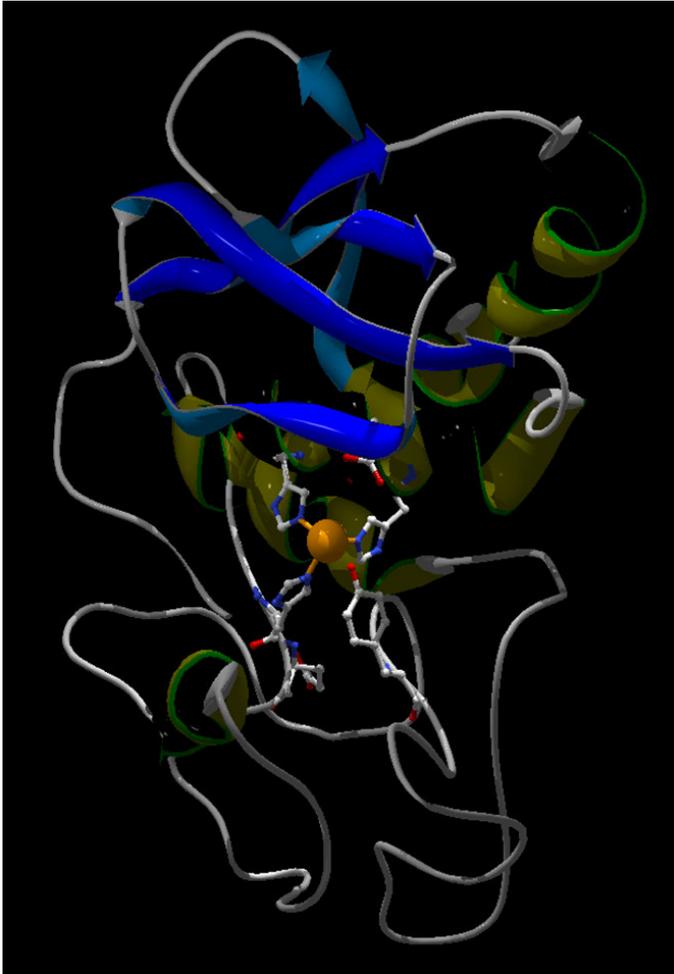


Abb.3.7  
Dreidimensionales Modell der aktiven Form des Onchoastacins (erstellt von Dr. Christoph Becker-Pauly, Universität Mainz). Das Molekül ist nierenförmig, die obere Hälfte wird von der N-terminalen Domäne gebildet, die durch die Spalte des aktiven Zentrums, in der das komplexierte Zink (in gelb dargestellt) liegt, von der C-terminalen Domäne, die kaum reguläre Strukturen aufweist, getrennt ist. Die vier parallelen  $\beta$ -Stränge der N-terminalen Domäne sind blau, der antiparallele Strang hellblau gefärbt. Die  $\alpha$ -Helices sind grün dargestellt.

### 3.1.5 Analyse des Transkriptionsmuster des Onchoastacins

Um festzustellen, ob das Onchoastacin regulatorisch oder konstitutiv exprimiert wird, wurden PCR-Analysen durchgeführt. Da von *O. volvulus* nicht von allen Entwicklungsstadien Material zur RNA-Gewinnung zur Verfügung stand, konnten keine Analysen auf Transkriptebeine durchgeführt werden. Daher wurden Oligonukleotide entwickelt, die ein Fragment von 550 Basenpaaren innerhalb des offenen Leserahmens umspannen. Mit diesen Primern wurden PCR-Experimente durchgeführt. Als Template dienten cDNA-Banken der verschiedensten Entwicklungsstadien von *O. volvulus*. Eine cDNA-Bank stellt ebenfalls das Gesamttranskript des Organismus zur Zeit der RNA-Gewinnung dar. Ein Foto der anschließenden Gelelektrophorese ist in Abb. 3.9 dargestellt. Das entsprechende Fragment des Onchoastacins konnte aus allen vorhandenen cDNA-Banken amplifiziert werden. Als Positivkontrolle diente das pMALc2x/MP-Expressionskonstrukt, von dem eine verdünnte Plasmidpräparation als Template eingesetzt

wurde. Um auszuschließen, dass die Primer unspezifisch binden, wurde außerdem cDNA von *Plasmodium falciparum* eingesetzt. Hier wurde kein Amplifikat gewonnen, daher fehlt dieses Ergebnis in Abb. 3.9. Interessanterweise konnte das Fragment auch in einer cDNA-Bank von *B. malayi* amplifiziert werden, wie in Spur 9 zu sehen.

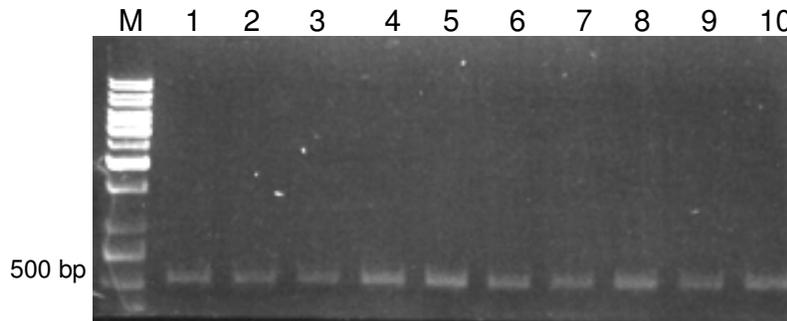


Abb. 3.9

Transkriptionstudie mittels PCR. Als Template dienten jeweils stadienspezifische cDNA-Banken von *O. volvulus*. Spur 1: Männchen; 2: Weibchen; 3: Weibchen, die nach Ivermectin-Behandlung des Wirts entnommen wurden; 4+5: unterschiedliche Mikrofilarien-Banken; 6: zweites Larvenstadium; 7+8: unterschiedliche L3-Banken; 9: *B. malayi*-Männchen; 10: Positivkontrolle: Plasmid-Präparation des pMALc2x/MP-Expressionskonstrukts. Als Negativkontrolle wurde *Plasmodium falciparum*-cDNA verwendet (Nicht abgebildet).

Zur weiteren Analyse der genomischen Organisation des Onchoastacins wurden Southern Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden Weibchen von *O. volvulus*, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, aufgearbeitet und deren genomische DNA isoliert. Es wurden 1 bis 5  $\mu\text{g}$  DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und nach Alkoholfällung auf einem 1%igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetragen (s. Abb.3.10). Die DNA wurde mittels eines Kapillarblots auf eine Nylonmembran übertragen und durch verschieden markierte Sonden detektiert. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein PCR-Produkt des gesamten offenen Leserahmens des Onchoastacins aufgetragen. Es wurden neben DIG-markierten Sonden radioaktiv markierte Sonden, sowie Fluoreszein-markierte Sonden eingesetzt. In Abb. 3.7 sieht man ein Foto des Agarose-Gels. Auf Abbildung 3.11a ist ein Southern Blot abgebildet, der mit dem DIG-System entwickelt worden ist. Spur M zeigt den DIG-markierten Marker und auf Spur 1 ist die Positivkontrolle dargestellt, ein PCR-Produkt des offenen Leserahmens. Es konnten mit diesem Detektionssystem keine Banden in der genomischen DNA nachgewiesen werden. Abb. 3.11b zeigt einen weiteren Southern Blot, der

mit einer Fluoreszein-markierten Sonde geprobt wurde. Die DNA, die auf Spur 1 aufgetragen worden ist, wurde mit dem Restriktionsenzym *NdeI* verdaut, die auf Spur 2 mit *EcoRI*. Beide Enzyme schneiden laut bioinformatischer Analyse nicht innerhalb des offenen Leserahmens. In beiden Proben sind zwei Banden unterschiedlicher Größe zu erkennen. Dieser Befund spricht für das Vorhandensein von mindestens zwei Astacin-Genen im Genom von *O. volvulus*.

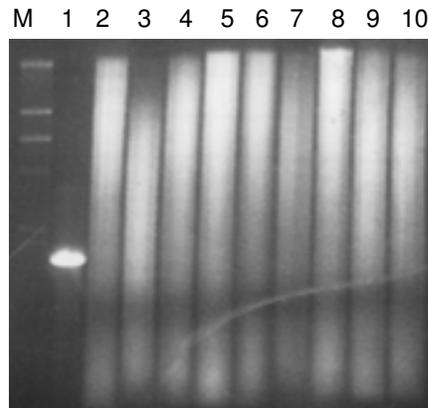


Abb. 3.10

TAE-Agarose Gel nach Restriktionsverdau der genomischen DNA von *O. volvulus*. Spur 1 zeigt den DIG-markierten Marker, Spur 2 ein PCR-Produkt des offenen Leserahmens. Die DNA wurde mit folgenden Restriktionsenzymen verdaut: Spur 2: *BamHI*; 3: *PstI*; 4: *XhoI*; 5: *SmaI*; 6: *XbaI*; 7: *NdeI*; 8: *EcoRI*; 9: *NcoI*; 10: *NotI*

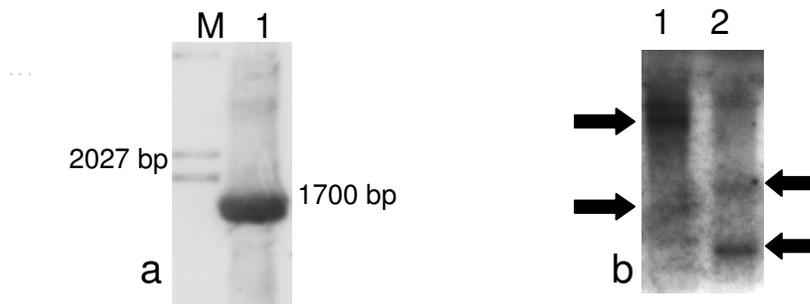


Abb. 3.11

a) Southern Blot von *O. volvulus*-DNA nach DIG-Detektion. Spur M zeigt den DIG-markierten Längenstandard, Spur 1 die Positivkontrolle, ein PCR-Produkt des gesamten offenen Leserahmens. Es konnten mit diesem System keine Banden in der genomischen DNA nachgewiesen werden. b) Southern Blot von *O. volvulus*-DNA nach Fluoreszein-Detektion. Die Banden sind wegen des starken Hintergrunds mit Pfeilen markiert. Die DNA in Spur 1 wurde mit *NdeI* verdaut, die in Spur 2 mit *EcoRI*. Es sind jeweils zwei Signale pro Spur zu erkennen.

### 3.1.6 Prokaryotische Expression der Metallproteinase

#### 3.1.6.1 Expression mit His-Tag und Signalpeptid

Aus der Sequenz des Volllängenklons wurden Primer abgeleitet, die Schnittstellen für die Klonierung in den Expressionsvektor pJC40 enthalten. Der Primer am 5´Ende enthält das Palindrom *catatg*, das das Restriktionsenzym *NdeI* erkennt. Darüber hinaus kodiert das Triplet *atg* für Methionin, ist also essenziell für die Initiation der Expression. Der Primer am 3´Ende enthält die Sequenz *ctcgag*, die von dem Enzym *XhoI* erkannt wird. Das restringierte PCR-Produkt wurde in den linearisierten Vektor ligiert und anschließend sequenziert, um sicher zu gehen, dass durch PCR oder Klonierung keine Stopcodons oder Leserasterverschiebungen in die Sequenz eingeführt worden sind. Zur Expression wurde das Konstrukt in *E. coli*-pABlac-Zellen transformiert. Die Reinigung erfolgte über Affinitätschromatographie, jedoch mit einer sehr schlechten Ausbeute. Das Protein konnte im Western Blot nicht durch einen Anti-His-Antikörper nachgewiesen werden.

#### 3.1.6.2 Expression mit Glutathion S-Transferase-Tag

Als Alternative wurde des Weiteren die Methode der Glutathion S-Transferase-Expression getestet. Zunächst wurde das Expressionskonstrukt hergestellt. Dazu wurden Primer abgeleitet, die Sequenzen für die Restriktionsenzyme *SmaI* (5´) und *XhoI* (3´) enthalten (s. 2.1.1). Das Fragment, das durch diese Primer amplifiziert wird, umspannt die kodierende Sequenz für die Metallproteinase ohne Signalpeptid. Es wurde mit genannten Restriktionsendonukleasen enzymatisch verdaut und nach Aufreinigung in den linearisierten Vektor pGEX-4T-1 ligiert. Nach Überprüfung des Leserahmens durch Restriktionsverdau (Abb.3.12) und Sequenzierung wurde das Konstrukt in *E. coli*-BL21(De3)Lys-Zellen transformiert, die besonders geeignet zur Expression toxischer Proteine sind, da sie ein zusätzliches Plasmid enthalten, auf dem die kodierende Sequenz für T7 Lysozym liegt, einem natürlichen Inhibitor der T7 RNA Polymerase. Das T7 Lysozym wird in geringen Mengen exprimiert und inhibiert so die Transkription des rekombinanten Proteins vor der Induktion.

Um festzustellen, wie effektiv diese Expressionsmethode ist, wurde zunächst eine Pilotexpression gestartet, in der man kleine Kulturen induziert und das Bakterienlysat auf ein SDS-Gel aufträgt (s. Abb. 3.13). Es wurden vier verschiedene Klone auf ihre Expression getestet, wobei jeweils Lysat und Pellet auf das Gel aufgetragen wurden. Das Pellet entspricht den Einschlusskörpern des Bakteriums, das diese bei toxischen Proteinen oder großen Mengen rekombinanten Proteins bildet. Klon 1 enthält den Leervektor und exprimiert dementsprechend die GlutathionS-Transferase als lösliches Protein. Klon 2 und 3 enthalten im Pellet deutliche Banden bei 75 kDa, die der Größe des GST-Fusionsproteins entsprechen, Klon 4 zeigt ebenfalls diese Bande, jedoch in geringerer Intensität (Abb. 3.13). Im löslichen Überstand der Klone, die den Expressionsvektor tragen, kann kein Fusionsprotein ausgemacht werden. Das exprimierte Fusionsprotein aus der Pilotenexpression wurde mit einem Anti-GST-Antikörper durch Western Blot nachgewiesen. Hier konnte das rekombinante Protein im Überstand nachgewiesen werden. Daraufhin wurde es in großen Maßstab exprimiert und über Glutathion-Affinitätschromatographie aufgereinigt.



Abb.3.12

Analytischer Restriktionsverdau des Expressionskonstrukts pGEX-4-T1/MP. Das Plasmid wurde mit den Enzymen *SmaI* und *XhoI* verdaut, die den offenen Leserahmen (untere Bande) aus dem Expressionvektor (obere Bande) restringieren.

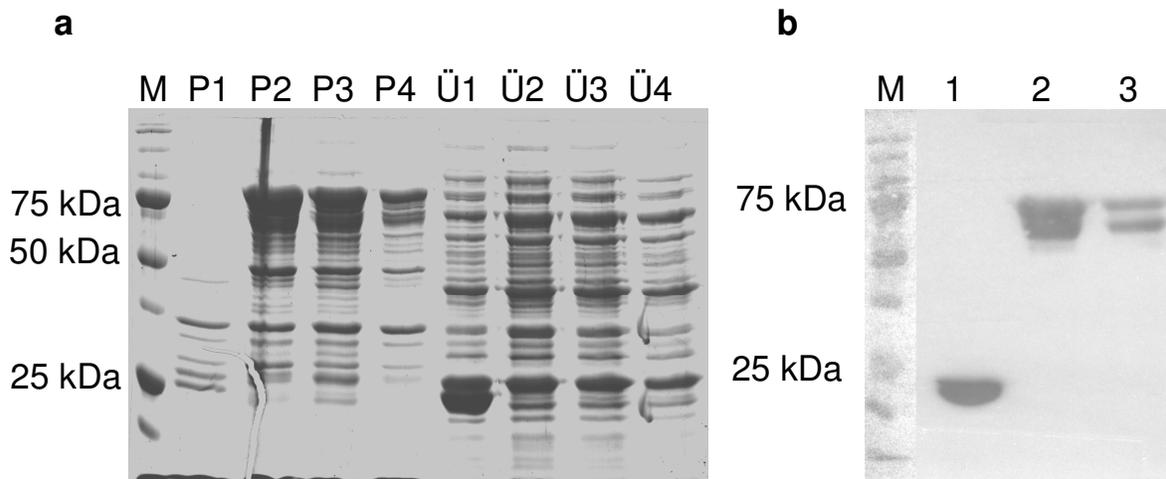


Abb.3.13

Expression mit dem GST-Fusionsprotein. M: Marker; a: Pilotexpression. Es sind jeweils Pellet (d.h. Einschlusskörperchen, P) und Überstand (Lysat ohne Einschlusskörperchen, Ü) von vier Klonen dargestellt, Klon 1 wurde mit dem Leervektor pGEX-4-T1 transformiert. Man erkennt kaum Proteine im Pellet, während im Überstand bei 25 kDa (Molekulargewicht der Glutathion S-Transferase) eine starke Bande zu sehen ist, die nicht in den Klonen 2–4 zu sehen ist. Im Pellet sieht man dagegen bei Klon 2–4 eine deutliche Bande bei ca. 75 kDa, die dem GST-Astacin-Fusionsprotein entspricht. b: Western Blot-Analyse der Pilotexpression. Spur 1 zeigt den Überstand des Klons, der mit dem Leervektor transformiert worden ist, Spur zwei und drei die Überstände zweier Expressionsklone. Es wurde ein Anti-GST-Antikörper aus der Maus eingesetzt, der von einem Ziege-anti-Maus Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, detektiert wurde.

### 3.1.6.3 Expression mit dem Maltose-Bindenden-Protein (MBP)

Das Expressionssystem mit dem Maltose-Bindenden-Protein bietet zwei mögliche Arten der Expression. Der Vektor pMALp2x enthält die kodierende Sequenz für ein Signalpeptid, das das rekombinante Fusionsprotein ins Periplasma der exprimierenden Zelle entlässt. Das ist ein Vorteil bei der Reinigung des Proteins, da die Zellen nicht aufgeschlossen werden müssen. Der Vektor pMALc2x vermittelt eine rekombinante Expression im Zytoplasma der Zelle. Der offene Leserahmen des Onchoastacins ohne die kodierende Sequenz für das Signalpeptid wurde zunächst mit Primern, die passende Schnittstellen enthielten, amplifiziert und nach Aufreinigung mit Hilfe der Restriktionsenzyme Xba I (5´) und Pst I (3´) in beide Expressionsvektoren eingefügt. Die entstandenen Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzanalyse auf die Korrektheit des Leserahmens überprüft. Zur Expression wurden die Plasmide nun in den *E. coli*-Stamm BL21RILCodonPlus transformiert. Mit einer Pilotexpression wurde ermittelt, welche der beiden Expressionsmöglichkeiten effektiver ist. Wie in Abb. 3.14 zu sehen ist, war

die Ausbeute bei der zytoplasmatischen Expression deutlich höher. Bei der zytoplasmatischen Expression zeigte ausschließlich Klon 4 eine ausreichende Expression, die auf dem Coomassie-Gel jedoch nur im Einschlusskörper detektiert werden konnte. Die Expression des Maltose-Bindenden-Proteins allein (Klon 1) findet im löslichen Bereich des Bakteriums statt. Bei der Expression ins Periplasma konnte bei allen drei Klonen eine Bande geringer Intensität im Pellet nachgewiesen werden. Aufgrund der Erfahrungen mit dem GST-Fusionsprotein wurden nun Expressionkulturen der pMALc2x/MP Klone im großen Maßstab gestartet, die von Klon 4 angeimpft wurden. Die Reinigung des Proteins erfolgte über Maltose-Affinitätschromatographie. Diese Expressionsmethode lieferte eine Ausbeute von 0.6 mg/l Kultur. Das gereinigte Protein ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Das Fusionsprotein mbp wurde nun durch enzymatischen Verdau mit dem Faktor Xa von dem rekombinanten Protein abgespalten und anschließend durch erneute Maltose-Affinitätschromatographie entfernt.

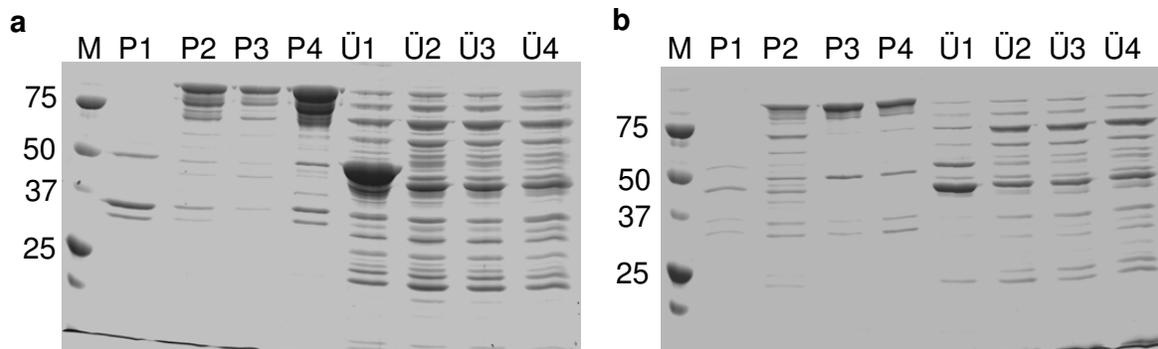


Abb.3.14

Vergleich der Expressionsmethoden des pMAL-Systems. Auftragschema jeweils: 1: Leervektor, 2-4: verschiedene Expressionsklone P: Pellet, Ü: Überstand. Die Expression ist in Klon 4 im Überstand am stärksten, die Bande des Fusionsproteins liegt bei 100 kDa, während das MBP allein bei 40 kDa zu sehen ist (Ü1). a) Pilotexpression mit dem pMALc2x-Vektor, b) Pilotexpression mit dem pMALp2x-Vektor. Die Expression ist in dem zytoplasmatischen System deutlich höher. Die Bande des Fusionsproteins in den Überständen ist unterrepräsentiert.

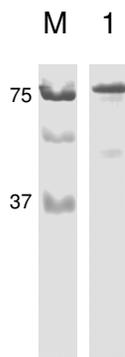


Abb. 3.15

Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE nach Reinigung des Fusionsproteins Onchoastacin- MBP, das ein errechnetes Molekulargewicht von 100 kDa hat.

### 3.1.6.4 Aktivitätstest mit dem prokaryotisch exprimierten Onchoastacin

Wie in Kapitel 3.1.2 aufgeführt, liegt das Onchoastacin als Proenzym vor. Das Prepropeptid ist für die korrekte rekombinante Expression notwendig, muss dann jedoch zur Aktivierung der Protease entfernt werden. Aus anderen Arbeiten war bekannt, dass die Serinprotease Trypsin einen geeigneten Aktivator von Astacinen darstellt (Möhrle *et al.*, 2001). Um die optimalen Bedingungen für die Trypsin-Aktivierung herauszufinden, wurde das Onchoastacin in einer zeitabhängigen Reihe mit Trypsin inkubiert. Das Onchoastacin wurde unterschiedlich lange mit Trypsin inkubiert und die resultierenden Ansätze auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Abb.3.16). Nach einer Minute Inkubationszeit ist die Proform schon vollständig abgebaut, man erkennt noch eine schwache Bande bei 70 kDa, die nach 20 min ebenfalls abgebaut ist.

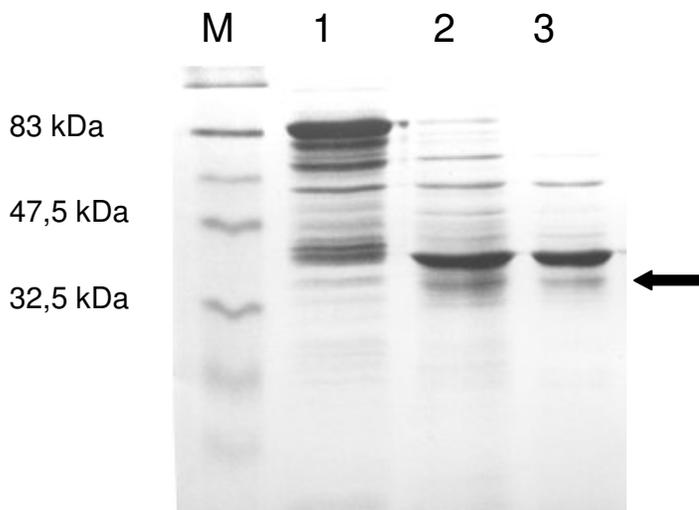


Abb. 3.16

Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Onchoastacin-Aktivierung durch Trypsin. Das Trypsin wurde in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt: 1: Proform; 2: Trypsin-Verdau nach 1 min; 3: Trypsin-Verdau nach 20 min. Die Trypsin-Aktivität wurde durch Ovomucoide gehemmt. Während man in Spur 1 die Proform als prominente Bande bei 83 kDa sieht, so erkennt man in Spur 2 und 3 eine Bande bei 40 kDa, die auf das MBP zurückzuführen ist, sowie eine schwächere Bande unterhalb des MBP, das die aktivierte Form des Onchoastacins darstellt (siehe Pfeil).

Das so aktivierte Onchoastacin wurde in Substratgelelektrophoresen (siehe 3.1.6) eingesetzt. Es konnte in der Substratgelelektrophorese keine Aktivität nachgewiesen werden.

### 3.1.7 Expression im Baculovirus-System

Da mit dem bakteriell gewonnenen Onchoastacin keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde die kodierende Sequenz des Onchoastacins, ausgenommen die des Signalpeptids in den pFastbac-Vektor kloniert, der bereits das Signalpeptid des humanen Meprin  $\beta$  und einen sechsfachen His-Tag enthielt. Dieses Konstrukt wurde in *E. coli* DH10 Bac-Zellen in das Bacmid bMON 14272 transposiert, mit dem anschließend unter Zuhilfenahme von Cellfectin SF9-Zellen zur Herstellung von rekombinanten Virus transfiziert wurden. Die daraus gewonnenen Überstände wurden amplifiziert und schließlich auf High Five-Zellen gegeben, die nun unter Kontrolle des Virus rekombinantes Onchoastacin in den Überstand exprimierten. Die Überstände wurden gepoolt und das Onchoastacin nach Ammoniumsulfatfällung mit Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Ein silbergefärbtes SDS-Gel der Reinigungsfractionen ist in Abb. 3.17 dargestellt.

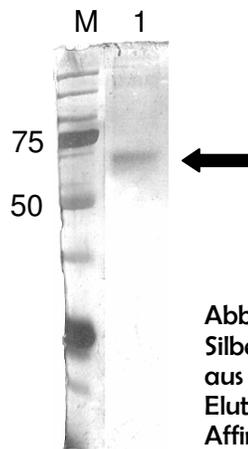


Abb. 3.17  
Silbergefärbte SDS-Page des gereinigten Onchoastacins aus der Baculovirusexpression. Spur 1 zeigt 10  $\mu$ l der ersten Elutionsfraktion des Onchoastacins (Pfeil) von der Nickel-Affinitätsäule bei 60 kDa.

#### 3.1.7.1 Aktivitätsnachweis durch Substratgelelektrophorese

Eine meist angewandte Möglichkeit, die Aktivität von Proteinasen zu untersuchen, ist die Substratgelelektrophorese. Dabei wird ein Substrat, in diesem Fall Gelatine zu dem Trenngel eines SDS-Polyacrylamid-Gels hinzugefügt. Die Protease, die zuvor durch Trypsin in einer Konzentration von 20  $\mu$ g/ml aktiviert wurde, wird unter nativen Bedingungen in dem Gel aufgetrennt und nach Pufferwechsel über Nacht bei 37 °C inkubiert, damit sich die Aktivität der Protease entfalten kann. Anschließend wird das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt.

Der Farbstoff färbt auch die Gelatine, sodass die Aktivität der Proteinasen durch Lysehöfe sichtbar gemacht wird, wo die Gelatine durch proteolytische Aktivität degradiert worden ist. In Abbildung 3.18 sieht man zwei Gelatine-Gele, Gel a zeigt Collagenase A-Aktivität und Onchoastacin-Aktivität bei 80 kDa, was dem doppelten Molekulargewicht des aktivierten Proteins entspricht, daher ist von einer Dimerisierung auszugehen. Gel B wurde mit dem Metallproteinase-Inhibitor Phenanthrolin behandelt, der die Aktivität sowohl von Onchoastacin, als auch von der Collagenase vollständig inhibiert. Das in der Probe enthaltene Trypsin behält dagegen seine Aktivität.

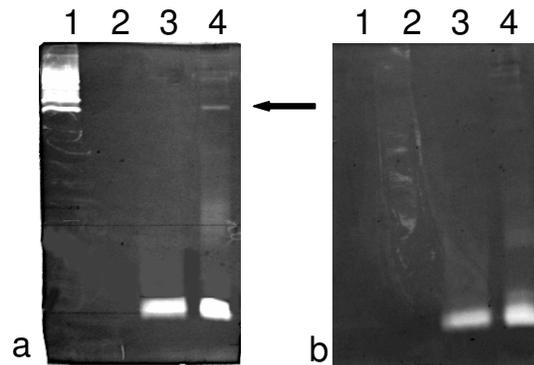


Abb.3.18

Coomassie gefärbtes Gelatine-Substratgel. Abb. a) zeigt ein Gel, das ohne Inhibitor inkubiert wurde, während das Gel auf Abb. b) mit 20 mM Phenanthrolin behandelt wurde. Die Beladung der beiden Gele ist identisch: Spur 1: 1 µg Collagenase A (aus *Clostridium histolyticum*); 2: frei; 3: 400 ng Trypsin; 4: 1 µg mit 400 ng aktiviertes Onchoastacin. Die Aktivität des Onchoastacins liegt bei 80 kDa (siehe Pfeil), was auf Oligomerisierung zurückzuführen ist und wird durch Phenanthrolin vollständig gehemmt. Auch die Collagenase-Aktivität wird durch Phenanthrolin vollständig gehemmt. Die Trypsin-Aktivität ist in beiden Gelen konstant.

### 3.1.7.2 Aktivitätsnachweis durch Substratverdau

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurde das Onchoastacin in Degradationsexperimenten eingesetzt. Dazu wurde die Protease über Nacht mit unterschiedlichen Inhibitoren mit Fibronektin inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Das Gel ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Das Fibronektin wird vom Onchoastacin in die charakteristischen Abbaubanden bei 25 und 45 kDa gespalten (Spur 2), während es nach Trypsininkubation nahezu unverdaut bleibt. Collagenase spaltet Fibronektin ebenfalls und wird durch Zugabe von 20 mM Phenanthrolin nicht vollständig gehemmt (Spur 5 + 6).

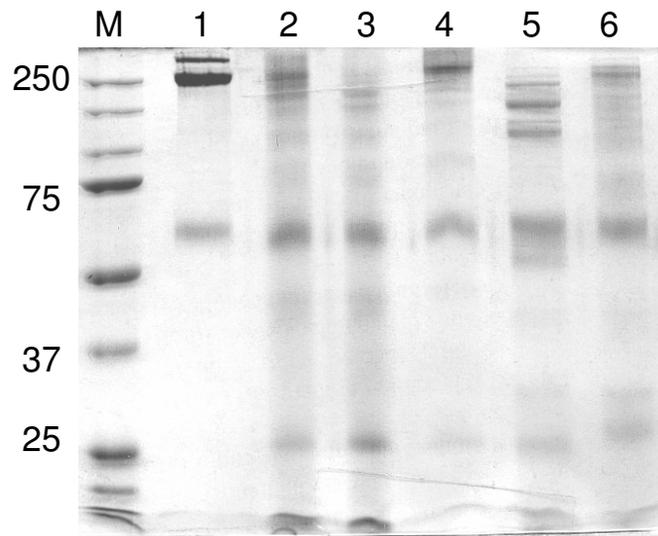


Abb. 3.19

Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Fibronektin Spaltung. Spur 1: 5 µg Fibronektin (FN); 2: FN + 6 µg rekombinantes, trypsinisiertes (20 µg/ml) Onchoastacin; 3: FN + 9 µg rek. Onchoastacin; 4: FN + Trypsin (20 µg/ml); 5: Collagenase 1 µg; 6: Collagenase + Phenantrolin (20 mM). Das Fibronektin wird dosisabhängig vom Onchoastacin gespalten. Es treten die charakteristischen Abbauprodukte bei 25 und 45 kDa auf. Nach Inkubation mit Trypsin bleibt das Fibronektin nahezu unverdaut. Die Bande bei 60 kDa scheint ein Degradationsprodukt zu sein, das nicht durch proteolytische Aktivität entstanden ist, da es bereits in der unverdauten Probe (Spur 1) vorhanden ist.

### 3.1.8 Immunologische Nachweise des Onchoastacins

#### 3.1.8.1 Herstellung eines Antikörpers

Zum Nachweis des rekombinanten Enzyms und für immunhistologische Versuche wurden Antikörper in Kaninchen generiert. Als Epitope für die Immunisierung dienten zwei synthetische Oligopeptide (siehe II.2.6.1). Sie umfassen jeweils 16 Aminosäuren. Das erste Peptid ist am N-Terminus der Astacindomäne positioniert, während das zweite Oligopeptid in der EGF-Domäne des Proteins liegt. Es wurden zwei Kaninchen mit jeweils vier Injektionen immunisiert und die Seren sowohl im Western Blot als auch im ELISA getestet (Abb. 3.20). Im ELISA konnte festgestellt werden, dass beide Kaninchen einen deutlichen Unterschied in der Extinktion der Präimmunseren im Vergleich zu den Immunseren aufweisen. Während die Präimmunseren keine Reaktion auf die Onchoastacin-Peptide zeigten, reagierten die Immunseren beider Kaninchen stark positiv.

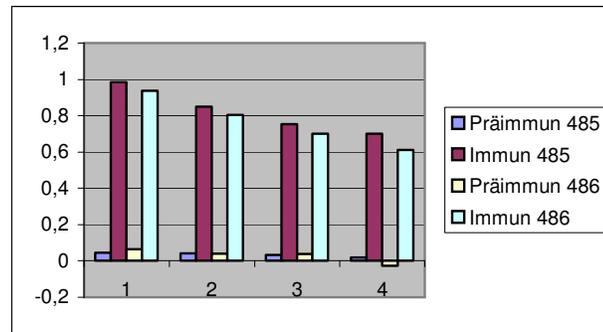


Abb 3.20

Reaktion der Kaninchenseren im ELISA. Als Antigen wurde ein Pool der beiden Onchoastacin-Peptide verwendet, mit denen die Kaninchen 485 und 486 immunisiert worden waren. Dargestellt ist die Extinktion der einzelnen Seren bei verschiedenen Verdünnungen (1 1:1500; 2 1:2000; 3 1:2500; 4 1:3000).

### 3.1.8.2 Antikörper in Patientenseren gegen rekombinantes Onchoastacin und Onchoastacin-Peptide

Um festzustellen, ob Onchoastacin im Menschen immunogene Eigenschaften hat, wurde das rekombinante Enzym im Western Blot mit Patientenseren getestet. Dazu wurden 5 µg rekombinantes Onchoastacin aus prokaryotischer Expression pro Spur eingesetzt und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Überführung des Proteins auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Spuren vereinzelt und mit verschiedenen Serumproben von *O. volvulus*-Patienten getestet. Drei Seren reagierten mit dem Onchoastacin (Bande bei 60 kDa) und dessen Degradationsprodukten. Als Negativkontrolle wurden Serumproben nicht endemischer, nicht infizierter Personen verwendet. Diese Seren reagierten nicht mit dem rekombinanten Protein. Als Positivkontrolle des Western Blots wurde *O. volvulus*-Gesamtextrakt aufgetragen, der mit Patientenseren getestet wurde. Hier reagierten eine Vielzahl der Parasitenproteine. Der Western Blot ist in Abb. 3.21 dargestellt.

Des Weiteren wurden die Peptide, mit denen die polyklonalen Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt worden waren, auf ihre Immunogenität überprüft. Dazu wurden die Peptide gepoolt und in ELISA-Experimenten eingesetzt. Es wurden 32 Seren von Patienten mit generalisierter Onchozerkose mit unterschiedlichen Mikrofilarienlasten, sowie 16 Seren von Patienten mit einer hyperreaktiven Form der Onchozerkose, sowie 12 Seren von gesunden Europäern getestet. Die Seren von Patienten mit Onchozerkose zeigten eine deutlich höhere Reaktivität mit den Onchoastacin-Peptiden als die europäischen Kontrollseren (s. Abb. 3.22). Keine signifikanten Unterschiede fanden sich zwischen Seren von Patienten mit generalisierter und hyperreaktiver Form sowie zwischen niedriger und hoher Mikrofilariendichte.

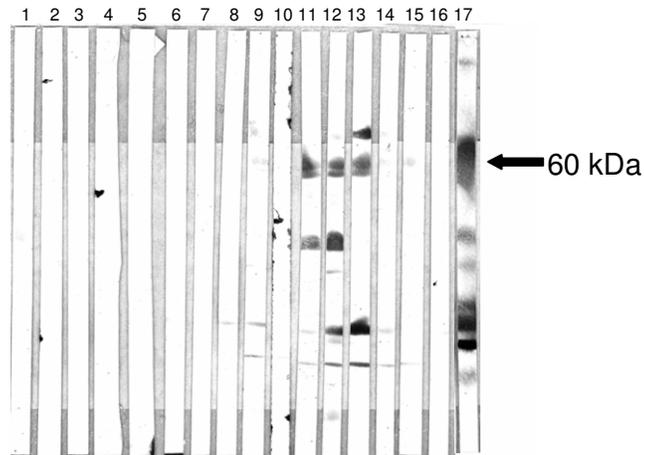


Abb. 3.21

Beispiel einer Western Blot-Analyse der Antikörperantwort von Onchozerkose-Patienten. Als Antigen wurde bakteriell exprimiertes Onchoastacin (Spur 1-16) aufgetragen. Die Spuren 1-10 sind mit Normalseren inkubiert worden, Spuren 11-17 mit Patientenseren. Spur 17 enthält *O. volvulus*-Gesamtextrakt. Es wurden 5 µg Protein pro Spur aufgetragen. In den Spuren 11 bis 13 sieht man bei 60 kDa, der Größe des Onchoastacins entsprechend, eine Bande. Die niedermolekularen Banden auf diesen Spuren sind auf Degradationsprodukte des Onchoastacins zurückzuführen.

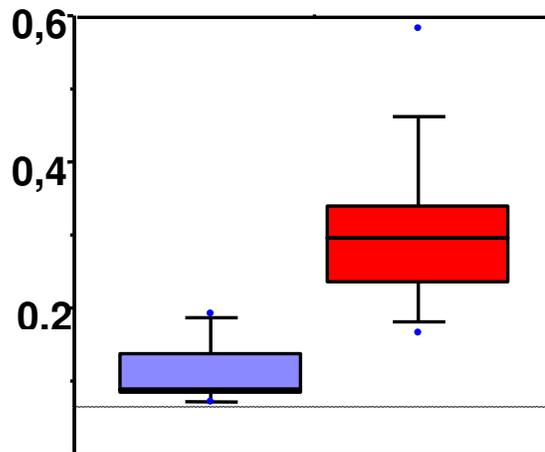


Abb. 3.22

Beispiel eines ELISA-Versuchs zur Erkennung der gepoolten Onchoastacin-Peptide durch Seren (18) von Onchozerkose-Patienten. Da sich die Seren der unterschiedlichen Formen der Onchozerkose (hohe Mikrofilariendichte  $n = 6$ , niedrige Mikrofilariendichte  $n = 6$ , hyperreaktive Form  $n = 6$ ) nicht signifikant unterschieden, wurden sie in einer Gruppe berechnet. Es werden Box Plots mit 10 % und 90 % Quantilen gezeigt. Der rote Box Plot stellt die Reaktivität von Patienten mit Onchozerkose dar. Der blaue Box Plot zeigt die Reaktionsspanne der Kontrollseren (6). Der Unterschied von Patientenseren und Kontrollseren ist signifikant ( $P < 0,001$ ).

### 3.1.8.3 Immunhistologie

Um das Onchoastacin immunologisch im Gewebe von *O. volvulus* nachzuweisen, wurden verschiedene Antikörper verwendet. Ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das rekombinante Astacin aus dem Flusskrebs *A. astacus* wurde freundlicherweise von Dr. Christoph Becker-Pauly (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Das rekombinante Onchoastacin aus der Baculovirusexpression konnte im Western Blot mit dem *Astacus*-Antikörper nachgewiesen werden. Mit diesem Antikörper wurden Gewebsschnitte von Haut und Onchozerkomen gefärbt (siehe Abb. 3.23). Der Anti-Astacin-Antikörper färbt reife, im Wirtsgewebe (Onchozerkom) wandernde Mikrofilarien. In Sektionen, in denen adulte Weibchen im Knoten angeschnitten sind, ist deutlich zu erkennen, dass der Antikörper die außen, also im Wirtsgewebe liegenden Mikrofilarien färbt, während die unreifen Mikrofilarien im Uterus des Weibchens keine Färbung aufweisen, oder nur sehr schwach angefärbt sind. Die Annahme, dass dieses Astacin vor allem in migrierenden Mikrofilarien exprimiert wird, wird mit diesem Befund weiter unterstützt. In einigen Fällen reagierte auch die Hypodermis adulter Weibchen mit dem Antikörper gegen Astacin. Wirtszellen wurden in der Regel nicht positiv angefärbt.

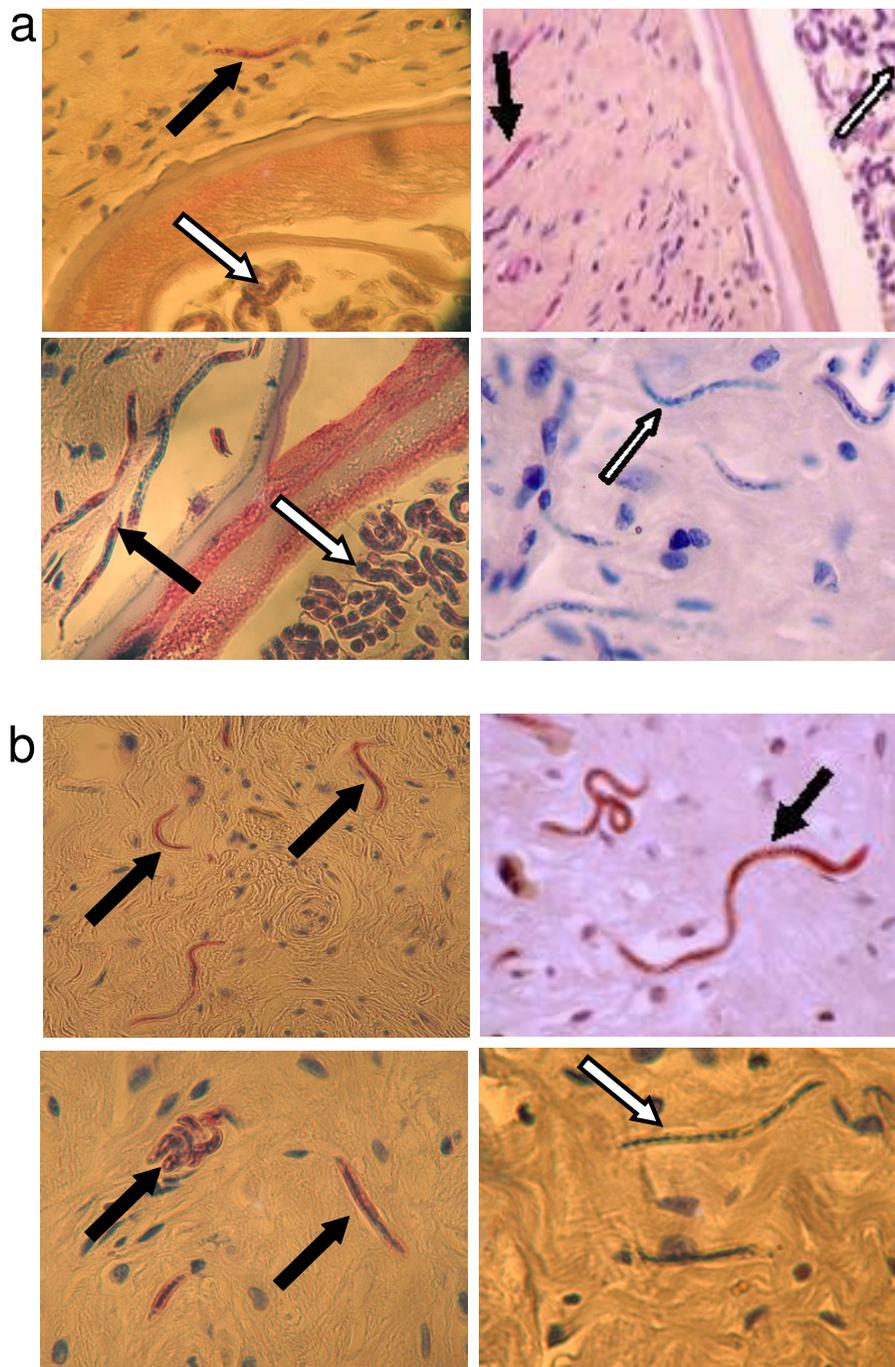


Abb. 3.23

Reaktion von Antikörpern gegen *A. astacus* Astacin mit *O. volvulus* Mikrofilarien. Positive APAAP-Färbung vor allem mit extrauterinen Mikrofilarien im Vergleich zu Mikrofilarien im Uterus. Positive Reaktion ist auch in der Hypodermis des Weibchens nachweisbar.

a) Onchozerkomschnitte mit Weibchen und extrauterinen Mikrofilarien. Rechts unten ist ein ungefärbter Schnitt zu sehen. b) Sektionen durch Onchozerkome mit extrauterinen Mikrofilarien. Rechts unten ist ein Schnitt zu sehen, der mit Serum inkubiert wurde, das zuvor mit rekombinantem Onchoastacin absorbiert wurde. Die schwarzen Pfeile zeigen gefärbte Mikrofilarien, weiße Pfeile dagegen ungefärbte.

## 3.2 Identifizierung des Onchoastacin-Orthologs aus *Strongyloides ratti*

### 3.2.1 Gewinnung der Nukleotidsequenz und bioinformatische Analyse

Da *O. volvulus* nicht zu kultivieren ist, bleibt das Problem der Material-Knappheit stets präsent. Daher erscheint die Suche nach einem geeigneten Modellorganismus sinnvoll. Die Nematoden der Gattung *Strongyloides* sind intestinale Parasiten, die sich ohne Vektor verbreiten und sich sowohl asexuell parasitär durch Parthenogenese fortpflanzen können, als auch über einen heterogonen freilebenden Generationswechsel. Diese Besonderheit des flexiblen Lebenszyklus macht sie besonders interessant. Für die Art *S. ratti* stellt die Ratte den natürlichen Wirt dar. Damit ist sie hervorragend geeignet, um die Fähigkeit des Organismus, durch das Wirtsgewebe zu migrieren, zu untersuchen. Die Rolle der gewebsspaltenden Proteinase lässt sich gut im *Strongyloides*-Modell untersuchen, da infektiöse Larven ebenso wie andere Stadien einfach und in großer Zahl gewonnen werden können und der gesamte Lebenszyklus in wenigen Tagen abgeschlossen ist.

Die Nukleotidsequenz eines Astacins aus *S. stercoralis* ist bereits durch die Arbeit von Gomez Gallego *et al.* (2005) bekannt. Diese Sequenz wurde als Grundlage gewählt, um Oligonukleotide zu entwickeln. Zur Gewinnung der RNA wurden 30.000 Larven des dritten Stadiums mit der Baermann-Technik gewonnen und mit Trizol aufgeschlossen. Die RNA wurde mit Oligo-dT-Primern unspezifisch umgeschrieben und anschließend als Template für eine RT-PCR mit den *S. stercoralis*-Oligonukleotiden verwendet. Auf diesem Wege konnte die Vollständigsequenz des offenen Leserahmens sukzessiv gewonnen werden. Die Sequenz des offenen Leserahmens umfasst 1161 Basenpaare, das Genprodukt ist 386 Aminosäuren (s. Abb.3.25) lang und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 44 kDa. Der Astacin-typische Aufbau der Domänen Signalpeptid, Propeptid, katalytische Domäne, EGF-ähnliche Domäne und CUB-Domäne konnte auch hier wiedergefunden werden. Bei *S. ratti* sind das Signalpeptid (19 AS) und das Propeptid (20 AS) deutlich kürzer als beim Onchoastacin, die Domänen des reifen Enzyms dagegen sind nahezu gleichlang. Nach einer BLAST-Analyse ergaben sich Ähnlichkeiten zu anderen Astacin-artigen Metallproteinase wie der von *S. stercoralis* (59% Identität), und einer 37 % Identität zu dem NAS 34 aus *C. elegans*. Das Astacin aus *S. ratti* hat eine Identität von 33 % zu dem Onchoastacin. Die Aminosäuresequenz ist in Abb. 3.25 dargestellt. Ein Alignment der Astacine von *S. ratti*, *S. stercoralis* und *O. volvulus* auf Aminosäuresequenz ist in Abbildung 3. 24 dargestellt.

<i>S. ratti</i>	1	-----MNF	I	F	T	I	L	L	L	T	I	S	F	N	I	L	G	N	N	Q	I	E	N	K	I
<i>S. stercoralis</i>	1	-----	F	T	V	F	L	S	L	S	I	C	M	I	L	G	D	I	N	S	N	R	N	--	
<i>O. volvulus</i>	1	MALLKSFCSNIFSNF	I	S	T	A	T	G	I	R	N	L	A	L	I	I	S	N	D	Y	W	L	I	F	V
consensus	1		i	f	t	i	l	l	l	t	i	s	i	i	l	g	n	n	e	n	i				
<i>S. ratti</i>	29	N-----																							
<i>S. stercoralis</i>	23	-----																							
<i>O. volvulus</i>	61	SSTS	F	H	D	E	K	R	I	E	S	R	I	T	A	T	Q	R	I	I	R	E	K	A	K
consensus	61		s	t	s	f	h	d	e	k	r	i	e	s	r	i	t	a	t	q	r	i	i	r	e
<i>S. ratti</i>	30	-----																							
<i>S. stercoralis</i>	23	-----																							
<i>O. volvulus</i>	121	QRYTAKRSTAVGTEIAK	F	E	R	R	Q	K	D	N	I	V	L	N	P	E	N	G	R	Y	E	G	D	I	V
consensus	121		q	r	y	t	a	k	r	s	t	a	v	g	t	e	i	a	k	f	e	r	r	q	k
<i>S. ratti</i>	38	R	V	K	K	S	I	Y	S	N	V	P	Y	K	W	S	--	F	P	I	D	Y	K	I	D
<i>S. stercoralis</i>	30	R	V	K	K	S	V	T	K	N	L	P	L	K	W	S	--	F	P	I	D	Y	Y	V	E
<i>O. volvulus</i>	181	R	I	K	R	K	F	I	R	S	E	L	R	R	W	D	S	H	K	P	I	V	S	F	D
consensus	181	R	v	k	k	s	i	y	s	n	v	p	y	k	w	s		f	p	i	d	y	k	i	d
<i>S. ratti</i>	92	G	G	L	L	Y	K	L	S	T	G	C	R	S	V	G	K	I	S	N	S	K	P	Q	E
<i>S. stercoralis</i>	84	G	G	I	V	R	P	G	N	R	C	V	S	F	I	G	K	I	S	K	I	N	P	Q	E
<i>O. volvulus</i>	241	N	R	I	I	F	T	D	I	D	G	C	A	S	N	V	G	R	H	L	G	E	P	Q	F
consensus	241	g	g	i	l	y	k	l	s	t	g	c	r	s	v	g	k	i	s	n	s	k	p	q	e
<i>S. ratti</i>	152	L	T	I	L	F	Q	N	I	H	P	O	V	A	S	N	F	I	M	O	P	P	S	N	S
<i>S. stercoralis</i>	144	L	D	I	L	Y	Q	N	I	H	P	O	V	A	S	N	F	I	M	O	P	P	S	N	S
<i>O. volvulus</i>	301	V	I	V	R	W	E	N	I	D	R	D	S	K	G	O	F	L	K	E	L	P	V	D	V
consensus	301	l	t	i	l	f	q	n	i	h	p	o	v	a	s	n	f	i	m	o	p	p	s	n	
<i>S. ratti</i>	211	T	K	T	E	G	Q	R	S	E	Y	G	F	N	D	A	K	R	L	N	M	H	Y	C	N
<i>S. stercoralis</i>	203	L	K	T	I	G	Q	T	E	Y	G	F	N	D	A	K	R	L	N	M	H	Y	C	N	H
<i>O. volvulus</i>	361	Q	K	T	I	G	Q	R	D	L	S	F	N	D	I	R	L	M	N	V	I	Y	C	S	D
consensus	361	k	t	i	g	q	r	s	e	y	g	f	n	d	a	k	r	l	n	m	h	y	c	n	h
<i>S. ratti</i>	271	V	R	E	S	D	--	K	S	C	G	-----	N	V	K	Y	A	T	D	K	D	K	F	E	
<i>S. stercoralis</i>	263	V	R	P	S	H	--	R	S	C	G	-----	I	T	K	Y	A	T	N	N	Y	K	F	I	
<i>O. volvulus</i>	421	V	M	F	G	F	G	A	D	C	G	G	R	I	E	L	T	S	S	W	R	R	I	T	
consensus	421	v	k	p	s	h		k	s	c	g		n	v	k	y	a	t	d	k	d	k	f	e	
<i>S. ratti</i>	324	D	O	F	V	C	Q	P	G	S	G	--	L	E	I	K	Y	L	A	D	K	V	S	G	
<i>S. stercoralis</i>	315	D	S	F	V	C	Q	P	G	S	G	--	L	E	I	K	Y	L	A	D	K	A	V	S	
<i>O. volvulus</i>	481	C	K	V	R	H	S	L	C	M	D	Y	L	E	I	R	N	S	T	D	F	A	N	I	
consensus	481	d	o	f	v	c	q	p	g	s	g		l	e	i	k	y	l	a	d	k	a	v	s	
<i>S. ratti</i>	369	Y	V	G	K	T	P	F	D	K	I														
<i>S. stercoralis</i>	360	Y	V	G	K	S	F	S	D	S	L														
<i>O. volvulus</i>	541	Q	V	R	A	L	P	I	S	A	L														
consensus	541	y	v	g	k	t	p	f	d	k	i														

Abb.3.24

Sequenzvergleich der Astacine aus *O. volvulus*, *S. ratti* und *S. stercoralis*. Die konservierten Motive der Astacin-Domäne, das Zink-Bindungsmotiv und der Met-Turn sind mit Boxen markiert. Die Ähnlichkeit von *O. volvulus* zu *S. ratti* beträgt 33 %, die Identitäten zwischen den beiden *Strongyloides*-Astacinen beträgt 59 %.

MNFIFTILLLLTISFNIILGNNNQIENKINVNLESJETRVKKSIIYSNVPIKWSFPIDYKID	60
TGVNETTVKKALEILEKETCIRFRKTNFTNGGLLYKLSTGCRSYVVGKISNSKPQEVYLG	120
DTCDYFTAAIHETSHALGVDHEMCRHDRN NYLTILFQNIHPQVASFIMQPPSNLSLYNT	180
KYDYG SVMHYDRFAGSFNNQFAMPLPRYSSTKTFGQRSEYGFNDAKRLNMHYCNHICPKK	240
LKCVNGGYTDPNNCKICKCPRFFTGVLCLKVKESDKSCGNVKYLATDKDKFTEAKGKKS	300
YFOIKAPPGFRIKLSIVNLLSIPDQFVCQPGSGLEIKYLADKTVSGALFCGRDLIKELNS	360
EHTVIMRYVVGKTPFDKIKIKYRRIK	386

Abb.3.25:

Aminosäuresequenz des Astacins von *S. rattii*. Die Sequenzen der Domänen sind farbig unterlegt. Pink = Signalpaptid; Grau = Propeptid; Rot = Katalytische Domäne mit Gelb eingefärbten Bereichen der Konsensusmotive der Zinkbindedomäne der Astacinfamilie und des Met-Turns; Grün = EGF-ähnliche Domäne; Blau = CUB-Domäne.

### 3.2.2 Differenzielle Genexpression in verschiedenen Entwicklungsstadien

Im Unterschied zu *O. volvulus*, bei dem keine frische RNA von infektiösen Larven zur Verfügung stand, konnten bei *S. rattii* Transkriptionsanalysen vorgenommen werden. Zur Analyse des Expressionsmuster des Astacins von *S. rattii* wurde aus 150.000 infektiösen dritten Larven, die mit der Baermann-Technik (siehe 2.2.4) gewonnen wurden, und 200 parasitären Weibchen aus dem Intestinum RNA gewonnen und diese jeweils unspezifisch mit Oligo-dT-Primern umgeschrieben. Die so gewonnene cDNA wurde mittels PCR analysiert. Dazu wurden zum einen ein 980 bp großes Fragment des *S. rattii*-Astacins amplifiziert, zum anderen ein 500 bp großes Fragment der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) von *S. rattii*, ein Haushaltsgen aus dem Glykolyse-Kreislauf, das konstitutiv exprimiert wird. Im Unterschied zur GAPDH konnte Astacin nur in der cDNA der L3-Stadien nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.26).

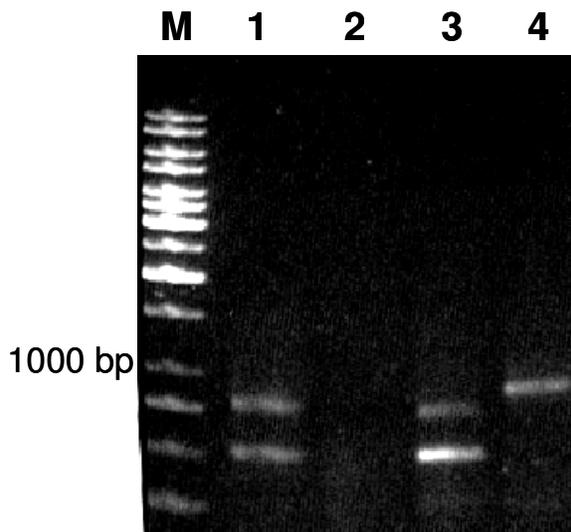


Abb. 3.26

Differenzielle Genexpression des Astacins bei *S. rattii*. Spur 1+2 zeigen die PCR-Produkte aus der Weibchen-cDNA, Spur 3+4 die Produkte aus der L3 cDNA. In Spur 1+3 wurden GAPDH-Primer verwendet, in Spur 2+4 Astacin-Primer. Nur die L3 produzieren Astacin (Spur 4).

### 3.3 Versuche zur Identifizierung einer Serinproteinase aus *O. volvulus*

Neben der Metallproteinase sollte auch eine Serinproteinase von *O. volvulus* identifiziert werden, da beide Proteinase in E/S-Produkten migrierender Stadien nachgewiesen werden konnten (Haffner *et al.*, 1998). Um die Nukleotidsequenz der Serinproteinase aufzudecken, wurden zunächst degenerierte Primer entwickelt, die von der Konsensussequenz GDSGGP abgeleitet wurden. Diese Sequenz umfasst das katalytisch wichtige Serin und ist bei allen Serinproteinasen stark konserviert. Trotz umfassender PCR-Versuche mit unterschiedlichen cDNA-Banken, die als Template dienten, konnte kein spezifisches PCR-Produkt generiert werden. Des Weiteren wurden Oligonukleotide eingesetzt, die spezifisch für eine Serinproteinase aus dem bakteriellen Endosymbionten von *O. volvulus* *Wolbachia* spec. sind. Auch hier konnte kein PCR-Produkt gewonnen werden.

Der zweite Ansatz, eine Serinproteinase-Sequenz zu identifizieren, bestand in einem Immunoscreening von Expressions-cDNA-Banken (Lambda Uni-ZAP XR, cDNA von *O. volvulus* L3) mit polyklonalen Antikörpern gegen eine Serinproteinase aus *Wolbachia pipientes* von *O. volvulus*. *W. pipientes* ist ein Endobakterium, das symbiotisch im Organismus von *O. volvulus*, anderen Filarien und vielen Arthropoden vorkommt. Histologische Untersuchungen sprachen dafür, dass die gegen die *Wolbachia*-Serinproteinase gerichteten polyklonalen Antikörper möglicherweise mit einem homologen Protein von *O. volvulus* kreuzreagieren (Jolodar *et al.*, 2004). Im Western Blot mit *O. volvulus*-Gesamtextrakt als Antigen wurde weiterhin eine Bande bei 50 kDa nachgewiesen (s. Abb. 3.27) Bei dem Screening der *O.v.L3* cDNA-Bank wurden 800.000 *plaque forming units* (pfu) untersucht, jedoch ohne Reaktion mit dem Antikörper.

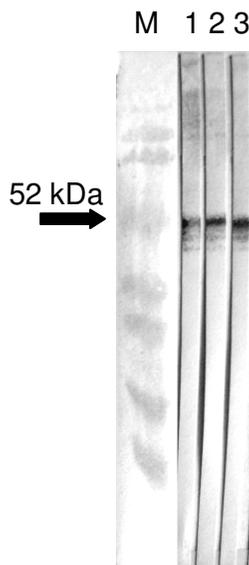


Abb.3.27:

Western Blot zum Nachweis einer Serinproteinase im *O. volvulus*-Gesamt-Extrakt mit polyklonalen Antikörpern gegen eine *Wolbachia*-Serinproteinase.

Die 52 kDa-Bande des „prestained“-Markers (M) ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. Es wurden pro Spur 2 µg *O. volvulus*-Gesamtextrakt aufgetragen. Es wurde Serum in den Verdünnungen von 1:20 (Spur 1), 1:60 (Spur 2) und 1:80 (Spur 3) verwendet. Alle Verdünnungen zeigen eine deutliche Bande bei 50 kDa.

Da diese Versuche zu keinem Erfolg führten, wurde eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung eines Elastase-kodierenden Gens von *O. volvulus* gewählt. Der Umweg über die Identifizierung einer homologen Protease aus einem verwandten Organismus wie *B. malayi*, ist bei der Forschung über *O. volvulus* häufig angewendet worden.

### 3.4 Identifizierung eines für eine Serinproteinase kodierenden Gens von *B. malayi*

#### 3.4.1 Durchmustern einer cDNA-Bank zur Findung des Volllängenkons

In der NCBI-Datenbank wurde nach Sequenzen von *B. malayi* gesucht, die Homologien zu bekannten Serinproteinasen aufweisen. Es wurde ähnlich wie für das Onchoastacin ein EST aus einer cDNA-Bank des dritten Larvenstadiums mit Sequenzhomologien zu Serinproteinasen gefunden, das die kodierende Sequenz für das Serinproteinase-Motiv enthält. Darauf basierend wurden Primer entwickelt, mit denen eine Digoxigenin-markierte Sonde amplifiziert wurde. Diese wurde für ein cDNA-Bank-Screening (*B. malayi*-Männchen, Lambda ZAP) eingesetzt, in dem positive Plaques detektiert werden konnten. Die Visualisierung der positiven Plaques ist in Abb. 3.28 dargestellt. Einige dieser Plaques wurden vereinzelt und das in ihnen enthaltene Plasmid mittels des T-Helfer-Phagen extrahiert. Die so gewonnenen Bakterienklone mit dem exzisierten pbluescript-Vektor wurden durch PCR-Analyse untersucht. Dafür wurden die Oligonukleotide M13 und M13reverse verwendet, die stromaufwärts und stromabwärts der multiplen Klonierungsstelle des Vektors binden. Als Template dienten die Bakterienlysate, die direkt in den PCR-Ansatz pipettiert wurden. Die entstandenen Banden sind in Abb. 3.29 dargestellt. Die Größe des längsten gefundenen Klons beträgt ca. 1,4 kb und enthält den vollständigen offenen Leserahmen (816 bp).

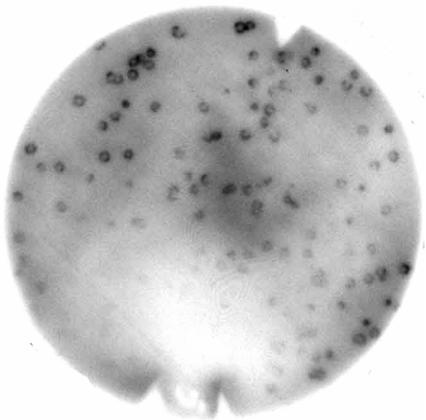


Abb. 3.28

Röntgenfilm nach Chemilumineszenzentwicklung des 3. Phagenscreenings. Die positiven Phagenklone wurden mit einer DIG-markierten Sonde markiert und anschließend durch das Phosphatase-Substrat CSPD sichtbar gemacht.

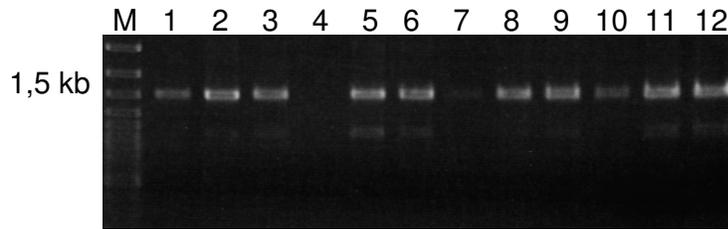


Abb. 3.29

Kolonie-PCR-Nachweis des exzisierten Plasmids aus der Bakteriophagen-DNA. Zur Amplifikation wurden die vektorspezifischen Primer M13 und M13r verwendet. Spur 1-3: Klon 1b; Spur 4-6: 2b; Spur 7-9: 5b; Spur 10-12: 6b. Als Template-DNA dienen die jeweiligen Bakterienkolonien, die direkt in den PCR-Ansatz pipettiert wurden. In allen vier Klonen konnte der Vollängenklon amplifiziert werden. Von Probe 1 und 8 wurden Plasmide isoliert und diese sequenziert.

### 3.4.2 Sequenzanalyse der *B. malayi*-Serinproteinase

Zwei Klone der exzisierten Bluescript-Klone wurden mit Primern aus der mcs sequenziert. Für die so gewonnene Nukleotidsequenz wurde das Translatierungsprogramm ExPASy translate tool (<http://us.expasy.org/tools/dna.html>) verwendet, um die Aminosäuresequenz abzuleiten (272 Aminosäuren, Abbildung 3.21). Das Programm ExPASy Peptide Mass (<http://us.expasy.org/tools/peptide-mass.html>) errechnete ein Molekulargewicht von 30,1 kDa für die Serinproteinase. In einer BLAST-Analyse in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) wurden Homologien zu mehreren Serinproteinasen festgestellt. Die höchste Übereinstimmung lag bei 28 % auf Aminosäureebene zu einer Serinproteinase von *C. elegans*, einem freilebenden Nematoden. Zu einer Serinproteinase des Parasiten *T. spiralis* liegen die Identitäten bei 26%. Das Enzym konnte in die Unterfamilie der Chymotrypsin-artigen Serinproteinasen (S1A) eingeordnet werden. Auffällig war die Tatsache, dass die umgebenden Sequenzen der katalytischen Triade H-D-S von den Konsensussequenzen abweichen, wie in Abb.3.30 dargestellt. Die Konsensussequenz für den umgebenden Bereich des katalytischen Histidins lautet HS, während man bei *B. malayi* HV findet. Das konservierte Motiv um das katalytische Asparagin lautet DIA, bei *B. malayi* findet man DFA. Der Bereich, der das katalytische Serin umgibt, hat die Sequenz GDSGGP, während bei *B. malayi* GDSGGG zu finden ist. Diese Abweichung in dem zentralen katalytischen Motiv stellt eine große Ausnahme dar. Die Serinproteinase von *B. malayi* weicht also in allen drei Motiven der Triade von der allgemeinen Konsensussequenz ab.

Da *B. malayi* der erste parasitäre Nematode ist, dessen Genom vollständig sequenziert worden ist (Ghedini *et al.*, 2004), konnten Vergleiche auf genomischer Ebene zwischen *B. malayi* und *C. elegans* durchgeführt werden (Abb. 3.31). Auf der Homepage

von TIGR (The Institute for Genomic Research <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/bmai/>) wurde nach dem entsprechenden Contig zu der cDNA-Sequenz der Serinproteinase gesucht. Die genomische Sequenz vom Translations-initiiierenden ATG bis zum Stopcodon TGA umfasst 4036 bp. Die kodierende Sequenz teilt sich in sechs Exons auf, die von fünf Introns unterbrochen werden. Von besonderer Bedeutung ist, dass unmittelbar neben dem zentralen katalytischen Motiv ein Intron liegt (siehe rote Pfeile, Abb. 3.31). Die cDNA unterscheidet sich von der genomischen DNA (gDNA) durch neun zusätzliche Nukleotide und 18 Nukleotidaustausche, die zu acht Aminosäureaustauschen führen. Die genomische Sequenz der *C. elegans*-Serinproteinase wurde der Homepage des Sanger Institute entnommen ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_elegans/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/)). Sie ist 1512 Basenpaare lang und teilt sich in vier Exons und drei Introns auf. Die kodierende Sequenz ist 999 bp lang. Die Introns bei *C. elegans* sind also viel kleiner als bei *B. malayi* und die genomische Organisation weist große Unterschiede auf (s. Abb.3.31).

```

MGGENASPGEMPWAVALFHGRIYVCTGLISQKEVVITAAHCFKRIFATKPCNVSFQYYQE 60
ESLKKYTVLYGSNCIQQRNGNLCNNAPEMKLSGIIRAQYGRFFNEKCLMADFALLELEDT 120
IEGPLTNYICLGHRNIKKEDQIRLTGYGWGSVPSSDGEELANNLQLVNFPKTMNRRKCL 180
EISKTEAICAIESGVASTCRGDSGGGLVVLGPTGQWSLLGVLSYGTECKELRRGNPPKA 240
QVYTDISLYAMDIDIFTGYDTVLRHLYLXHLS 272

```

Abb. 3.30:

Aminosäuresequenz der putativen Serinproteinase von *B. malayi*. Die drei konservierten Bereiche umfassen die aktiven Aminosäuren der katalytischen Triade: Histidin 34, Asparaginsäure 111 (Abstand zum H: 73 AS) und Serin 204 (Abstand zum D: 103 AS). Alle drei Motive weichen von den Konsensus-Sequenzen ab, die folgendermaßen lauten: HS, DIA, GDSGGP

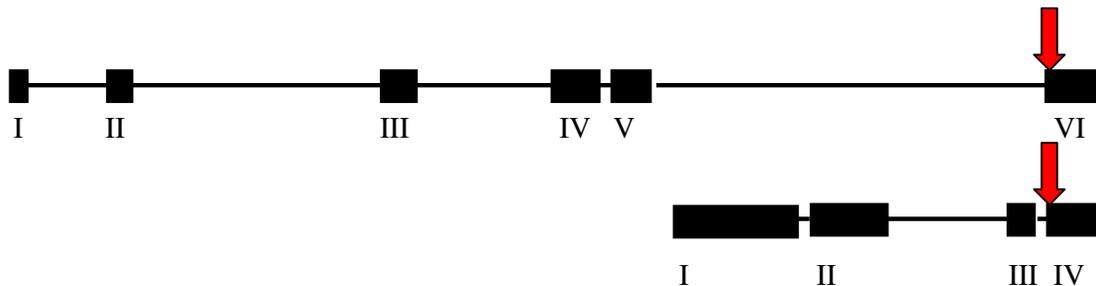


Abb. 3.31:

Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur der Serinproteinasen von *B. malayi* (oben) und *C. elegans* (unten). Die Exons sind als schwarze Rechtecke, die Introns als Linien dargestellt. Die jeweils letzten Exons beginnen mit der kodierenden Sequenz für das Konsensus-Motiv GDSGGP (rote Pfeile).

### 3.4.3 Prokaryotische Expression der Serinproteinase

#### 3.4.3.1 Expression als His-Tag-Fusionsprotein

Für die Klonierung des offenen Leserahmens der *Bm-SP-1* in den Expressionsvektor pJC45 wurden Primer entwickelt, die Schnittstellen (*NdeI* und *EcoRI*) und das Start- bzw. Stopcodon enthalten. Der Vektor enthält einen Histidin-Tag zur Reinigung über die Nickel-Affinitätschromatographie. Nach Überprüfung der korrekten Klonierung über Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurde das Konstrukt in *E. coli*-pABlac-Zellen transformiert und exprimiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte über eine Nickel-Affinitätssäule unter denaturierenden Bedingungen. In Abb. 3.32a ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel abgebildet, das das rekombinante Protein nach Reinigung zeigt. Das gereinigte Protein wurde im Western Blot mit einem Anti-His-Antikörper nachgewiesen. In Abb. 3.32b ist der Western Blot dargestellt. Auf Spur 1 ist ein 16 kDa großes Protein aufgetragen, das als Positivkontrolle fungiert, auf den Spuren 2 und 3 sieht man zwei unterschiedliche Eluate des gereinigten Proteins.

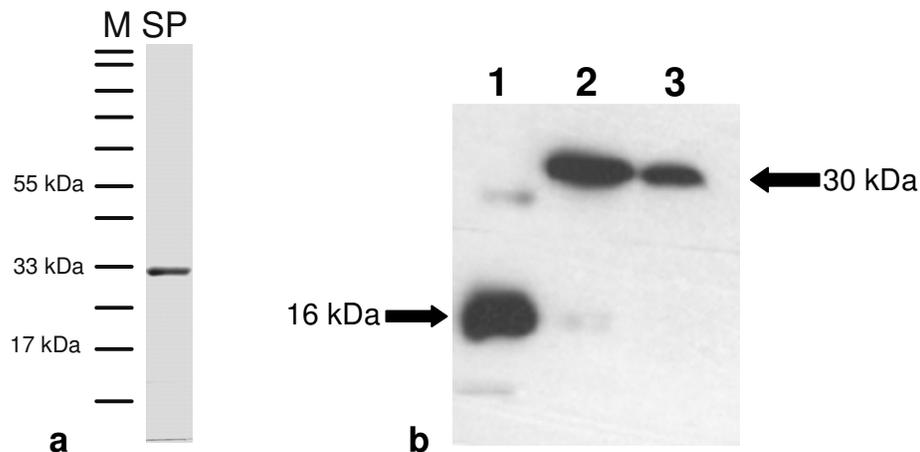


Abb. 3.32

Expression der BmSP mit His-Tag. a: Coomassie-Gel des gereinigten Proteins. b: Western Blot –Nachweis mit Anti-His Antikörper. Spur 1: Positivkontrolle Spur 2 + 3: Unterschiedliche Elutionsfraktionen des gereinigten Proteins.

### 3.4.3.2 Expression mit dem MBP-System

Da die Serinproteinase mit His-Tag nur unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden konnte und damit inaktiv war, wurde die kodierende Sequenz für das Protein außerdem in den pMALc2x-Vektor kloniert. Auf der Abbildung 3.33a sieht man die gelelektrophoretische Analyse des Restriktionsverdaus des Konstruktes pMALc2x/SP mit den Enzymen *Bam*HI und *Pst*I, mit denen die kodierende Sequenz des offenen Leserahmens in den Vektor kloniert wurde (Spur 1). Die Bande bei 6 kb stellt den linearisierten Vektor dar, die Bande bei 800 bp die herausgetrennte Serinproteinase. Auf Spur 2 sieht man dieselbe Analyse mit dem Expressionskonstrukt pMALp2x/SP, das aufgrund des Signalpeptids für das Periplasma 500 bp größer ist. Das Expressionskonstrukt pMALc2x/SP wurde aufgrund besserer Ausbeute für die Expression gewählt und in den *E. coli*-Stamm BL 21 RIL Codon Plus transformiert. Die Expression ergab eine Ausbeute von 1,1 mg gereinigtes Protein pro Liter Bakterienkultur. Auf Abb. 3.33b ist die rekombinante Serinproteinase nach Reinigung dargestellt, die als mbp-Fusionsprotein eine Größe von 70 kDa hat.

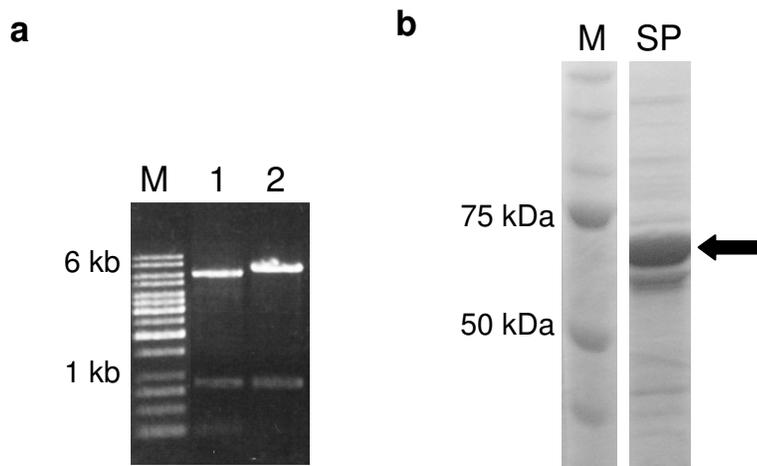


Abb. 3.33

Expression der Serinproteinase als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden-Protein. a: Analytischer Restriktionsverdaus der Expressionsvektoren pMALc2x/SP (Spur 1) und pMALp2x/SP (Spur 2). b: Coomassie-Gel der gereinigten Serinproteinase. Der Pfeil zeigt das MBP-Fusionsprotein bei 70 kDa.

Das gereinigte Fusionsprotein wurde mit Faktor Xa verdaut und das abgetrennte MBP durch Affinitätsreinigung mittels der Maltose-Säulenmatrix entfernt. Die Aktivität der rekombinanten Serinproteinase wurde mittels Substratgelelektrophorese überprüft, es konnte jedoch keine Aktivität nachgewiesen werden.

### 3.4.3.3 Immunologische Nachweise der *B. malayi*-Serinproteinase

Zur histologischen Charakterisierung wurden Antikörper gegen die *B. malayi*-Serinproteinase generiert. Dazu wurden zwei Oligopeptide synthetisiert (siehe 2.2.7.1), die gepoolt wurden und wie im Falle der Metallproteinase viermal zwei Kaninchen injiziert wurden. Die Immunsereen wurden in ELISA-Experimenten auf ihre Reaktivität getestet, in denen die ELISA-Platten mit den gepoolten Peptiden beschichtet und den Immunsereen detektiert worden sind. Die Reaktivität der Kaninchensereen ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Während beim Kaninchen 787 nur nach der Impfung Antikörper gegen die Peptide im Serum nachweisbar waren, zeigte das Kaninchen mit der Nummer 788 bereits im Präimmunserum eine Antwort auf die Peptide. Die Immunantwort von Kaninchen 788 ist also nicht zu bewerten.

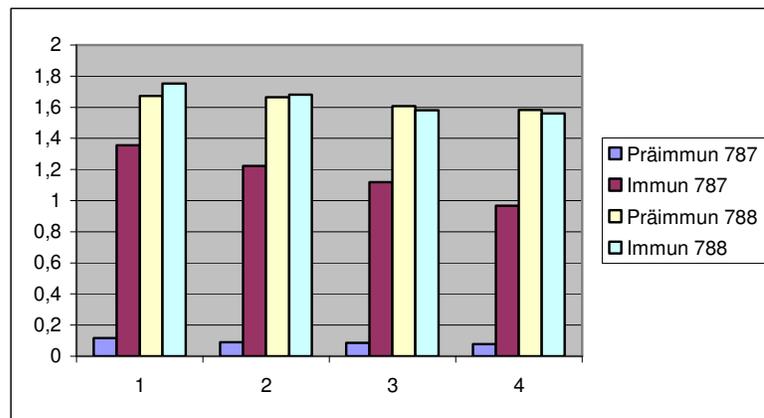


Abb.3.34

Reaktion der Kaninchensereen im ELISA. Als Antigen wurde ein Pool der Serinproteinase-Peptide verwendet, mit denen die Kaninchen 787 und 788 immunisiert worden waren. Dargestellt ist die Extinktion der einzelnen Seren bei verschiedenen Verdünnungen (1: 1:1500; 2 1:2000; 3: 1:2500; 4: 1:3000). Die Seren von Kaninchen 787 unterscheiden sich deutlich voneinander. Die Immunantwort von Kaninchen 788 ist durch die bereits vorhandene Reaktion des Präimmunserums nicht zu deuten.

## 3.5 Durchmustern von *O. volvulus* cDNA-Banken nach der orthologen Serinproteinase

Die in 3.4.1 verwendete Sonde wurde eingesetzt, um eine *O. volvulus*-cDNA-Bank aus Mikrofilarien nach dem Ortholog der *B. malayi*-Serinproteinase durchzumustern. Es wurden 500.000 pfu analysiert, ohne ein positives Signal zu erhalten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Nukleotidsequenz der Orthologe zu unterschiedlich ist, um eine Kreuzreaktivität zu erreichen.

## 4 Diskussion

Die meisten parasitären Nematoden müssen in der Lage sein, durch Wirtsgewebe zu wandern, um ihren Lebenszyklus aufrecht zu erhalten. Eine Erleichterung der Gewebswanderung stellt eine Sekretion von gewebspaltenden Proteinase dar. So wird angenommen, dass die Motilität der in der Haut und der Subkutis des Menschen lebenden Filarie *O. volvulus* durch die Freisetzung von gewebspaltenden Enzymen der beweglichen Stadien ermöglicht wird. Der Parasit benötigt diese Motilität zum einen für das Eindringen der infektiösen Larvenstadien in die Kutis und Subkutis direkt nach der Infektion. Außerdem befähigt sie die Männchen, sich zur Begattung der Weibchen von Knoten zu Knoten fort zu bewegen. Die Mikrofilarien müssen in der Lage sein, sich vom Knoten zur Haut zu bewegen, um dort vom Zwischenwirt aufgenommen zu werden. Außerdem müssen die Mikrofilarien im Überträger die Darmwand der Simulien passieren, um zu den Flugmuskeln zu gelangen (Omar & Garms, 1977). Dort angekommen müssen sie die Zellwand der Muskelzellen durchdringen, um sich intrazellulär zur L3 weiter zu entwickeln. Somit muss *O. volvulus* eine Reihe von Gewebebarrieren überwinden, um seinen Lebenszyklus zu vollenden, für die gewebspaltende Proteinase benötigt werden.

Das Vorhandensein von kollagenolytischer Aktivität in Extrakten von *O. volvulus* und *B. malayi* wurde zuerst von Petralanda *et al.* (1986) nachgewiesen. In einer weiteren Arbeit von 1994 postulierten Petralanda und Piessens die mögliche Rolle von *O. volvulus*-Proteinase beim Abbau von extrazellulären Matrixproteinen und damit der Pathogenese der Dermatitis von Onchozerkose. Da der Parasit nicht kultivierbar ist, sind die Mengen an biologischem Material der verschiedenen Stadien sehr begrenzt und somit auch der Kenntnisstand über die exkretorisch-sekretorischen Produkte der wandernden Stadien. Die 1998 von Haffner *et al.* identifizierte Elastase-Aktivität galt es in dieser Arbeit weiter aufzuklären. Da es für *O. volvulus* kein Genomprojekt gibt, wurde die EST-Datenbank der NCBI-Homepage genutzt, um Sequenzdaten einer putativen Metallproteinase von *O. volvulus* und einer putativen Serinproteinase aus *B. malayi* zu gewinnen.

Des Weiteren wurde ein Ortholog des Onchoastacins aus *S. ratti* entdeckt. Durch die Verfügbarkeit des freilebenden, sowie des parasitären Zyklus, lässt sich das Expressionsmuster der Astacine an *S. ratti* besonders gut studieren.

## 4.1 Onchoastacin

### 4.1.1 Identifizierung

Ausgehend von einem EST von *O. volvulus*, das Homologien zu Metallproteinase aufwies, wurden PCR-Experimente mit cDNA-Banken durchgeführt, aus denen schließlich der Vollängenklon gewonnen werden konnte. Die Metallproteinase konnte nach Analyse der Aminosäuresequenz und Struktur in die Proteinasefamilie der Astacine (Dumermuth *et al.*, 1991) eingeordnet werden. Die Astacin-Protein-Familie umfasst eine divergente Gruppe von Proteinase, die eine Rolle in der Gewebekonstruktion und Entwicklung, der Verdauung und bei Schlüpfvorgängen spielen. Die Astacine (Familie M12A) gehören dem Clan MA an, der alle Metallproteinase umfasst, die das Zinkbindemotiv HExxH aufweisen. Diesem Clan gehören noch zwölf weitere Peptidase-Familien an, die sich unter anderem in dem dritten Zinkliganden unterscheiden. In der Astacin-Familie stellt dieser ein Histidin dar, das in dem erweiterten zinkbindenden Motiv HExxHxxGFxHExxRxDRD zu finden ist. Basierend auf strukturellen Merkmalen lassen sich die Astacine in drei Hauptgruppen einteilen. Meprine sind membrangebundene Enzyme, die im Dünndarm von Säugetieren vorkommen. Die BMP-1/Tolloid-Proteine (engl.: bone morphogenic protein) findet man in Vertebraten und Invertebraten, wie zum Beispiel bei der sehr alten Tiergruppe der Cnidaria. Sie spielen unterschiedliche Rollen in der Gewebeentwicklung. Die dritte Gruppe ist sehr divergent und umfasst Verdauungsenzyme und solche, die an Schlüpfvorgängen bei Nematoden, Fischen, Fröschen und Vögeln beteiligt sind. Astacin-artige Metallproteinase können eine Größe von 20 kDa haben, wie das Astacin aus dem Flusskrebis *A. astacus* und NAS-1 aus *C. elegans* (Möhrlen *et al.*, 2003), es gibt jedoch auch Vertreter mit weitaus höheren Molekulargewichten, die über die katalytische Astacin-Domäne hinaus zum Teil mehrere C-terminale Domänen unterschiedlicher Funktionen aufweisen (Rawlings & Barrett, 1993), wie das menschliche Meprin (Beynon & Bond, 1985) oder DrTlr-1 aus *Drosophila* (Nguyen *et al.*, 1994), das eine Rolle in der Larven- und Puppenentwicklung spielt.

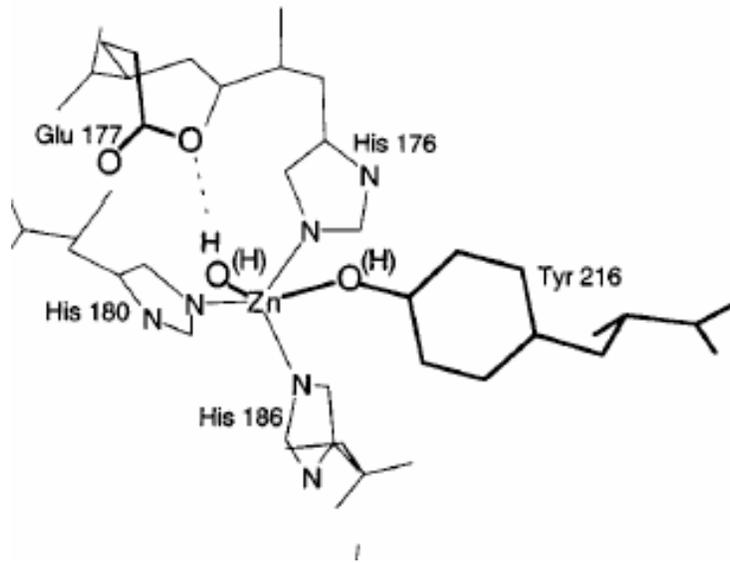


Abb. 4.1

Räumliche Darstellung des Zinkliganden am Beispiel des *A. astacus*-Astacins. Das in der Mitte liegende Zink wird von drei Aminogruppen aus den Imidazolringen der Histidine, einer weiteren Hydroxygruppe vom Tyrosin und eines durch ein Glutamat polarisiertes Wassermolekül aktiviert. (Stöcker *et al.*, 1993)

Die strukturelle Analyse des Onchoastacins ergab die typische Domänenanordnung Signalpeptid, Propeptid, katalytische Domäne (Astacin-Domäne), EGF-Domäne (Davis, 1990) und CUB-Domäne. Die Quartärstruktur wurde mit Hilfe des Swiss Model Servers theoretisch ermittelt. Das Molekül ist nierenförmig mit einem tiefen Spalt, der die N- und die C-terminalen Domänen voneinander trennt. Am Boden dieses Spalts liegt das Zink, das durch die Imidazolgruppen der drei Histidine, sowie die Hydroxylgruppe des Tyrosins aus dem sogenannten Met-Turn und eines durch Glutamat (AS 97) polarisierten Wassers komplexiert wird. Das Zink liegt dabei in der Mitte einer trigonal bipyramidalen Anordnung (siehe Abb. 4.1).

Die Domänenstruktur der Astacin-Familie folgt einem Muster, das in mehreren Proteinase-Familien zu finden ist (Bond & Beynon, 1995). Die Astacin-Domäne ist bei allen Mitgliedern der Familie sehr konserviert und weist Identitäten zwischen 23-99 % auf. Dies wird durch den Vergleich der BLAST-Analysen mit der gesamten Aminosäuresequenz und mit der Sequenz der Astacin-Domäne deutlich. Während die größte Übereinstimmung zwischen dem gesamten Onchoastacin und dem NAS-35 von *C. elegans* bei 71 % Identität liegt, weisen die Astacin-Domänen von *O. volvulus* und *C. briggsae* eine Identität von 81 %

auf. Die Domänen, die eine Übereinstimmung von mindestens 80 % haben, repräsentieren oft Artunterschiede desselben Genprodukts. Das Onchoastacin hat eine Übereinstimmung von 38 % zu dem namensgebenden Enzym aus *A. astacus*. Der Met-Turn (AS 151-155), der den Zink-Liganden Tyrosin enthält, gliedert das Onchoastacin in die Superfamilie der Metzinkine ein, die die Astacine, Adamalysine, Serralysine und Matrixine umfasst (Stöcker *et al.*, 1995).

Das Propeptid der Astacine variiert stark in seiner Größe, zum Beispiel ist das Propeptid beim Astacin von *A. astacus* nur 34 Aminosäuren lang, während das von *Drosophila melanogaster* (*Drosophila tolloid-related-1*) DrTlr-1 519 Aminosäuren aufweist. Das Propeptid spielt eine Rolle in der Regulierung der Aktivität und möglicherweise bei der Expression (Bond & Beynon, 1995). EGF-Domänen binden Kalzium, kommen einzeln oder in mehreren Kopien bei vielen sekretierten Proteinasen vor und stellen ein strukturelles Gerüst für spezifische Protein-Protein-Interaktionen dar (Campbell & Bork, 1993). Die CUB-Domäne kommt meist bei entwicklungspezifisch regulierten Proteinen vor. Hartigan *et al.* zeigten 2003 am Beispiel von BMP-1, dass die CUB-Domäne zur Sekretion des Proteins benötigt wird und eine Rolle bei der Katalyse spielt. CUB-Domänen enthalten konservierte Cysteinreste, die zwei Disulfidbrücken miteinander eingehen.

Die höchste Homologie weist das Onchoastacin zu NAS 35 auf (71 % Identität), einem Astacin aus *C. elegans*, dem eine Rolle in der kutikulären Kollagenreifung zugesprochen wird, das heißt mit Reaktivität an der Nematodenoberfläche (Novelli *et al.*, nicht veröffentlicht). Das ist ein Beispiel für ein Homolog von Onchoastacin, das Kollagen spaltet. Suzuki *et al.* (2004) haben das Gen mittels RNAi ausgeschaltet, konnten jedoch keinen veränderten Phänotyp bei den veränderten Würmern feststellen. Ein auffälliger Unterschied zwischen beiden Proteinen besteht im Fehlen der Thrombospondin-Bindungsstelle beim Onchoastacin. Möglicherweise ist hierin die unterschiedliche Funktion der Enzyme begründet. Da ein neuer Phänotyp bei den NAS-35 Knockout-Mutanten ausgeblieben ist, kann postuliert werden, dass dieses Gen nicht charakteristisch und daher nicht notwendig für die saprophytische Lebensweise ist. Im Gegensatz dazu könnte es aber durch die Spaltung von extrazellulären Matrixproteinen möglicherweise essenziell für die Gewebswanderung von parasitären Nematoden wie *O. volvulus* sein. Die Relevanz des Onchoastacins für den Parasiten ist durch die große Homologie zu NAS-35 von *C. elegans* nicht in Frage gestellt.

In dem freilebenden Nematoden *C. elegans* sind 158 Gene gefunden worden, die für Metallproteinasen kodieren. Davon gehören 40 Gene der Astacin-Familie an (Möhrle *et al.*, 2003), von denen 25 exprimiert werden. Im Menschen wurden bislang zehn Gene, die für Astacine kodieren, gefunden, während in dem molekularbiologischen Modellorganismus *D. melanogaster* bis heute 16 Astacin-artige Metallproteinase entdeckt wurden. Es stellt sich die Frage, wofür ein *C. elegans*, der aus 959 Zellen besteht, so viele Proteinase benötigt. Durch seine saprophytische Lebensweise benötigt *C. elegans* Proteinase für die Verdauung, die schwieriger ist, als bei parasitären Nematoden. Außerdem werden Proteinase, wie bei den Parasiten, für die Häutung benötigt. Es ist davon auszugehen, dass die Astacine eine spezielle Rolle bei Nematoden spielen.

#### 4.1.2 Charakterisierung

Nach Überprüfung der Sequenz wurden Expressionskonstrukte generiert und verschiedene Möglichkeiten der Expression getestet. Es zeigte sich, dass in *E. coli* exprimiertes Fusionsprotein (Histidin- bzw. GST-Tag) aus den Affinitätsreinigungen mittels Nickelagarose oder Glutathion-Sepharose nur in sehr geringen Mengen unter nativen Bedingungen gewonnen werden konnte. Das lässt darauf schließen, dass die Bakterienzellen das rekombinante Protein in Einschlusskörperchen einschlossen. Das ist besonders bei toxischen Proteinen ein häufiges Problem bei deren Überexpression. Das rekombinante Protein liegt dann inkorrekt gefaltet als unlösliches Aggregat vor. Als Maltose-bindendes Fusionsprotein konnte im *E. coli*-System lösliches Protein gewonnen werden, das jedoch Trypsin-labil war.

Das Onchoastacin enthält, ausgenommen vom Signalpeptid, 16 Cysteinreste, die bis zu acht Disulfidbrücken bilden können. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Protein im alkalischen Milieu des Bakteriums korrekt gefaltet wird, ist daher sehr gering. Da jedoch die prokaryotische Expression einen deutlichen zeitlichen und finanziellen Vorteil vor der eukaryotischen Expression hat, wurden hier zunächst alle Möglichkeiten ausgeschöpft, bevor weitere Methoden angewandt wurden.

Wie andere Mitglieder der Astacin-Proteinase-Familie wird Onchoastacin als inaktives Proenzym synthetisiert. Durch Inkubation mit Trypsin wird der N-Terminus nach dem Arginin 184 des Proteins abgespalten und das Enzym durch nachfolgende Konformationsänderung aktiviert (Bode *et al.*, 1992). Bei einer Western Blot-Analyse des

Trypsin-verdauten Onchoastacins mit einem Anti-Astacin-Antikörper konnte das Protein bei 25 kDa nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass die Astacin-Domäne nach Trypsin-Verdau intakt geblieben ist. Trotzdem ließ sich in der Substratgelelektrophorese und anderen Proteinaseassays keine Aktivität nachweisen. Das Onchoastacin weist am Ende des Propeptids eine Furin-Schnittstelle (R-y-xR) auf. Die vor kurzem identifizierte Blisterase von *O. volvulus* (Poole *et al.*, 2003) ist ein Furin und könnte möglicherweise den In-vivo-Aktivator des Onchoastacins darstellen. Das im Baculovirus-System exprimierte Onchoastacin ließ sich jedoch nicht mit der rekombinanten Blisterase aktivieren (Daten nicht gezeigt).

Als weitere Alternative wurde eine Expression in der Hefe *Pichia pastoris* versucht (Daten nicht gezeigt). Nach erfolgreicher Klonierung des Expressionskonstrukts gelang es jedoch nicht, positive Transformanten zu erhalten. Es ist wahrscheinlich, dass die Expression des Onchoastacins lethale Auswirkungen auf die Hefe hatte und dadurch keine positiven Klone selektioniert werden konnten.

Aufgrund dieser Resultate wurde nun zur Baculovirus-Expression übergegangen. Dazu wurde die kodierende Sequenz für das Onchoastacin hinter ein Signalpeptid des humanen Meprin  $\beta$  in den pFastbac-Vektor kloniert (Becker *et al.*, 2003) und dieses Konstrukt nach Transposition in ein Bacmid in der Insektenzelllinie *Sf9* vermehrt. Für die Expression wurden sowohl *Sf9* als auch High Five-Zellen verwendet, es zeigte sich, dass die Ausbeute bei High Five-Zellen deutlich höher war. Trotzdem verbargen sich auch in diesem Expressionssystem einige Schwierigkeiten. Das Baculovirus-System ist zeitaufwendig und kostenintensiv. Die Ausbeute des rekombinanten Proteins war gering und das Protein nach Nickel-Affinitätsreinigung nicht sehr rein. Es wurden verschiedene Imidazol-Konzentrationen im Waschpuffer getestet. Die Konzentration mit 40 mM erwies sich als die Höchste, die verwendet werden konnte, ohne dass sich das rekombinante Protein von der Nickel-Säule löste. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung des Proteins an die Affinitätsäule schwach ist und damit Schwierigkeiten entstehen, reines Protein zu erhalten.

Wenn das rekombinante Protein zur Aktivierung mit Trypsin inkubiert wurde, zeigte sich, dass ebenfalls viele der Verunreinigungen in der Lösung von dem Trypsin gespalten wurden, so dass das aktivierte Onchoastacin auf dem Coomassie-Gel weitaus reiner erschien.

Das so aktivierte Onchoastacin wurde mittels Substratgelelektrophorese auf dessen proteolytische Aktivität getestet. Da die Hauptaktivität bei 80 kDa liegt, die Trypsin-verdaute Form des Onchoastacins jedoch ein errechnetes Molekulargewicht von 40 kDa hat, wird davon ausgegangen, dass das Molekül Dimere bildet. Dafür könnte die CUB-Domäne verantwortlich sein (Bond & Beynon, 1995).

Da bis jetzt meist mehrere Astacine in einem Organismus gefunden worden sind, wurde die Häufigkeit des Onchoastacins im Genom untersucht. Dafür wurden Southern Blot-Analysen durchgeführt. Das größte Problem hierbei war die geringe Menge und unzureichende Qualität des parasitären Ausgangsmaterials. Die *O. volvulus*-Weibchen, die zur Isolierung von genomischer DNA verwendet wurden, lagerten seit sechs bis zehn Jahren in flüssigem Stickstoff, wobei die Integrität der DNA nicht gewährleistet war. Tatsächlich war die Qualität der daraus gewonnenen genomischen DNA sehr unterschiedlich. Wurden die Blots mit Digoxigenin-markierten Sonden detektiert, so konnten keine Banden in der restringierten genomischen DNA nachgewiesen werden. Da die Positivkontrolle jedoch stets ein Signal gab (s. Abb. 3.8a), kann dieses Resultat nicht an der Versuchsdurchführung gelegen haben. Es ist anzunehmen, dass die Qualität der genomischen DNA für diese Nachweismethode nicht ausreichend war. Daraufhin wurde eine sensitivere Methode gewählt und nach Fluoreszein-Detektion konnten mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen (*NdeI* und *EcoRI*, s. Abb. 3.8b) zwei Banden detektiert werden. Das lässt darauf schließen, dass das Onchoastacin in mindestens zwei Kopien in der genomischen DNA vorliegt, denn es ist unwahrscheinlich, dass es sich bei beiden Restriktionsenzymen um einen allelischen Polymorphismus handelt, der dazu führt, dass eine Schnittstelle in der Sondensequenz eingeführt worden ist und man daher zwei Signale pro Spur erhält. In Anbetracht der großen Anzahl von Astacingenen bei *C. elegans* kann davon ausgegangen werden, dass bei *O. volvulus* noch weitere Gene gefunden werden können, die für Astacin-artige Metallproteinasen kodieren, die eventuell eine zu geringe Homologie mit der Sondensequenz aufweisen, um im Southern Blot nachgewiesen zu werden.

Um eine Aussage über das Expressionsmuster des Onchoastacins zu machen, wurden PCR-Versuche durchgeführt. Da nur von adulten Würmern Material vorhanden war, konnte keine RT-PCR durchgeführt werden. Die Alternative waren cDNA-Banken, die aufgrund ihres Ursprungs aus RNA einen Hinweis auf das Gesamttranskript des Organismus zum Zeitpunkt der RNA-Isolation darstellen. Im Hinblick auf die dem Onchoastacin

zugesprochene Rolle bei der Migration des Parasiten durch das Wirtsgewebe ist anzunehmen, dass das Enzym in Infektionslarven, Mikrofilarien und Männchen exprimiert wird. Wie in Abb. 3.6 zu sehen ist, konnte das Transkript jedoch in allen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Das PCR-Produkt unter Einsatz einer cDNA-Bank lässt keinen Rückschluss über die Menge an Transkript, die in einer cDNA-Bank vorhanden ist. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation des Proteins (Pierrot *et al.*, 1996). Es wäre durchaus möglich, dass das Astacin auf RNA-Ebene noch im Organismus nachzuweisen ist, auf Proteinebene aufgrund fehlender Translation nicht. Dies zu überprüfen war im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht möglich, da für Western Blot-Analysen die Gesamtextrakte mehrerer Entwicklungsstadien fehlten. Abschließend lässt sich sagen, dass das Onchoastacin auf RNA-Ebene scheinbar konstitutiv vorhanden ist. Für Rückschlüsse auf tatsächlich vorhandenes Protein in den verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten müssen jedoch weitere Versuche durchgeführt werden.

#### 4.1.3 Immunologische Untersuchungen

Zur immunologischen Charakterisierung des Proteins wurden Antikörper produziert. Da das rekombinante Protein mit dem MBP-Tag nicht hochrein war und der mit der Antikörperproduktion beauftragten Firma Eurogentec keine Erfahrungen mit einer Immunisierung mit MBP-fusionierten Proteinen vorlagen, wurde die Methode der Peptid-Immunisierung gewählt. Zunächst wurden 20 Präimmunseren der Kaninchen histologisch auf Antikörper gegen *O. volvulus*-Proteine überprüft. Infektionen mit Nematoden sind selbst unter den im Labor gehaltenen Kaninchen weit verbreitet. Daher ist es bei Filarien-Antigenen besonders schwierig, Antikörper-freie Seren zu finden. Die getesteten Seren zeigten alle eine Antikörperreaktion mit *O. volvulus*-Proteinen in der ELISA-Untersuchung. Es wurden dann die vier Kaninchen für die Immunisierung gewählt, deren Seren die geringste Reaktivität in der Immunhistologie aufwiesen. Das Protokoll von Eurogentec sieht drei Immunisierungen vor. Da die Reaktivität der Seren nach der dritten Injektionen im Vergleich zu den Präimmunseren noch relativ gering ausfiel, wurden die Tiere ein viertes Mal mit den Peptiden immunisiert. Die letzte Blutung zeigte in dem ELISA, in denen der Peptidpool als Antigen verwendet wurde, eine deutliche Antwort im Vergleich zu den Präimmunseren. Wurden die Seren jedoch im Western Blot gegen das rekombinante Protein eingesetzt, so konnte weder das prokaryotisch exprimierte Onchoastacin, noch das

Protein, das aus den Insektenzellen gewonnen wurde, mit den Kaninchenseren nachgewiesen werden. Dieser Befund ließe sich mit der Position der Peptide im nativen Protein erklären. Sind diese durch die Tertiärstruktur des Onchoastacins nicht an der Oberfläche, sondern im Innern des Proteins, so sind die Epitope nicht für den Antikörper zugänglich und können somit auch nicht im Western Blot detektiert werden. Dieser Befund wurde bereits anhand der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) von *O. volvulus* untersucht. Hier wurden vier verschiedene Fragmente der GAPDH rekombinant exprimiert und auf deren IgG-Antwort von Onchozerkose-Patienten getestet. Es wurde eindeutig ein Fragment bevorzugt.

Des Weiteren wurde die Reaktivität von Seren von Onchozerkose-Patienten in Western Blot-Analysen mit prokaryotisch exprimiertem Onchoastacin getestet. Drei von sechs Seren reagierten mit dem rekombinanten Protein mit einer Bande bei 60 kDa, während kein Serum von gesunden Europäern eine Reaktion zeigte. Auch in ELISA-Experimenten konnte eine deutlich höhere Antwort von Patientenseren im Vergleich zu Kontrollseren festgestellt werden. Hier wurde der für die Kaninchen-Vakzinierung verwendete Peptidpool als Antigen eingesetzt. Donnelly *et al.* zeigten 2006, dass zahlreiche Proteinase von Helminthen durch Stimulation einer Th2-Antwort eine Allergie-artige Entzündungsreaktion auslösen. Diese Reaktion ist oft viel effektiver gegen Schleimhaut-befallende Stadien, als gegen migrierende Stadien, wie bei *Toxocara canis*. Der Parasit im Dünndarm von Hunden wird durch eine Kombination aus angeborener und erworbener Immunantwort eliminiert, während die Larvenstadien im Gewebe für Jahre überleben können (Mulcahy *et al.*, 2005). Außerdem ist davon auszugehen, dass die lang währende Ausschüttung von Proteinase ins Wirtsgewebe zu Hautatrophierung bis hin zu hängenden Leisten (hanging groins) führen kann (Brattig 2004).

In einem Western Blot konnte eine Kreuzreaktion eines Antikörpers gegen *Astacus*-Astacin mit dem Onchoastacin festgestellt werden. Da es sich hierbei um ein hochtitriges Serum handelt, wurde dieses verwendet, um histologische Schnitte zu färben. Als Negativkontrolle diente das durch Absorption mit dem rekombinanten Onchoastacin behandelten Immunsereum.

Die Schnitte, die mit dem unbehandelten Serum inkubiert worden waren, zeigten eine spezifische Färbung der Mikrofilarien sowohl im Knoten als auch in der Haut. Die Mikrofilarien, die sich im Uterus der Weibchen befinden, waren wie das adulte Weibchen

selbst ungefärbt. Dieser Befund entspricht der Vorstellung, dass das Onchoastacin exprimiert wird, wenn sich die Mikrofilarien und andere Entwicklungsstadien durch das Gewebe des Wirts bewegen. Um die Fähigkeit des Onchoastacins, einen Vakzinkandidaten darzustellen, weiter zu untermauern, sind weitere Experimente nötig. Zum einen wäre der Nachweis in Gewebsstudien von Astacinen in *O. volvulus*-Männchen interessant. Zum anderen sollte man die L3-Stadien der Modellfilarie *Acanthocheilonema viteae* auf Astacine untersuchen.

#### 4.1.4 Relevanz des Onchoastacins

Lackey *et al.* führten 1989 Untersuchungen über die proteolytische Aktivität in Überständen von *Onchocerca lienalis* (Rinderparasit) und *Onchocerca cervicalis* (Pferdeparasit) durch. Nach Substratgelelektrophorese wurden eine Serinproteinase mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa und eine Metallproteinase mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa nachgewiesen. Hierbei könnte es sich um die Orthologe der in dieser Arbeit untersuchten Proteinase handeln. Haffner *et al.* konnte 1998 zwei ähnliche Aktivitäten in den Überständen von Männchen und Mikrofilarien von *O. volvulus* nachweisen.

Die Bedeutung der Astacin-Proteinase-Familie bei parasitären Nematoden wird durch die zunehmende Anzahl an Veröffentlichungen in den letzten Jahren unterstrichen. Die Infektionslarve des Hundehakenwurms *A. caninum* sekretiert eine Astacin-artige Metallproteinase, die die Larve dazu befähigt, in die Haut des Wirtes einzudringen. Antikörper, die gegen das rekombinante Enzym gerichtet sind, inhibieren nicht nur die Enzymfunktion des Hakenwurm-Astacins, sondern auch die Gewebspenetration um 70-75 %, während Metallproteinaseinhibitoren sie nur um 43-61 % inhibieren (Williamson *et al.*, 2006). Die Antikörper scheinen also eine potente neutralisierende Funktion zu haben, eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung eines Impfstoffs.

Das *Ancylostoma*-Astacin wurde bereits auf seine immunogene Wirkung getestet (Mendez *et al.*, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass die Vakzinierung von Goldhamstern mit einem Vakzincocktail bestehend aus dem Astacin und einem weiteren sekretierten Protein zu einem Schutz der Tiere vor Infektion führte. Des Weiteren ist dieses Astacin Bestandteil eines Vakzincocktails, der in den Vereinigten Staaten bereits die erste klinische Phase beim Menschen durchläuft (Human Hookworm Vaccination Initiative, HHVI). Diese Initiative hat sich zum Ziel gemacht, eine dauerhafte Lösung gegen den Befall mit

Hakenwurm zu finden (Hotez *et al.*, 2006). Die Entwicklung eines Impfstoffs wäre gerade für Entwicklungsländer, die keine Mittel für Medikamente zur Verfügung haben, ideal. Das Hakenwurm-Vakzin ist als ein Vorreiter für die Bekämpfung von Helminthiasen, wie zum Beispiel der Strongyloidosis und andere Nematoden-Infektionen zu sehen.

Das dritte Larvenstadium ist bisher der wichtigste Angriffspunkt bei der Suche nach geeigneten Vakzinen, denn die Ausschaltung dieses Stadiums verhindert die Etablierung einer Infektion. Bereits 1965 wurde ein erster Impfstoff gegen den Rinderlungenwurm *Dictyocaulus filaria* in Form von attenuierten infektiösen Larven kommerziell hergestellt (Jovanovic *et al.*, 1965). Tchakouté zeigte mit der Vakzinierung von Rindern durch bestrahlte L3-Stadien, dass diese zu einem effektiven Schutz in einer natürlichen Wirts-Parasit-Beziehung führt. Interessanterweise konnte auch eine Kreuzimmunität zwischen *O. volvulus* und *Onchocerca ochengi*, die beide von Simuliiden übertragen werden, beobachtet werden (Wahl *et al.*, 1998). Da es aufgrund mangelnden Materials nicht möglich ist, den Menschen mit bestrahlten L3-Stadien zu impfen, ist die Suche nach geeigneten Antigenen ein wichtiger Schritt in der Bekämpfung der Onchozerkose (Tchakouté *et al.*, 2006).

Es wird davon ausgegangen, dass die Anfälligkeit und Ausprägung von parasitischen Infektionen unter anderem auch vom Genotyp des Parasiten abhängig ist, da die Stämme sich in ihrer Virulenz voneinander unterscheiden. Daher sollte der Fokus bei der Entwicklung von Vakzinen auf Proteinen liegen, die notwendig für das Überleben des Parasiten sind, wie es für exkretorisch/sekretorische Produkte angenommen wird, und nicht nur auf Antigenen, die im Verlauf einer schon bestehenden Infektion eine protektive Immunantwort auslösen (Knox *et al.*, 2001).

#### 4.2 *S. ratti*-Astacin

Indieser Arbeit wurde ein weiteres Gen identifiziert, das für ein Astacin aus dem parasitären Nematoden *S. ratti* kodiert. Der Parasit bietet den Vorteil, dass man ihn sowohl in seinem natürlichen Wirt, als auch freilebend im Labor halten kann. Dadurch werden Expressionsvergleiche zwischen parasitären und freilebenden Stadien möglich. Der den Menschen befallende Nematode *Strongyloides stercoralis* weist ebenso wie der Hakenwurm die Fähigkeit auf, aktiv in die intakte Haut des Wirtes einzudringen. Es ist daher von Interesse, die Rolle von Proteinasen in diesem Prozess aufzuklären.

Das Genprodukt des identifizierten Gens weist dieselben strukturellen Merkmale auf wie Onchoastacin. Es kann sich daher um ein Ortholog von Onchoastacin handeln. Die Homologie der beiden Aminosäuresequenzen liegt allerdings nur bei 34 % Identität, während die Astacine aus *S. stercoralis* und *S. ratti* eine Identität von 59 % aufweisen.

Da von *S. ratti* frisches biologisches Material zur Verfügung stand, konnten hier Experimente zur differentiellen Genexpression durchgeführt werden. Die mRNA des Astacins konnte in infektiösen Larvenstadien nachgewiesen werden, während parasitäre Weibchen diese mRNA nicht enthielten. Als Vergleich wurde ein Fragment des Haushaltsgens GAPDH amplifiziert, das in beiden Entwicklungsstadien vorhanden war, wie es bei einem konstitutiv exprimierten Gen zu erwarten ist. Dieser Befund spricht für die regulative Expression des Astacins in infektiösen Stadien, die die Proteinase zur Migration im Wirt benötigen. Weitere funktionelle Untersuchungen mit rekombinant exprimiertem *S. ratti* Astacin und die Herstellung von Antikörpern sind demnach erfolgversprechend.

Während biologisches Material von *O. volvulus* im Bernhard-Nocht-Institut zunehmend limitiert ist, um die Rolle des Onchoastacins zu untersuchen, besteht an einem etablierten *Strongyloides*-Rattenmodell eine gute Möglichkeit, die Rolle verschiedener Astacine aus *Strongyloides* in Zukunft umfassend zu bearbeiten.

#### 4.3 Die Serinproteinase von *B. malayi*

Die zweite kollagenolytische Aktivität in den Überständen von *O. volvulus*, die von Haffner *et al.* 1998 nachgewiesen wurde, konnte nach verschiedenen Analysen einer Serinproteinaseaktivität zugesprochen werden. Um das Enzym zu charakterisieren, musste zunächst die Nukleinsäuresequenz identifiziert werden. Dafür wurden degenerierte Oligonukleotide entwickelt, die von der Konsensussequenz (GDSGGP), die das katalytisch aktive, namengebende Serin umfasst, abgeleitet wurden. Serinproteinasen zeichnen sich durch die stark konservierte Triade H-D-S aus. Von diesen Motiven abgesehen, unterscheiden sich Serinproteinasen jedoch sehr stark. Tatsächlich erwies es sich als nicht möglich, allein aus diesen drei kurzen Motiven ein spezifisches PCR-Produkt zu erhalten. Da die Sequenz nur sechs Aminosäuren lang ist, waren die daraus resultierenden Primer möglicherweise zu kurz, um damit aus einer cDNA-Bank ein Gen amplifizieren zu können. Bei den Versuchen, die Sequenz einer Serinproteinase durch Immunscreening mit einem möglicherweise kreuzreagierenden Antikörper gegen eine endobakterielle Serinproteinase aufzuklären, wurde ebenfalls kein Signal erhalten. Es ist möglich, dass die Abundanz der

Serinproteinase so gering ist, dass die exponierte Menge an Protein während des *Plaque Assays* zu gering war, um eine Detektion mit dem Antikörper zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit ist, dass nur die *Wolbachia*-Serinproteinase im *O. volvulus*-Gesamtextrakt, nicht aber eine Filarienserinproteinase zu dem positiven Signal des Western Blots geführt hatte.

Da nach aufwendigen Versuchen kein Zugang zu einer *O. volvulus*-Serinproteinase gefunden wurde, wurde der Umweg über die nahe verwandte Filarie *B. malayi* gewählt. Hier war aus der NCBI-Datenbank bereits ein EST einer cDNA-Bank des dritten Larvenstadiums bekannt, das für eine Serinproteinase kodierte. Aus diesem EST wurden Primer abgeleitet, die für die Generierung einer DIG-markierten Sonde verwendet wurden. Mittels dieser Sonde konnte in einem cDNA-Banken-Screening der Vollängenklon der Serinproteinase gewonnen werden. Die Nukleotidabfolge des Gens wurde sequenziert und aus der daraus gewonnenen Information konnte die Aminosäuresequenz abgeleitet und untersucht werden. Die Analyse der Sequenz durch das Programm SignalP ergab, dass es sich hier um eine nicht-sekretierte Serinproteinase handelt. Daher ist auszuschließen, dass ein Ortholog dieser Serinproteinase aus *O. volvulus* verantwortlich ist für die Serinproteinaseaktivität in den Überständen von *O. volvulus*-Mikrofilarien.

Eine BLAST-Analyse in der NCBI-Datenbank ergab Homologien zu Serinproteinasen von *C. elegans* (28 % Identität) und *T. spiralis* (26 % Identität). Eine weitere BLAST-Analyse in der MEROPS-Datenbank (Rawlings *et al.*, 2006) ergab die höchste Homologie zu einer Serinproteinase aus dem Blutgerinnungssystem von *Rattus norvegicus*. Das Enzym konnte in die Unterfamilie der Chymotrypsin-artigen Serinproteinasen (S1A) eingeordnet werden. Diese Gruppe weist eine weitaus höhere Diversität auf als die Familie der Astacin-artigen Metallproteinasen, daher sind Kreuzreaktivitäten, wie sie bei dem erfolgten Immunscreening erwünscht gewesen wären, unwahrscheinlich. Außerdem ist auch die Chance auf erfolgreiche PCR-Versuche mit degenerierten Primern gering. Dies wird durch den Befund verdeutlicht, dass die umgebenden Aminosäuren der katalytischen Triade von den Konsensussequenzen abweichen. Sieht man sich die Abweichungen an, so scheint es möglich, dass diese Serinproteinase eine veränderte Substratbindung aufweist, eventuell sogar ihre Funktion eingebüßt hat.

Da das Genom von *B. malayi* als ersten parasitären Nematoden vollständig sequenziert ist (Ghedin *et al.*, 2004), können Sequenzvergleiche auf genomischer Ebene durchgeführt werden. Die genomische Sequenz der Serinproteinase von *B. malayi* wurde mit dem Ortholog von *C. elegans* verglichen. Die kodierende Sequenz bei *B. malayi* besteht aus fünf Introns, die inklusive der Introns 4036 bp umspannen, während *C. elegans* drei Introns aufweist, die insgesamt mit den dazugehörigen Exons eine Länge von 1512 bp haben. Die cDNA unterscheidet sich von der gefundenen Protein-kodierenden Sequenz durch neun zusätzliche Nukleotide und 18 Nukleotidaustausche, die zu acht Aminosäureaustauschen führen. Die Abweichungen können mehrere Ursachen haben. Zum einen sind Sequenzierungsfehler in beiden Sequenzen möglich. Die Abweichungen könnten auch SNPs (engl.: single nucleotide polymorphisms) darstellen. SNPs sind übliche Sequenzvariationen zwischen Individuen. Beim Menschen treten sie alle 100 bis 300 Basenpaare auf. Nicht auszuschließen ist auch, dass die in der cDNA-Bank gefundene Serinproteinase zu den etwa fünf Prozent noch nicht sequenzierter DNA des *B. malayi*-Genoms gehört und somit nur ein Homolog zu der genomischen Sequenz darstellt, die hier analysiert worden ist.

Die Introns bei *C. elegans* sind viel kleiner als bei *B. malayi* und die genomische Organisation weist große Unterschiede auf. Das könnte auf die unterschiedliche Lebensweise der beiden Nematoden zurückzuführen sein. *C. elegans* hat im Vergleich zu der Filarie *B. malayi* eine kurze Generationszeit, die Reduktion von nicht kodierenden Genabschnitten stellt daher einen Evolutionsvorteil dar. Im Gegensatz dazu kann die Anpassung an die parasitäre Lebensweise die Ausprägung von nicht kodierenden Genabschnitten begünstigen, weil einige Stoffwechselwege reduziert wurden und damit Gene ihre Funktionalität eingebüßt haben. Dafür sprechen auch neuere Informationen, nach denen *B. malayi* im Vergleich zu *C. elegans* eine geringere Gendichte zu haben scheint (Ghedin und Slatko, pers. Mitteilung).

### Expression

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Serinproteinase in verschiedenen prokaryotischen Systemen exprimiert. Es ergaben sich dabei ähnliche Probleme mit der Löslichkeit des Exprimats wie bei der Metallproteinase. Schließlich konnte das Enzym stabil und löslich mit Maltose-bindendem Protein als Fusionsprotein exprimiert und gereinigt werden. Die Aktivität des rekombinanten Enzyms wurde mittels Substratgelelektrophore überprüft, es konnte jedoch keine Aktivität festgestellt werden. Das kann mehrere Gründe haben. Zum einen enthält die Aminosäure-Sequenz der Serinproteinase elf Cysteinreste, die

bis zu fünf Disulfidbrücken bilden können. Wäre das der Fall, so ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass das Enzym in einem prokaryotischen Organismus, in dem das zytosolische Milieu reduzierend ist, korrekt gefaltet wird. Die dadurch entstehenden Konformationsänderungen können zu inaktivem Protein führen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Serinproteinase ein sehr spezifisches Wirkspektrum hat und Gelatine nicht als Substrat erkennt. Zur weiteren Analyse sollte die Serinproteinase ebenfalls in einem eukaryotischem System exprimiert werden, um erfolgreich Aktivitätstests durchführen zu können. Dafür war jedoch im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens nicht genügend Zeit.

Bei *B. malayi* konnte bereits die Vakzinierung von Rennmäusen mit einer Proteinase aus dem E/S Produkt von Mikrofilarien erfolgreich nachgewiesen werden. Die immunisierten Tiere wiesen Antikörper mit hoher Zytotoxizität auf, die Wurmlast konnte um 85 % verringert werden (Krithika *et al.* 2005). Das bedeutet, dass auch Proteinasen in E/S-Produkten von *B. malayi* Vazinkandidaten darstellen und somit relevante Filarienproteine sind.

## 5 Zusammenfassung

Onchozerkose ist eine Haut- und Augenkrankheit, die von der Filarie *Onchocerca volvulus* verursacht wird. Der adulte Parasit lebt in subkutanen Knoten, aus denen die Larven (Mikrofilarien) zur Haut wandern. Für diese Gewebswanderung benötigt der Parasit gewebspaltende Proteinase wie Metall- und Serinproteinase. Haffner *et al.* zeigten 1998, dass die Überstände der wandernden Stadien von *O. volvulus* proteolytische Aktivitäten mit molekularen Massen von circa 28 und 52 kDa enthalten.

Um die Sequenzinformationen über die Gene, die für diese Proteinase kodieren, zu erhalten, wurde die NCBI Datenbank nach Expressed Sequence Tags durchsucht. Ein EST mit Homologie zu Metallproteinase diente als Vorlage zur Entwicklung von Oligonukleotiden, mit deren Hilfe PCRs zur Amplifikation des Vollängenklons durchgeführt wurden. Der offene Leserahmen umfasst 1716 bp und kodiert für eine Metallproteinase, die aus 571 Aminosäuren besteht und ein theoretisches Molekulargewicht von 66 kDa hat. Sie gehört zur Familie der Astacin-artigen Metallproteinase, die bereits bei mehreren parasitären Nematoden charakterisiert worden sind, wie zum Beispiel *Ancylostoma caninum*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Ostertagia ostertagi*. Das Protein wurde in mehreren prokaryotischen Expressionssystemen, sowie im Baculovirussystem exprimiert und proteolytisch charakterisiert. Es wurden Antikörper in Kaninchen generiert und die Immunantwort von Onchozerkose-Patienten wurde untersucht. Das *O. volvulus* Astacin (im Folgenden als Onchoastacin bezeichnet) wird durch Trypsin aktiviert und spaltet Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin. Es ist gegenüber dem Metallproteinase-Inhibitor Phenanthrolin sensitiv. Onchozerkose-Patienten zeigten im Unterschied zu nicht infizierten Europäern eine IgG-Antwort. Das Onchoastacin ließ sich in reifen Mikrofilarien nachweisen, nicht aber in Weibchen oder intrauterinen Mikrofilarien.

Durch RT-PCR wurde ein weiteres Astacin aus dem Nager-Parasiten *Strongyloides ratti* identifiziert. Dieser Parasit zeichnet sich durch das Fehlen eines Zwischenwirts aus und durch das Vorkommen sowohl eines parasitären als auch eines freilebenden Zyklus. Der Zugang zu parasitären wie freilebenden Stadien ist im Rattenmodell gewährleistet. Die Identifizierung des *S. ratti*-Astacins stellt den Anfang zu vergleichenden Expressionsstudien von parasitären und freilebenden Stadien dar.

Um die zweite beobachtete proteolytische Aktivität in den *O. volvulus* Kulturüberständen aufzuklären, eine Serinproteinase aus der nah verwandten Filarie *Brugia malayi* identifiziert. *B. malayi* wurde gewählt, da in den Datenbanken keine

Sequenzinformationen zu *O. volvulus*-Serinproteinasen gefunden wurden. Hier wurde ebenfalls auf der Basis eines EST's eine DIG-markierte Sonde generiert, mit der eine cDNA-Bank von *B. malayi*-Männchen gemustert wurde. Es ergab sich ein offener Leserahmen mit einer Länge von 816 bp identifiziert, der für eine Trypsin-artige Serinproteinase mit einem errechneten Molekulargewicht von 30 kDa kodiert. Das Protein wurde prokaryotisch exprimiert und es wurden Antikörper hergestellt.

Die Identifizierung und Charakterisierung von gewebsspaltenden Proteinase von parasitären Nematoden kann eine Grundlage zur Herstellung von Inhibitoren mit chemotherapeutischem Potenzial sein. Außerdem können diese exkretorisch/sekretorischen Produkte Ziele für die Entwicklung eines Impfstoffs darstellen.

## 6 Literatur

**ABRAHAM D, LEON O, LEON S, LUSTIGMAN S** (2001) Development of a recombinant antigen vaccine against infection with the filarial worm *Onchocerca volvulus*. *Infect Immun* 69:262-70

**BARRETT AJ** (1994) Classification of peptidases. *Methods Enzymol* 1994;244:1-15

**BECKER C, KRUSE MN, SLOTTY KA, KOHLER D, HARRIS JR, ROSMANN S, STERCHI EE, STOCKER W** (2003) Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol Chem* 384:825-31

**BEYNON RJ, BOND JS** (1985) Expression of the Mep-1 gene regulating meprin, a kidney brush border proteinase. *Prog Clin Biol Res* 180:185-94

**BODE W, GOMIS-RUTH FX, HUBER R, ZWILLING R, STOCKER W** (1992) Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature* 358(6382):164-7

**BODE W, GOMIS-RUTH FX, STOCKER W** (1993) Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-Turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 331:134-40

**BOND JS, BEYNON RJ** (1995) The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci* 4:1247-61

**BRATTIG N, NIETZ C, HOUNKPATIN S, LUCIUS R, SEEGER F, PICHLMEIER U, POGONKA T** (1997): Differences in cytokine responses to *Onchocerca volvulus* extract and recombinant Ov33 and OvL3-1 proteins in exposed subjects with various parasitologic and clinical states. *J Infect Dis.* 176: 838-42

**BRATTIG NW** (2004) Pathogenesis and host responses in human onchocerciasis: impact of *Onchocerca filariae* and *Wolbachia* endobacteria. *Microbes infect* 6: 113-128

**CAMPBELL ID, BORK P** (1993) Epidermal growth factor-like modules. *Curr Op Struc Biol* 3:385-392

**CORNWELL RL** (1960) The complement-fixing antibody response of calves to *Dictyocaulus viviparus*. II. Vaccination with irradiated larvae. *J Comp Pathol* 70:494-8

**DAS S, MANDAL M, CHAKRABORTI T, MANDAL A, CHAKRABORTI S** (2003) Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. *Mol Cell Biochem* 253:31-40.

- DAVIS CG**(1990) The many faces of epidermal growth factor repeats.  
New Biol 2:410-9
- DE MAERE V, VERCAUTEREN I, GELDHOF P, GEVAERT K, VERCRUYSSSE J, CLAEREBOUT E**  
(2005) Molecular analysis of astacin-like metalloproteases of *Ostertagia ostertagi*.  
Parasitology 130:89-98
- DONNELLY S, DALTON JP, LOUKAS A** (2006) Proteases in helminth- and allergen- induced  
inflammatory responses. Chem Immunol Allergy 90:45-64
- DUKE BO** (1993) The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. Trop  
Med Parasitol 44:61-8
- DUMERMUTH E, STERCHI EE, JIANG WP, WOLZ RL, BOND JS, FLANNERY AV, BEYNON RJ**  
(1991) The astacin family of metalloendopeptidases.  
J Biol Chem 266:21381-5
- SARA GOMEZ GALLEGO, ALEX LOUKAS, ROBERT W. SLADE, FRANKLIN A. NEVA, RAVI  
VARATHARAJALU, THOMAS B. NUTMAN AND PAUL J. BRINDLEY** (2005) Identification of an  
astacin-like metallo-proteinase transcript from the infective larvae of *Strongyloides  
stercoralis* Parasitol Internat
- GHEDIN E, WANG S, FOSTER JM, SLATKO BE** (2004) First sequenced genome of a parasitic  
nematode. Trends Parasitol 20:151-3
- GROVE DI** (1989) Strongyloidiasis a major roundworm infection of man. Taylor & Francis  
Ltd., London
- HAFNER A, GUILAVOGUI AZ, TISCHENDORF FW, BRATTIG NW** (1998) *Onchocerca volvulus*:  
microfilariae secrete elastinolytic and males nonelastinolytic matrix-degrading serine and  
metalloproteases. Exp Parasitol 90: 26-33
- HARTIGAN N, GARRIGUE-ANTAR L, KADLER KE** (2003) Bone morphogenetic protein-1  
(BMP-1). Identification of the minimal domain structure for procollagen C-proteinase  
activity. J Biol Chem 278:18045-9
- HISHIDA R, ISHIHARA T, KONDO K, KATSURA I** (1996) hch-1, a gene required for normal  
hatching and normal migration of a neuroblast in *C. elegans*, encodes a protein related to  
TOLLOID and BMP-1. EMBO J 15:4111-22
- HOTEZ PJ, ASHCOM J, ZHAN B, BETHONY J, LOUKAS A, HAWDON J, WANG Y, JIN Q, JONES  
KC, DOBARDZIC A, DOBARDZIC R, BOLDEN J, ESSLET I, BRANDT W, RUSSELL PK, ZOOK BC,  
HOWARD B, CHACON M** (2003) Effect of vaccination with a recombinant fusion protein  
encoding an astacinlike metalloprotease (MTP-1) secreted by host-stimulated *Ancylostoma  
caninum* third-stage infective larvae J Parasitol 89:853-5
- HOTEZ PJ, BETHONY J, BOTTAZZI ME, BROOKER S, DIEMERT D, LOUKAS A** (2006) New  
technologies for the control of human hookworm infection. Trends Parasitol 22: 27-31

- JIANG W, BOND JS** (1992) Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett* 312: 110-4
- JOLODAR A, FISCHER P, BUTTNER DW, MILLER DJ, SCHMETZ C, BRATTIG NW** (2004) *Onchocerca volvulus* expression and immunolocalization of a nematode cathepsin D-like lysosomal aspartic protease. *Exp Parasitol*. 107:145-56
- JOLODAR A, FISCHER P, BUTTNER DW, BRATTIG NW** (2004) Wolbachia endosymbionts of *Onchocerca volvulus* express a putative periplasmic HtrA-type serine protease. *Microbes Infect*. 6(2):141-9.
- JOVANOVIC M, ŠOKOLIC A, MOVSESIJAN M, CUPERLOVIC K** (1965) Immunization of sheep with irradiated larvae of *Dictiocaulus filaria*. *Br Vet J*. 121:119-131
- KEISER PB, NUTMAN TB** (2004) *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. *Clin Microbiol Rev* 17:208-17. Review
- KNOX DP, ŠKUCE PJ, NEWLANDS GF AND REDMOND DL** (2001) Nematode Gut Peptidases, Proteins and Vaccination. CAB International 2001. Parasitic Nematodes
- KRITHIKA KN, DABIR P, KULKARNI S, ANANDHARAMAN V, REDDY MV** (2005) Identification of 38 kDa *Brugia malayi* microfilarial protease as a vaccine candidate for lymphatic filariasis. *Indian J Exp Biol* 43:759-68
- LACKEY A, JAMES ER, ŠAKANARI JA, RESNICK ŠD, BROWN M, BIANCO AE, MCKERROW JH** (1989) Extracellular proteases of *Onchocerca*. *Exp Parasitol* 68:176-85
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5
- LAMMIE PJ, CUENCO KT, PUNKOSDY GA** (2002) The pathogenesis of filarial lymphedema: is it the worm or is it the host? *Ann N Y Acad Sci* 979:131-42 discussion 188-96
- LEE JD, YEN CM** (2005) Protease secreted by the infective larvae of *Angiostrongylus cantonensis* and its role in the penetration of mouse intestine. *Am J Trop Med Hyg* 72:831-6
- LUN HM, MAK CH, KO RC** (2003) Characterization and cloning of metallo-proteinase in the excretory/secretory products of the infective-stage larva of *Trichinella spiralis* *Parasitol Res* 90: 27-37
- MCKERROW JH** (1989) Parasite proteases. *Exp Parasitol*. 68: 111-5. Review.
- MCKERROW JH, KEENE WE, JEONG KH, WEBB Z** (1983) Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I. Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host. *Lab Invest* 49:195-200

- MENDEZ S, ZHAN B, GOUD G, GHOSH K, DOBARDZIC A, WU W, LIU S, DEUMIC V, DOBARDZIC R, LIU Y, BETHONY J, HOTEZ PJ** (1990) Effect of combining the larval antigens *Ancylostoma* secreted protein 2 (ASP-2) and metalloprotease 1 (MTP-1) in protecting hamsters against hookworm infection and disease caused by *Ancylostoma ceylanicum*. *Vaccine* 23:3123-30
- MOHRELEN F, BAUS S, GRUBER A, RACKWITZ HR, SCHNOLZER M, VOGT G, ZWILLING R** (2001) Activation of pro-astacin. Immunological and model peptide studies on the processing of immature astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus*. *Eur J Biochem* 268:2540-6
- MOHRELEN F, HUTTER H, ZWILLING R** (2003) The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Biochem* 270: 4909-20
- MULCAHY G, O'NEILL S, FANNING J, MCCARTHY E, SEKIYA M** (2005) Tissue migration by parasitic helminths - an immunoevasive strategy? *Trends Parasitol* 21: 273-7
- NEWPORT GR, MCKERROW JH, HEDSTROM R, PETITT M, MCGARRIGLE L, BARR PJ, AGABIAN N** (1988) Cloning of the proteinase that facilitates infection by schistosome parasites. *J Biol Chem* 263:13179-84
- NGUYEN T, JAMAL J, SHIMELL MJ, ARORA K, O'CONNOR MB** (1994) Characterization of tolloid-related-1: a BMP-1-like product that is required during larval and pupal stages of *Drosophila* development. *Dev Biol* 166:569-86
- NOVELLI J, AHMED S, HODGKIN J** (2004) Gene interactions in *Caenorhabditis elegans* define DPY-31 as a candidate procollagen C-proteinase and SQT-3/ROL-4 as its predicted major target. *Genetics* 168:1259-73
- Omar MS, Garm R** (1977) Lethal damage to *Simulium metallicum* following high intakes of *Onchocerca volvulus* microfilariae in Guatemala. *Tropenmed Parasitol*. 1:109-19
- OTTESEN EA, WELLER PF, HECK L** (1977) Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis. *Immunology* 33:413-21
- OTTESEN EA** (1995) Immune responsiveness and the pathogenesis of human onchocerciasis. *J Infect Dis* 171:659-71. Review
- PEREIRA LIMA J, DELGADO, PG** (1961) Diagnosis of strongyloidiasis: importance of Baermann's method. *Am J Digest Dis* 6:899-904
- PETRALANDA I, YARZABAL L, PIESSENS WF** (1986) Studies on a filarial antigen with collagenase activity. *Mol Biochem Parasitol* 19:51-9
- PETRALANDA I, PIESSENS WF** (1994) Pathogenesis of onchocercal dermatitis: possible role of parasite proteases and autoantibodies to extracellular matrix proteins. *Exp Parasitol* 79:177-86

**PIERROT C, GODIN C, LIU JL, CAPRON A, KHALIFE J** (1996) *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life-cycle. *Parasitology* 113: 519-26.

**POOLE CB, JIN J, McREYNOLDS LA** (2003) Cloning and biochemical characterization of blisterase, a subtilisin-like convertase from the filarial parasite, *Onchocerca volvulus*. *J Biol Chem* 278:36183-90

**RACZ P, TENNER-RACZ K, BUTTNER DW, ALBIEZ EJ** (1982) Ultrastructural evidence for eosinophil-parasite adherence (EPA) reaction in human onchocercal lymphadenitis in the early period following diethylcarbamazine treatment. *Tropenmed Parasitol* 33:213-8

**RAWLINGS ND, BARRETT AJ.** (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* 290:205-18.

**RAWLINGS ND, MORTON FR, BARRETT AJ** (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34, D270-D272

**SAKANARI JA, STAUNTON CE, EAKIN AE, CRAIK CS, MCKERROW JH** (1989) Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4863-7

**SANGER F, COULSON AR, BARRELL BG, SMITH AJ, ROE BA** (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol.* 143:161-78

**STINGL P** (1997) Onchocerciasis: clinical presentation and host parasite interactions in patients of Southern Sudan. *Int J Dermatol* 36:1-23

**STÖCKER W, GOMIS-RUTH FX, BODE W** (1993) Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *Eur J Biochem* 214:215-31

**STÖCKER W, GRAM F, BAUMANN U, REINEMER P, GOMIS-RUTH FX, MCKAY DB, BODE W** (1995) The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* 4:823-40

**SUZUKI M, SAGOH N, IWASAKI H, INOUE H, TAKAHASHI K** (2004) Metalloproteases with EGF, CUB, and thrombospondin-1 domains function in molting of *Caenorhabditis elegans*. *Biol Chem* 385:565-8

**TARENTINO AL, QUINONES G, PLUMMER TH JR** (1995) Overexpression and purification of non-glycosylated recombinant endo-beta-N-acetylglucosaminidase F3. *Glycobiology* 5:599-601

**TCHAKOUTE VL, GRAHAM SP, JENSEN SA, MAKEPEACE BL, NFOR CK, NJONGMETA LM, LUSTIGMAN S, ENYONG PA, TANYA VN, BIANCO AE, TREES AJ** (2006) In a bovine model of onchocerciasis, protective immunity exists naturally, is absent in drug-cured hosts, and is induced by vaccination. *Proc Natl Acad Sci* 103:5971-6

**TITANI K, TORFF HJ, HORMEL S, KUMAR S, WALSH KA, RODL J, NEURATH H, ZWILLING R.** (1987): Amino acid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluviatilis*. *Biochemistry* 26:222-6

**TORT J, BRINDLEY PJ, KNOX D, WOLFE KH, DALTON JP** (1999) Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv Parasitol* 43:161-266 Review

**VINEY ME** (1996) Developmental switching in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Proc Biol Sci* 263:201-8

**VINEY ME** (2006) The biology and genomics of *Strongyloides*. *Med Microbiol Immunol* 195:49-54. Review

**WAHL G, ENYONG P, NGOSSO A, SCHIBEL JM, MOVOU R, TUBBESING H, EKALE D, RENZ A** (1998) *Onchocerca ochengi*: epidemiological evidence of cross-protection against *Onchocerca volvulus* in man. *Parasitology* 116: 349-62

**Whitehead AG, Hemming JR** (1965) A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Ann. appl. Biol.*, 55: 25-38.

**WILLIAMSON AL, LUSTIGMAN S, OKSOV Y, DEUMIC V, PLIESKATT J, MENDEZ S, ZHAN B, BOTTAZZI ME, HOTEZ PJ, LOUKAS A** (2006) *Ancylostoma caninum* MTP-1, an astacin-like metalloprotease secreted by infective hookworm larvae, is involved in tissue migration. *Infect Immun* 74:961-7

**WHO** (1995) Onchocerciasis and its control. Report of a WHO Expert Committee on Onchocerciasis Control. *World Health Organ Tech Rep Ser* 852:1-104

**WOZNEY JM, ROSEN V, CELESTE AJ, MITSOCK LM, WHITTERS MJ, KRIZ RW, HEWICK RM, WANG EA** (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-34

**ZHAN B, HOTEZ PJ, WANG Y, HAWDON JM** (2002) Developmentally regulated metalloprotease secreted by host-stimulated *Ancylostoma caninum* third-stage infective larvae is a member of the astacin family of proteases. *Mol Biochem Parasitol* 120:291-6

**ZIMMERMAN PA, DADZIE KY, DE SOLE G, REMME J, ALLEY ES, UNNASCH TR** (1992) *Onchocerca volvulus* DNA probe classification correlates with epidemiologic patterns of blindness. *J Infect Dis* 165:964-8

## 7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Norbert Brattig für die Bereitstellung des Themas und Arbeitsplatzes, sowie für die umfassende Betreuung bei der Anfertigung dieser Dissertation und die Sorgfalt, die er meiner Arbeit entgegen gebracht hat, bedanken.

Herrn Professor Dr. L. Renwrantz danke ich für das Interesse an dieser Dissertation und die bereitwillige Übernahme der Zweitgutachtens.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Büttner für das Korrekturlesen und die vielen hilfreichen Anregungen.

Mein großer Dank gilt auch Frank, der mir sehr viel im Labor geholfen hat und mit seiner stoischen Ruhe immer ein Fels in der Forschungsbrandung ist.

Iris und Peter hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme.

Ich möchte Christoph für seine unermessliche Hilfsbereitschaft und die vielen Anregungen, sowie die Hilfe im Labor und bei den bioinformatischen Analysen danken.

Vielen Dank meine liebe Zita für all die Tips und Tricks, fürs Korrekturlesen und vor allem für Deine Freundschaft.

Ohne Ingrid hätte ich für das Formatieren meiner Arbeit mindestens doppelt so lange benötigt und wüsste wohl heute noch nicht, wie ich den Drucker überliste. Ebenso möchte ich mich bei Anke und Hanns für das Korrekturlesen bedanken.

Ich bedanke mich bei der Laborgruppe um Martin Wiese für die vielen schönen und „heilenden“ Kuchenschlachten und Kaffeepausen.

Und zum Schluss danke ich Mario für seine Engelsgeduld.