

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung der rekombinanten *C. elegans*-Cystatine rCysele1 und rCysele2

3.1.1. RNA-Gewinnung und RT-PCR

Bei der Sequenzierung des Chromosoms III von *C. elegans* wurden zwei cystatinähnliche Sequenzen beschrieben (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Diese beiden Cystatinsequenzen wurden isoliert und ohne Signalsequenzen amplifiziert. RNA wurde aus einer *C. elegans*-Mischkultur gewonnen, die mRNA wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Unter Nutzung der *C. elegans*-Cystatinprimer wurden durch PCR zwei Sequenzen mit einer Molekulargröße von 360 bp (Cysele1) bzw. 372 bp (Cysele2) amplifiziert.

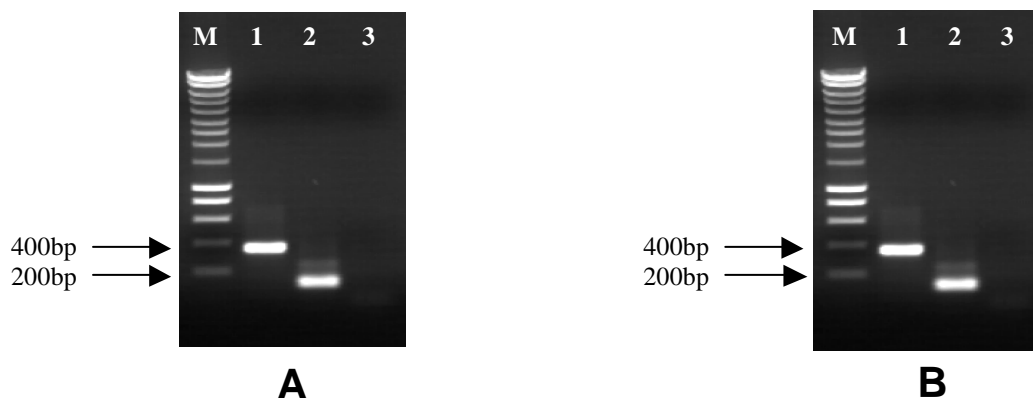


Abb.6: RT-PCR. Durch spezifische Primer wurden die Sequenzen der *C. elegans*-Cystatine amplifiziert.

Spur M: DNA-Marker.

Spur 1: Template DNA: cDNA einer *C. elegans*-Mischkultur
Primer: *C. elegans* Forward- / Reverse-Primer.

Spur 2: Template DNA: cDNA einer *C. elegans*-Mischkultur
Primer: *C. elegans* Forward- / cystatinspezifischer, interner Primer.

Spur 3: Template DNA: cDNA einer *C. elegans*-Mischkultur
Primer: *C. elegans* Forward- / Reverse-Primer des jeweils anderen *C. elegans*-Cystatins (Negativkontrolle).

A: rCysele1. B: rCysele2.

Zur Kontrolle, daß es sich bei diesen Sequenzen um Cystatinsequenzen handelte, wurde in einem weiteren Ansatz ein cystatinspezifischer, interner Primer (basierend auf dem aktiven Zentrum) als Reverse-Primer eingesetzt. Durch die beiden amplifizierten Sequenzen von 150 bp (Cysele1) bzw. 165 bp (Cysele2) wurde der Nachweis erbracht, daß es sich um Cystatinsequenzen handelte. In Abb.6 sind die Ergebnisse der PCR dargestellt.

3.1.2. Klonierung und Expression von rCysele1 und rCysele2 / Sequenzanalyse

Die durch die PCR amplifizierten Sequenzen von Cysele1 und Cysele2 wurden in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert und durch Sequenzierung nach der Methode von Sanger et al. (1977) überprüft. Die Nukleotidsequenzen waren identisch mit den durch das „The *C. elegans* Sequencing Consortium“ veröffentlichten Cystatinsequenzen, mit Ausnahme des Nukleotids 120 von Cysele1, bei dem anstelle eines Desoxyadenosinmonophosphates ein Desoxythymidinmonophosphat eingebaut worden war. Diese Veränderung hat keinen Einfluß auf die darauffolgende Aminosäuresequenz des Proteins. Nach der Sequenzkontrolle von Cysele1 und Cysele2 wurden beide Sequenzen in den Expressionsvektor pET28a gebracht. *E. coli* (BL21DE3) wurden mit den Vektoren transformiert. Flüssigkulturen dieser Bakterien wurden über 2 h mit 2 mM IPTG induziert. Durch Löslichkeitstest wurden die Puffer festgelegt, mit denen die exprimierten Proteine aus den abzentrifugierten Bakterienpellets aufgereinigt werden sollten. rCysele1 und rCysele2 wurden unter denaturierenden und nicht denaturierenden Bedingungen mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und mehrmals gegen 1 x PBS dialysiert.

In Abb.7 und 8 sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der rekombinanten *C. elegans*-Cystatine dargestellt. rCysele1 besteht aus 171 Aminosäuren (120 AS des kodierenden Bereichs des Cystatins, 43 AS aus dem pET-Vektor, 8 AS aus dem pGEM-T Easy-Vektor) und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 18,5 kDa. rCysele2 besteht aus 175 Aminosäuren (124 AS des kodierenden Bereichs des Cystatins, 43 AS aus dem pET-Vektor, 8 AS aus dem pGEM-T Easy-Vektor) und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 19,2 kDa.

In Abb.9 wird die bakterielle Expression der beiden Cystatine veranschaulicht. rCysele1 und rCysele2 wurden stark exprimiert und ließen sich in Konzentrationen von bis zu 480 µg / ml aufreinigen. Aus einer 500 ml-Bakterienkultur wurden bis zu 6 mg rekombinantes Protein gewonnen.

In den anschließenden Untersuchungen wurden weiter folgende in *E. coli* exprimierte und unter gleichen Bedingungen aufgereinigte, rekombinante Proteine eingesetzt: rAv17 (Hartmann et al., 1997) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 21 kDa, rOv17 (Lustigman et al., 1992; Schönemeyer et al., 2001) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 19,5 kDa und rOv33 (Lucius et al., 1988 a, b; Willenbacher et al., 1993) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 30 kDa. rOv33 ist ein rekombinantes *O. volvulus*-Protein, das Homologien zu einem Aspartylproteinaseinhibitor von *Ascaris suum* aufweist, und wurde als Negativkontrolle verwandt.

```

1  ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
1  M G S S H H H H H S S G L V P R G S H

61  ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGA
21  M A S M T G G Q Q M G R G S E F E L R R

121  CAAGCTTGCGGCCGCGGAATTTCGATTCAAATTGCTGGTGGATTGTCTGATGTGAATGCC
41  Q A C G R G N S I Q I A G G L S D V N A

181  TCTGAGTATACTGGAGCAGCTTGAATTTCGGTGCCGAAATAAACAGTAAGAATAATGGA
61  S E Y T G A A W N S V P E I N S K N N G

241  CAAACTACATGGTTCCAATTAAGGTTGTTAAAGCTCAAGTTCAGTTGTTGCCGGAACC
81  Q N Y M V P I K V V K A Q V Q V V A G T

301  AATACAGTTTGGGAAGTTCTTGTGGAGAGTCAACTTGTCCGAGACAAGGATCAGTTCAA
101  N T V L E V L V G E S T C P R Q G S V Q

361  GCTTCTCAAGTCACTGCTGCAAATTGTCCATTGAAGTCTGGTGGCAAGCGTGAACCTTAC
121  A S Q V T A A N C P L K S G G K R E L Y

421  AAAGTGTCCATTGGGAGAAACCATGGGAAACTTCAAGCAAACCTAAGGCTGAAAAAATC
141  K V S I W E K P W E N F K Q T K A E K I

481  AGAGGTGTGAAACCTGATGAAAAAATTAATCACTAG
161  R G V K P D E K I N H *

```

Abb.7: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von rCysele1. Die Nummerierung der Nukleotide beginnt mit dem ersten Nukleotid, die Nummerierung der Aminosäuren mit der ersten Aminosäure des rekombinanten Cystatins. Die Nukleotide des pGEM-T Easy-Vektors sind fettgedruckt, der für das Cystatin kodierende Bereich ist unterstrichen, die Nukleotide aus dem pET-Vektor sind nicht hervorgehoben, mit Ausnahme der sechs Histidine, die kursiv geschrieben und mit deren Hilfe die rekombinanten Proteine aufgereinigt worden sind. Die Stelle, an der in der rekombinanten Nukleotidsequenz anstelle eines Desoxyadenosinmonophosphates ein Desoxythymidinmonophosphat eingebaut wurde, ist fett und unterstrichen. Dieser Unterschied in der Nukleotidsequenz beeinflusst nicht die sich daraus ergebende Aminosäuresequenz des Proteins.

```

1  ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
1  M G S S H H H H H S S G L V P R G S H

61  ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGA
21  M A S M T G G Q Q M G R G S E F E L R R

121  CAAGCTTGCGGCCGCGGAATTCGATTGGTATGATGACTGGAGGATCTGTTGAACAAGAT
41  Q A C G R G N S I G M M T G G S V E Q D

181  GCATCTCAAAGGAGTATTCTGACAAAGCCTGGAAGGCTGTGAAAGGCATCAACGATCAG
61  A S Q K E Y S D K A W K A V K G I N D Q

241  GCATCCAACAACGGACCTTACTACTACGCCCGATTAAGGTCACAAGGCCTCAACCCAA
81  A S N N G P Y Y Y A P I K V T K A S T Q

301  GTTGTCGCTGGAATCAGCACCAAGCTCGAGGTGCTCGTCTGGTGAATCGAACTGCAAGAAG
101  V V A G I S T K L E V L V G E S N C K K

361  GGAGAGTTCAGGCTCACGAGATCACTTCTTCCAACTGCCAAATCAAGGATGGTGAAGC
121  G E L Q A H E I T S S N C Q I K D G G S

421  CGTGCTCTGTACCAAGTCACCATCTGGGAGAAGCCATGGGAGAACTTCGAGCAATTCACT
141  R A L Y Q V T I W E K P W E N F E Q F T

481  GTGGAGAAGATCCGCGATGTTACCGCTGACGAGCAGTTCAACTACTAG
161  V E K I R D V T A D E Q F N H *

```

Abb.8: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von rCysele2. Die Nummerierung der Nukleotide beginnt mit dem ersten Nukleotid, die Nummerierung der Aminosäuren mit der ersten Aminosäure des rekombinanten Cystatins. Die Nukleotide des pGEM-T Easy-Vektors sind fettgedruckt, der für das Cystatin kodierende Bereich ist unterstrichen, die Nukleotide aus dem pET-Vektor sind nicht hervorgehoben, mit Ausnahme der sechs Histidine, die kursiv geschrieben und mit deren Hilfe die rekombinanten Proteine aufgereinigt worden sind.

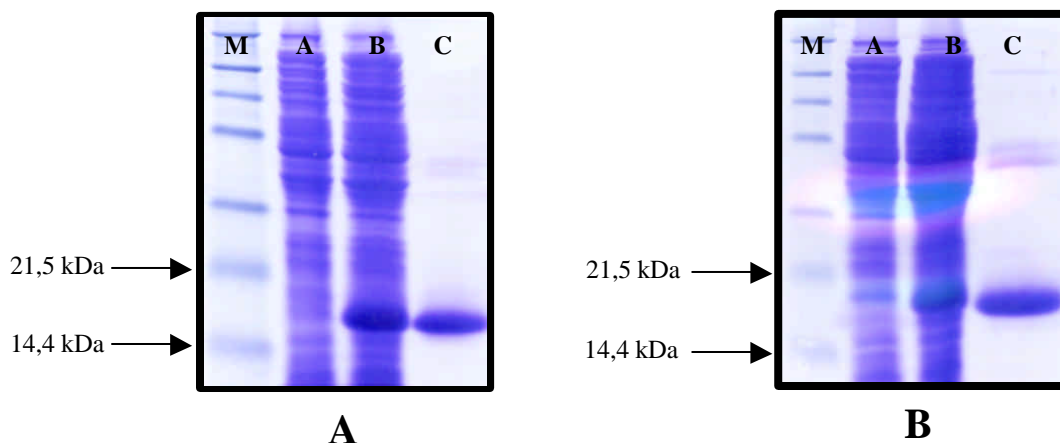


Abb.9: Coomassie-gefärbtes SDS-Polycrylamidgel. Die rekombinanten *C. elegans*-Cystatine wurden in *E. coli* (BL21DE3) exprimiert und anschließend über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt.

Spur M: Proteinmarker.

Spur A: *E. coli*-Bakterienkultur vor der Induktion mit IPTG.

Spur B: *E. coli*-Bakterienkultur nach der Induktion mit 2 mM IPTG.

Spur C: Aufgereinigtes und dialysiertes Protein.

A: rCysele1. B: rCysele2.

3.2. Kreuzreaktivität von polyklonalen Antiseren gegen rekombinante *C. elegans*-, *A. viteae*- und *O. volvulus*-Cystatine

Polyklonale Kaninchenantiseren gegen rCysele1, rCysele2, rAv17 und rOv17 wurden im Western-Blot eingesetzt. Untersucht wurde, inwieweit die Antiseren mit den verschiedenen rekombinanten Cystatinen kreuzreagieren. Die Ergebnisse sind in Abb.10 dargestellt.

Alle Antiseren reagierten mit den untersuchten rekombinanten Cystatinen, mit Ausnahme des polyklonalen Antiserums gegen rCysele2, welches nur rCysele1 bzw. rCysele2 erkannte. Die Intensität der Reaktionen war jedoch unterschiedlich. Ein polyklonales Antiserum gegen ein spezifisches Cystatin erkannte am stärksten dieses Cystatin. Dies deutet darauf hin, daß die untersuchten Cystatine eine begrenzte Zahl gemeinsamer Epitope besitzen.

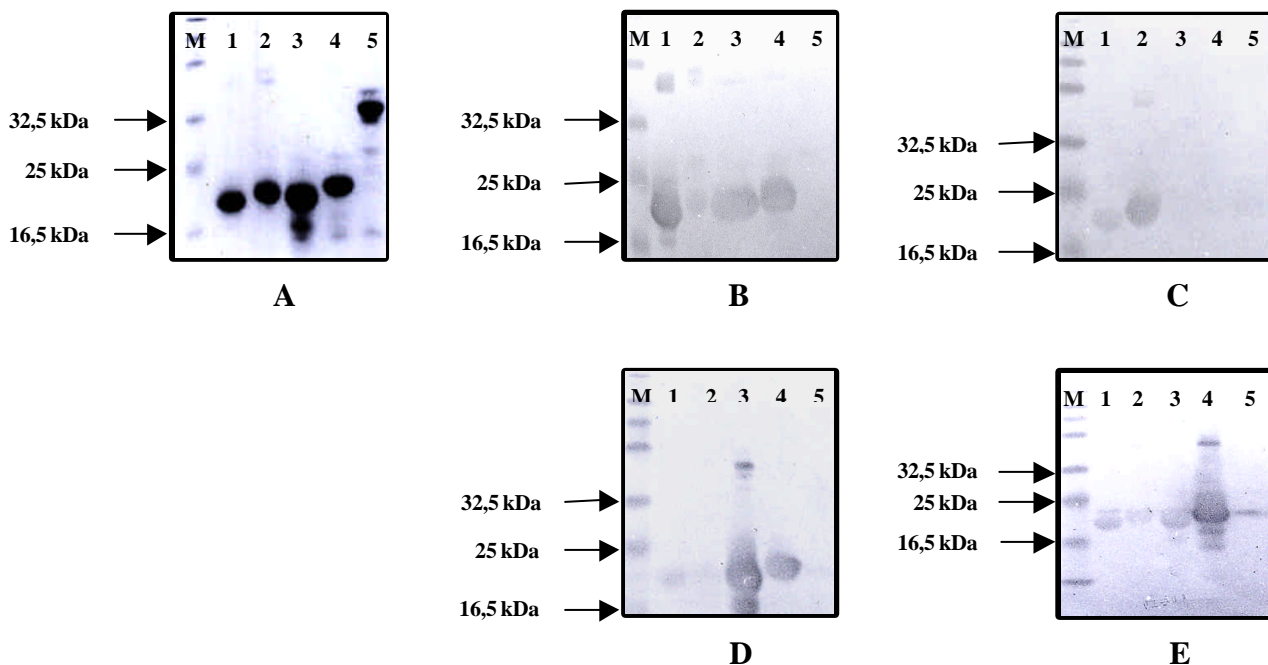


Abb.10: Western-Blot. Untersuchung der Kreuzreaktivität von rCysele1, rCysele2, rAv17, rOv17 mit den verschiedenen polyklonalen Kaninchenantiseren gegen rCysele1, rCysele2, rAv17 bzw. rOv17.

M: Proteinmarker; 1: rCysele1; 2: rCysele2; 3: rAv17; 4: rOv17; 5: rOv33.

A: Coomassie-gefärbtes SDS-Polycrylamidgel.

B: Polyklonales Antiserum gegen rCysele1.

C: Polyklonales Antiserum gegen rCysele2.

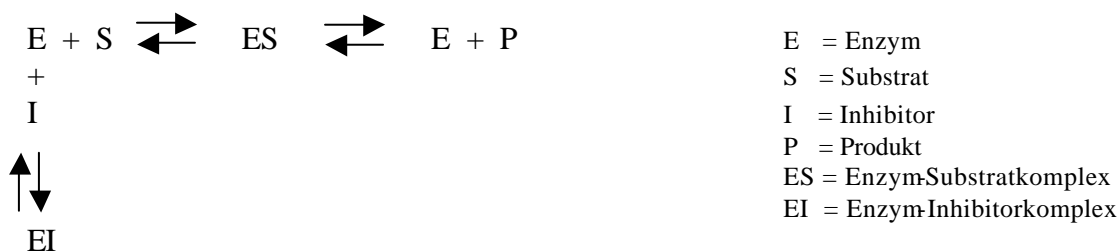
D: Polyklonales Antiserum gegen rAv17.

E: Polyklonales Antiserum gegen rOv17.

3.3. Überprüfung der inhibitorischen Aktivität von rCysele1 und rCysele2

Da Cysteinproteinasen bei der Antigenprozessierung und -präsentation beteiligt sind, war es von Interesse, inwieweit die rekombinanten *C. elegans*-Cystatine die enzymatische Aktivität von Papain sowie von den humanen Cysteinproteinasen Cathepsin L, B und S beeinflussen. Die Inhibitionsstudien wurden entsprechend Barrett und Kirschke (1981) durchgeführt.

Die Inhibition von Cysteinproteinasen durch Cystatine erfolgt kompetitiv nach folgendem Schema:



Papain und Cathepsin B, L und S spalten auch künstliche, fluorogene Substrate, bestehend aus einem spezifitätsbestimmenden, kurzen Peptid und der über eine Peptidbindung gekoppelten fluorogenen Gruppe. Die Hydrolyse dieser Peptidbindung führt zur Freisetzung des Fluorogens und zu einer gut meßbaren Fluoreszenzänderung. Diese wurde mit einem Fluorimeter in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zwischen Inhibitor und Enzym verfolgt. Es zeigte sich, daß alle untersuchten Inhibitionsreaktionen zum sogenannten „slow-tight-binding“ Typ gehören und folglich daraus nichtlineare Produktbildungskurven $P = f(t)$ ($t = \text{Zeit}$) resultieren, die mit Gleichung (1) beschrieben werden können.

$$\text{Gleichung (1)} \quad f(x) = P(t) = v_i t + ((v_0 - v_i) / k_{\text{obs}}(1 - e^{-(k_{\text{obs}} t)}))$$

Mit dieser Gleichung lassen sich durch nichtlineare Optimierung die Anfangsgeschwindigkeiten (v_0 , $t = 0$), die Endgeschwindigkeiten (v_i , $t = \text{unendlich}$) und die „pseudo first order“-Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) für den Übergang von v_0 zu v_s bestimmen. Die Aktivität der Proteinase wurde bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Aus den beobachteten Zeitverläufen der Produktbildung wurden jeweils die eben aufgeführten Parameter bestimmt und in einem Sekundärplot als Funktion von $[I]$ dargestellt. Die Auswertung erfolgte sowohl für die stationäre ($v = f(I)$) als auch für die prästationäre ($k_{\text{obs}} = f(I)$) Phase. Beide Ergebnisse wurden verglichen und stimmten bei allen Meßreihen gut

überein. Die K_i -Werte und die zugehörigen Standardabweichungen, die mittels Gleichung (2) aus den v_s -Werten errechnet wurden, sind in Tab.2 gezeigt.

$$\text{Gleichung (2)} \quad v_i = v_{\max}S / (K_m(1 + I / K_i) + S)$$

In die Berechnung gehen die Substratkonzentrationen der Tests, die sich während der Messung nicht nennenswert geändert haben, und die K_m -Werte, die aus der Literatur übernommen wurden, ein. In den Abb.11-14 sind die gemessenen Primärdaten sowie die daraus errechneten Sekundärdaten zu den einzelnen Cysteinproteinasen und Inhibitoren gezeigt.

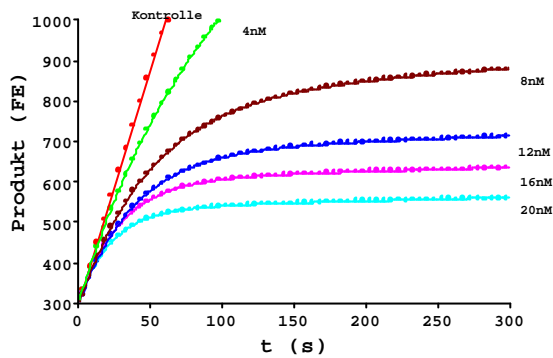
In Tab.2 sind die K_i -Werte von rCysele1 und rCysele2 gegenüber den Cysteinproteinasen aufgeführt. Die Werte zeigen, daß rCysele1 und rCysele2 starke Inhibitoren von Papain und den humanen Cathepsinen L und S sind, humanes Cathepsin B wird geringer inhibiert, wobei die Hemmung der Aktivität von humanem Cathepsin B durch rCysele1 am schwächsten ist.

Die Kinetik der Inhibition von Cathepsin B durch rCysele2 weist auf eine Besonderheit gegenüber der Inhibition von Cathepsin B durch rCysele1 hin. rCysele2 inhibiert langsam Cathepsin B, mit zunehmender Reaktionsdauer wird rCysele2 sehr fest von Cathepsin B gebunden. Man kann davon ausgehen, daß sich die Strukturen von rCysele2 sowie von Cathepsin B während des Inhibitionsprozesses ändern. Diese Änderung führt zur Bildung eines festen Enzym- / Inhibitor Komplexes (Schilling, persönliche Mitteilung).

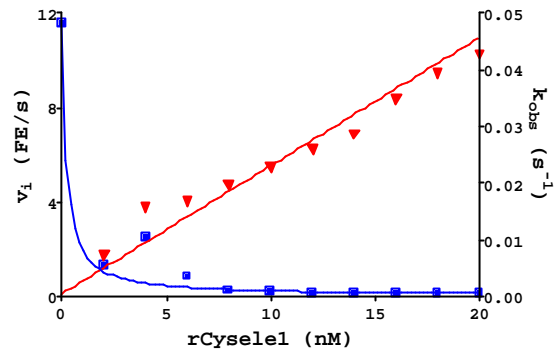
	rCysele1	rCysele2
Papain	0,1950 ± 0,0039 nM	0,2831 ± 0,0159 nM
Cathepsin B	38,8854 ± 4,0613 nM	1,1828 ± 0,8954 nM
Cathepsin L	0,0143 ± 0,0014 nM	0,0360 ± 0,0037 nM
Cathepsin S	0,1214 ± 0,0168 nM	0,1805 ± 0,0141 nM

Tab.2: K_i -Werte von rCysele1 und rCysele2 für Papain und Cathepsin B, S und L. Die Aktivität der Cysteinproteinasen wurde über einen Zeitraum von 5 min unter Zusatz von rCysele1 und rCysele2 fluorometrisch gemessen. Basierend auf den Meßwerten wurden die K_i -Werte bestimmt.

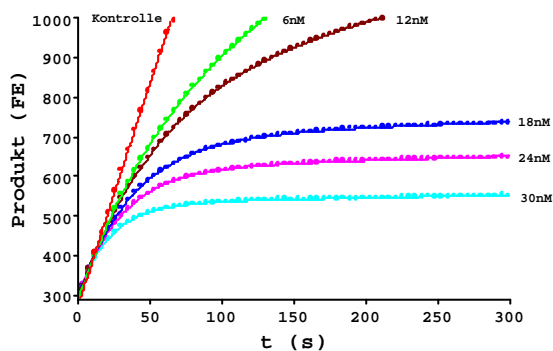
3.3.1. Inhibition von Papain



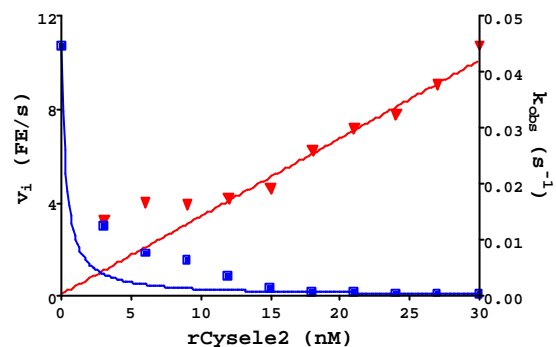
1A



1B



2A



2B

Abb.11: Inhibition von Papain durch rCysele1 und rCysele2. 0,223 mU / ml Papain wurden mit 10 μ M Substrat Z-Phe-Arg-AMC unter dem Zusatz von rCysele1 und rCysele2 im angezeigten Konzentrationsbereich über 5 min inkubiert. Die Fluoreszenz der Reaktionslösung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 360 / 440 nm gemessen. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C.

1A / 2A: Primärplot.

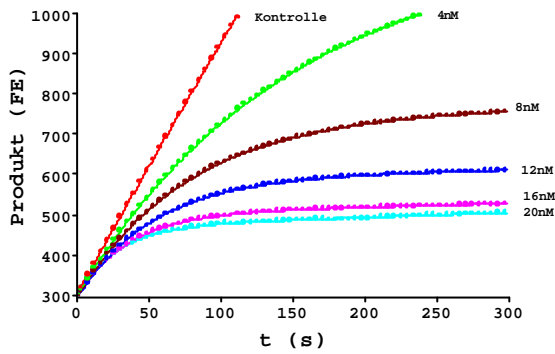
Punkte: Gegen die Zeit aufgetragene, gemessene Fluoreszenz der Reaktionslösung.

Linien: Kurven, aus den Primärdaten berechnet.

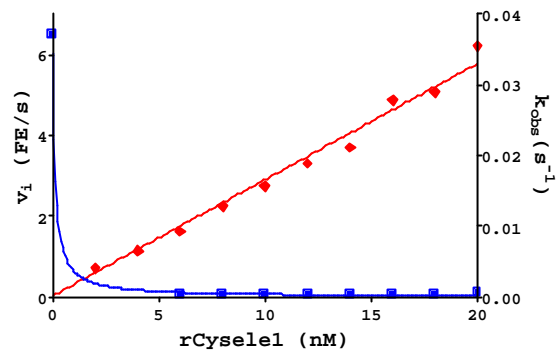
1B / 2B: Sekundärplot.

Aufgetragen sind die aus den Primärdaten errechneten Parameter v_i und k_{obs} über der Inhibitorkonzentration.

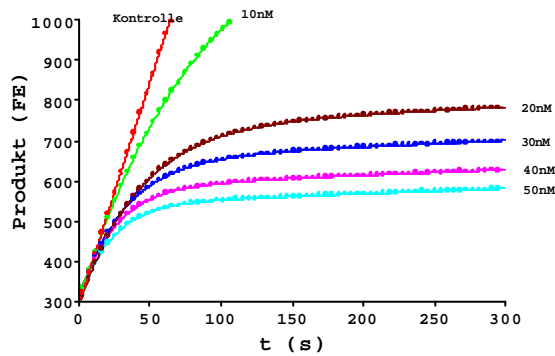
3.3.2. Inhibition von humanem Cathepsin L



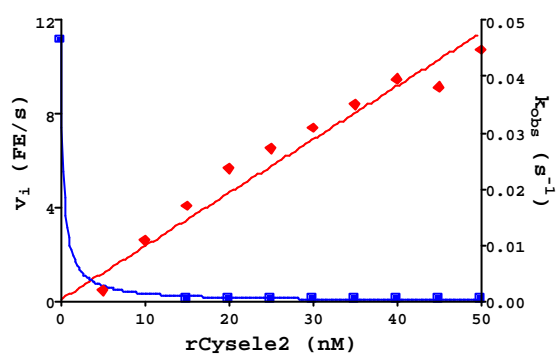
3A



3B



4A



4B

Abb.12: Inhibition von Cathepsin L durch rCysele1 und rCysele2. 0,095 mU / ml Cathepsin L wurden mit 10 μ M Substrat ZPhe-Arg-AMC unter dem Zusatz von rCysele1 und rCysele2 im angezeigten Konzentrationsbereich über 5 min inkubiert. Die Fluoreszenz der Reaktionslösung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 360 / 440 nm gemessen. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C.

3A / 4A: Primärplot.

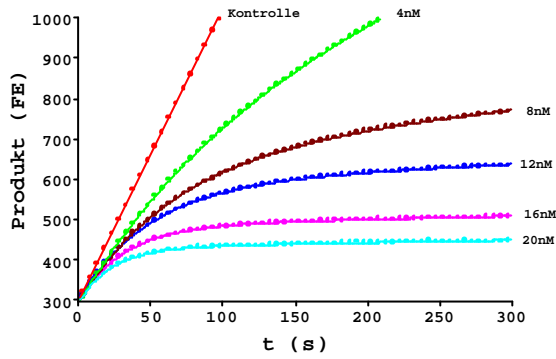
Punkte: Gegen die Zeit aufgetragene gemessene Fluoreszenz der Reaktionslösung.

Linien: Kurven, aus den Primärdaten berechnet.

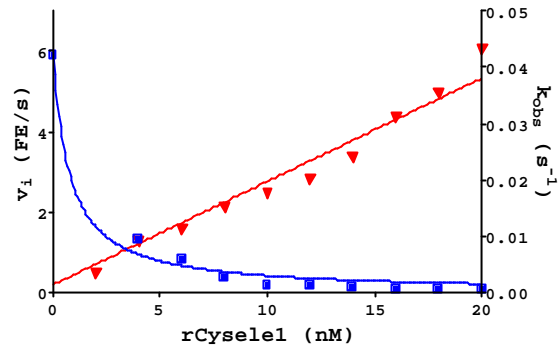
3B / 4B: Sekundärplot.

Aufgetragen sind die aus den Primärdaten errechneten Parameter v_i und k_{obs} über der Inhibitorkonzentration.

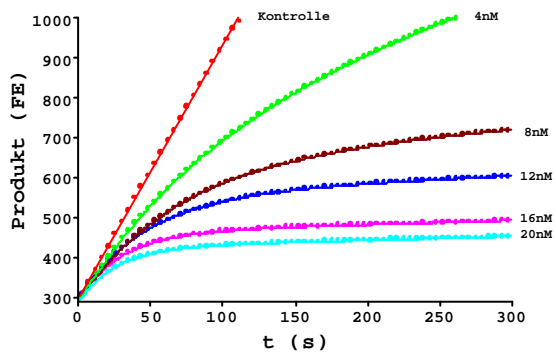
3.3.3. Inhibition von humanem Cathepsin S



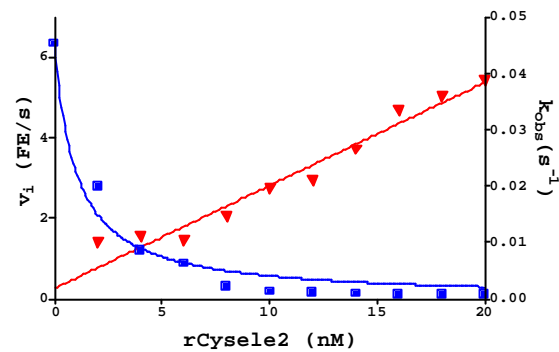
5A



5B



6A



6B

Abb.13: Inhibition von Cathepsin S durch rCysele1 und rCysele2. 5,25 nM Cathepsin S wurden mit 10 μ M Substrat Z-Val-Val-Arg-AMC unter dem Zusatz von rCysele1 und rCysele2 im angezeigten Konzentrationsbereich über 5 min inkubiert. Die Fluoreszenz der Reaktionslösung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 360 / 440 nm gemessen. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C.

5A / 6A: Primärplot.

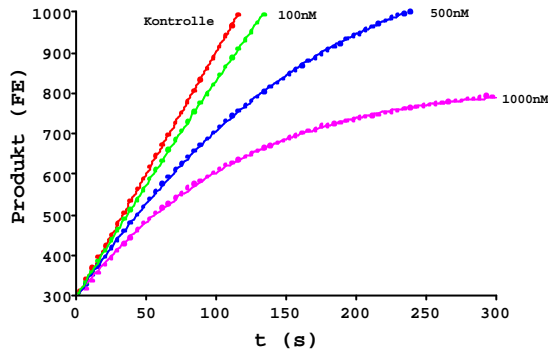
Punkte: Gegen die Zeit aufgetragene gemessene Fluoreszenz der Reaktionslösung.

Linien: Kurven, aus den Primärdaten berechnet.

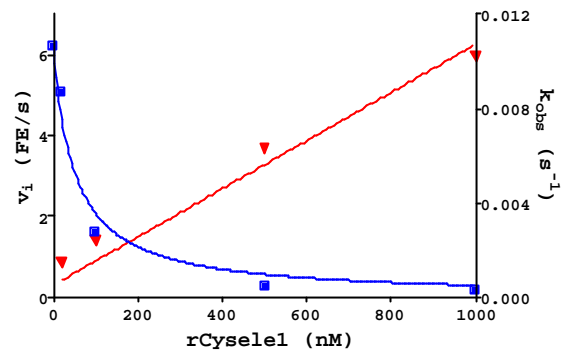
5B / 6B: Sekundärplot.

Aufgetragen sind die aus den Primärdaten errechneten Parameter v_i und k_{obs} über der Inhibitorkonzentration.

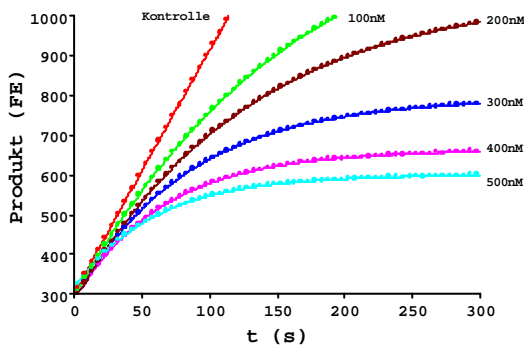
3.3.4. Inhibition von humanem Cathepsin B



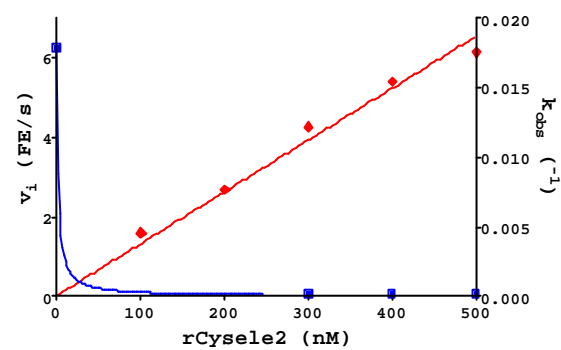
7A



7B



8A



8B

Abb.14: Inhibition von Cathepsin B durch rCysele1 und rCysele2. 117 nM Cathepsin B wurden mit 10 μ M Substrat Z-Arg-Arg-AMC unter dem Zusatz von rCysele1 und rCysele2 im angezeigten Konzentrationsbereich über 5 min inkubiert. Die Fluoreszenz der Reaktionslösung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 360 / 440 nm gemessen. Die Reaktionstemperatur betrug 37 °C.

7A / 8A: Primärplot.

Punkte: Gegen die Zeit aufgetragene gemessene Fluoreszenz der Reaktionslösung.

Linien: Kurven, aus den Primärdaten berechnet.

7B / 8B: Sekundärplot.

Aufgetragen sind die aus den Primärdaten errechneten Parameter v_i und k_{obs} über der Inhibitorkonzentration.

3.4. Immunologische Untersuchungen

3.4.1. Stimulation der induzierbaren Stickoxidsynthetase durch rCysele1 und rCysele2

Die induzierbare Stickoxidsynthetase (iNOS) von Mausperitonealmakrophagen (MPM) kann durch Cystatine stimuliert werden (Verdot et al., 1996; Hartmann et al., 2002). Deshalb wurden ebenfalls rCysele1 und rCysele2 auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der iNOS untersucht. Die iNOS setzt das Substrat L-Arginin mit Sauerstoff um, es entstehen L-Citrullin und Stickoxid (NO). Damit die gebildete Menge des leicht zerfallenden NO quantifiziert werden kann, wird NO in der sog. Griessreaktion in das stabile Produkt Nitrit umgewandelt. Der Gehalt an Nitrit im Überstand der MPM-Zellkultur kann anhand eines Farbumschlages im Photometer bestimmt werden und läßt auf die NO-Konzentration schließen.

Peritonealmakrophagen wurden aus BALB/c-Mäusen gewonnen und in einer Zahl von 2×10^5 Zellen je Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausplattiert und mit 100 U / ml IFN- γ stimuliert. rCysele1 und rCysele2, sowie rOv17 und rOv33 wurden in einer Konzentration von 0,05 μM ; 0,1 μM ; 0,25 μM und 0,5 μM hinzugefügt. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und mit Griessreagenz versetzt. Der Farbumschlag in den Überständen wurde im Photometer bei 560 nm bestimmt.

In Abb.15 ist das Ergebnis dargestellt. rCysele1, rCysele2 sowie rOv17 stimulierten die iNOS konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 0,1 μM rCysele1 wurde die NO-Produktion von 2,02 μM auf 4,37 μM gesteigert. Dies entspricht einer Steigerung um 124 % ($p = 0,001$). Unter Einfluß von 0,1 μM rCysele2 wurde eine Steigerung auf 2,78 μM (dies entspricht einer Erhöhung um 93,5 % ($p = 0,001$)) und unter Einfluß von 0,1 μM rOv17 auf 3,47 μM (dies entspricht einer Erhöhung um 115,3 % ($p = 0,001$)) gemessen. rOv33 stimulierte die Stickoxidsynthetase nicht.

Bei einer Konzentration von 0,5 μM rCysele1 wurde die NO-Produktion auf 8,52 μM gesteigert. Dies entspricht einer Steigerung um 224 % ($p = 0,001$). Unter Einfluß von 0,5 μM rCysele2 wurde eine Steigerung auf 4,06 μM (dies entspricht einer Erhöhung um 93,5 % ($p = 0,001$)) und unter Einfluß von 0,5 μM rOv17 auf 5,43 μM (dies entspricht einer Erhöhung um 115,3 % ($p = 0,001$)) gemessen.

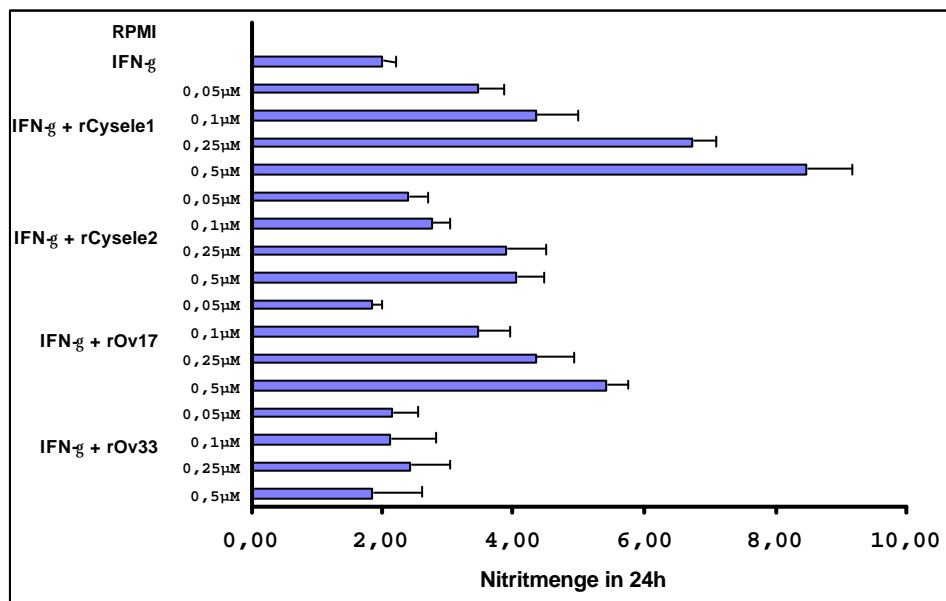


Abb.15 Stickoxidproduktion unter dem Einfluß von rCysele1 und rCysele2. MPM wurden *in vitro* mit 100 U / ml IFN- γ stimuliert und mit 0,05 μ M; 0,1 μ M; 0,25 μ M sowie 0,5 μ M rCysele1, rCysele2, rOv17 und rOv33 über 24 h inkubiert. Durch Griessreaktion wurde NO in Nitrit umgewandelt, der Nitritgehalt wurde im Photometer bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis, bei dem die MPM von einem Einzeltier genutzt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, die aus den Dreifachbestimmungen berechnet wurden.

3.4.2. Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die Proliferation von Mausmilzzellen

3.4.2.1. Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die Proliferation polyklonal stimulierter Milzzellen von BALB/c-Mäusen

Da rAv17, das rekombinante Cystatin der Nagetierfilarie *A. viteae*, die Proliferation von polyklonal stimulierten Mausmilzzellen inhibiert (Hartmann et al., 1997), wurde zum Vergleich der Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die ConA-stimulierte Proliferation von Milzzellen von BALB/c-Mäusen untersucht. Dazu wurden Mausmilzzellen gewonnen und in einer Zahl von $3,5 \times 10^5$ Zellen je Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausplattiert. rCysele1 und rCysele2, sowie rAv17 und rOv33 wurden in einer Konzentration von 0,25 μ M hinzugefügt. Die Zellen wurden mit ConA in einer Konzentration von 2 μ g / ml 72 h stimuliert. Gemessen wurde die Proliferation der Milzzellen über den Einbau von radioaktivmarkiertem 3 H-Thymidin. Die Ergebnisse sind in Abb.16 dargestellt.

rAv17 inhibiert im Durchschnitt die Proliferation der Mausmilzzellen um 63,5 % ($p = 0,001$). Im Gegensatz dazu haben rCysele1, rCysele2 und rOv33 keinen Einfluß auf die Proliferation.

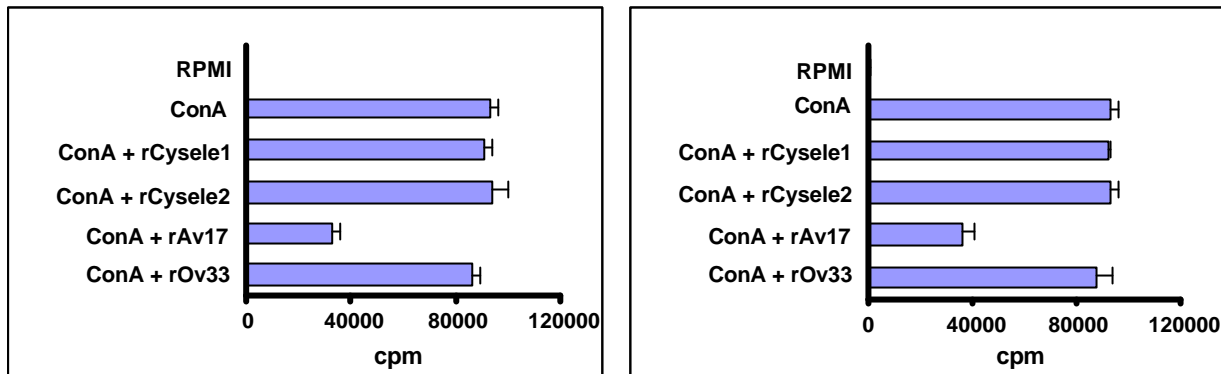


Abb.16: Proliferation von Milzzellen von BALB/c-Mäusen unter dem Einfluß von rCysele1 und rCysele2. Milzzellen einzelner BALB/c-Mäuse wurden *in vitro* mit 2 µg / ml Concanavalin A stimuliert und mit 0,25 µM rCysele1, rCysele2, rAv17 und rOv33 über 72 h inkubiert. Die Proliferation wurde über den Einbau von ³H-Thymidin während der letzten 20 h in die DNA der proliferierenden Zellen gemessen. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von Milzzellen von Einzeltieren. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung, die aus Dreifachbestimmungen berechnet wurden.

3.4.2.2. Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die Proliferation antigenspezifisch stimulierter Milzzellen von OvA-Mäusen

rCysele1 und rCysele2 beeinflussten die polyklonal stimulierte Proliferation von Mausmilzzellen nicht. In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß der rekombinanten *C. elegans*-Cystatine auf die antigenspezifische Proliferation von Milzzellen untersucht. Für eine antigenspezifische Proliferation wurden beispielhaft Ovalbumin-Rezeptor-transgene Mäuse (OvA-Mäuse) genutzt. Thymozyten und periphere T-Zellen dieser OvA-Mäuse exprimieren einen transgenetischen T-Zellrezeptor, der Hühner-Ovalbumin erkennt (Murphy et al., 1990). Dazu wurden Mausmilzzellen dieser Mäuse gewonnen und in einer Zahl von $3,5 \times 10^5$ Zellen je Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausplattiert. rCysele1 und rCysele2, sowie rAv17 und rOv33 wurden in einer Konzentration von 0,25 µM hinzugefügt. Die Zellen wurden mit Ovalbumin in einer Konzentration von 40 µM über 72 h stimuliert. Gemessen wurde die Proliferation der Milzzellen über den Einbau von radioaktivmarkiertem ³H-Thymidin. Die Ergebnisse sind in Abb.17 dargestellt.

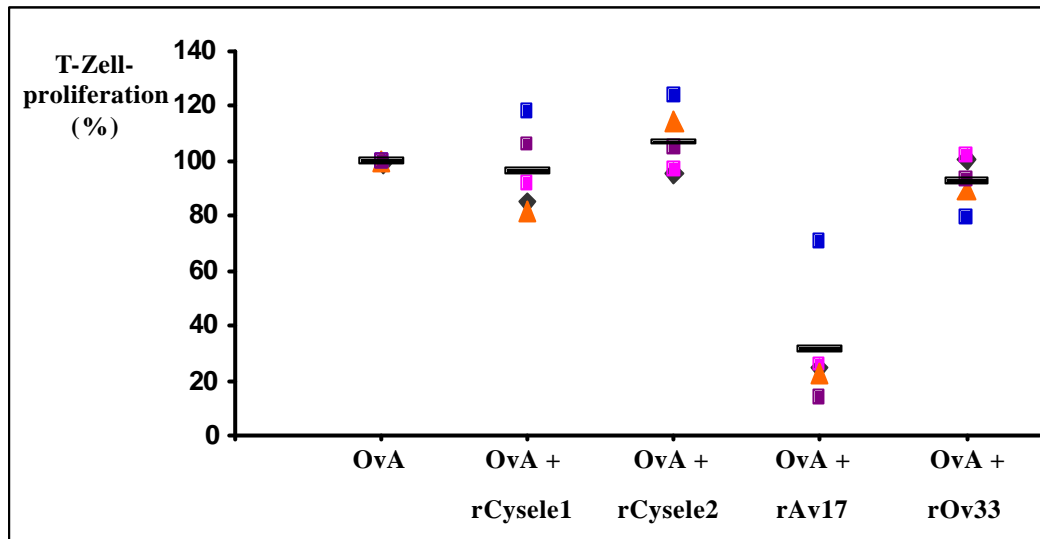


Abb.17: Proliferation von Milzzellen von OvA-Mäusen unter dem Einfluß von rCysele1 und rCysele2. Milzzellen einzelner OvA-Mäuse wurden *in vitro* mit 880 µg / ml Ovalbumin stimuliert und mit 0,25 µM rCysele1, rCysele2, rAv17 und rOv33 über 72 h inkubiert. Die Proliferation wurde über den Einbau von ³H-Thymidin während der letzten 20 h in die DNA der proliferierenden Zellen gemessen. Dargestellt sind die Proliferationswerte (%) in Bezug auf die OvA-Kontrolle. Gezeigt sind die Ergebnisse von 5 Einzeltieren. Die Querstriche kennzeichnen die Mittelwerte.

Die durch OvA stimulierte Proliferation der T-Zellen ohne Zusatz von Cystatinen entsprach 100 %. Gegenüber der OvA-Kontrolle inhibierte rCysele1 im Durchschnitt die Proliferation um 3,7 %, rAv17 um 68,4 % ($p = 0,01$), rOv33 um 7,16 %. rCysele2 stimulierte die Proliferation um durchschnittlich 7,22 %.

Wird das Kontrollprotein rOv33 als Bezugspunkt gewählt, stimulierte rCysele1 die Proliferation durchschnittlich um 5,9 % und rCysele2 um 17,5 %. rAv17 inhibierte die Proliferation im Durchschnitt um 64 % ($p = 0,01$).

3.4.3. Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die Proliferation humaner PBMC

3.4.3.1. Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die Proliferation polyklonal stimulierter, humaner PBMC

Da rOv17, das rekombinante Cystatin der humanpathogenen Filarie *O. volvulus*, die Proliferation von polyklonal stimulierten, humanen PBMC inhibiert (Schönemeyer et al.,

2001), wurde zum Vergleich der Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die anti-CD3-stimulierte Proliferation von humanen PBMC untersucht.

PBMC freiwilliger, gesunder Spender wurden aus humanem Blut durch Dichtegradzentrifugation mittels Ficoll gewonnen und in einer Zahl von $3,5 \times 10^5$ Zellen je Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausplattiert. rCysele1 und rCysele2, sowie rOv17 und rOv33 wurden in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ hinzugefügt. Die Zellen wurden mit anti-CD3-Antikörpern in einer Konzentration von 100 ng / ml über 72 h stimuliert. Gemessen wurde die Proliferation der PBMC über den Einbau von radioaktivmarkiertem ^3H -Thymidin. Die Ergebnisse sind in Abb.18 dargestellt.

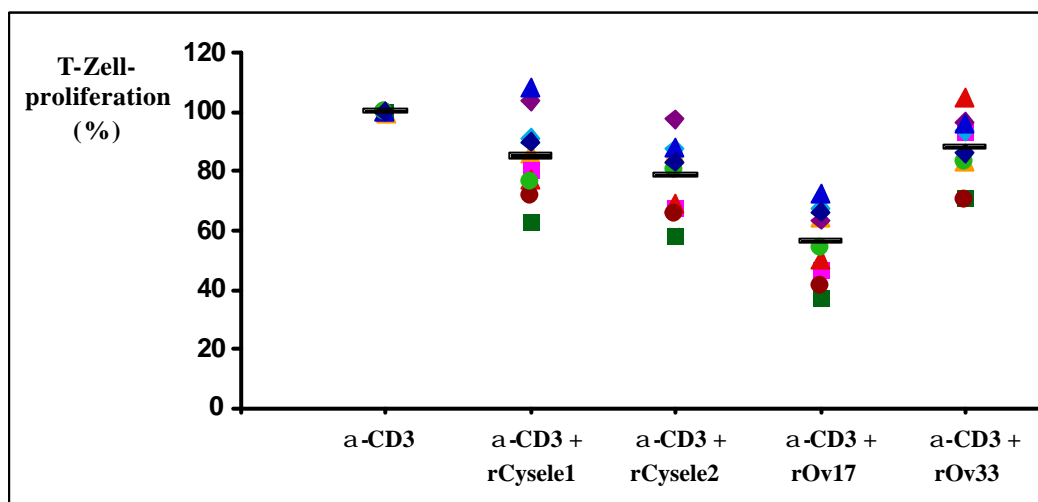


Abb.18: Proliferation von humanen PBMC unter dem Einfluß von rCysele1 und rCysele2. Humane PBMC wurden *in vitro* mit 100 ng / ml anti-CD3-Antikörpern stimuliert und mit $0,5 \mu\text{M}$ rCysele1, rCysele2, rOv17 und rOv33 über 72 h inkubiert. Die Proliferation wurde über den Einbau von ^3H -Thymidin während der letzten 20 h in die DNA der proliferierenden Zellen gemessen. Dargestellt sind die Proliferationswerte (%) in Bezug auf die anti-CD3-Antikörper-Kontrolle. Die Querstriche kennzeichnen die Mittelwerte der 10 untersuchten Spender.

rCysele1 inhibierte im Durchschnitt die Proliferation um $15,1 \%$ ($p = 0,05$), rCysele2 um $21,6 \%$ ($p = 0,001$), rOv17 um $43,6 \%$ ($p=0,001$) und rOv33 um $12,1 \%$ ($p = 0,01$) gegenüber der anti-CD3-Antikörper-Kontrolle. Wird das Kontrollprotein rOv33 als Bezugspunkt gewählt, inhibierte rCysele1 die Proliferation durchschnittlich um $3,2 \%$, rCysele2 um $10,4 \%$ ($p = 0,05$) und rOv17 um $35,8 \%$ ($p = 0,001$).