

**Entwicklung von rekombinanten attenuierten  
*Salmonella* Vakzinstämmen zur Immunprophylaxe  
von *Onchocerca volvulus* Infektionen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Biologie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Vorgelegt von

**Claus Lattemann**

aus Tübingen

1999



Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 1999

Dekan:

Prof. Dr. W. Wohlleben

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. T.F. Meyer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit wurde vom 1.8.1995 bis zum 30.3.1999 am Max-Planck-Institut für Biologie angefertigt.



Ich möchte allen danken, die am Gelingen dieser Arbeit ihren Anteil hatten.

Herrn Professor Dr. T.F. Meyer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in einem wissenschaftlich anspruchsvollen und fördernden Kontext, sowie für die stete Unterstützung des letzten Parasiten in Tübingen.

Herrn Professor Dr. V. Braun und Herrn Professor T. F. Meyer für die Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Herrn Dr. H. Apfel für die Betreuung während seiner Zeit in Tübingen und die fruchtbaren Diskussionen in der Zeit danach.

Für das angenehme Umfeld im Labor und drumherum bei Dr. Jochen Maurer, Arne Matzen, Dr. Ina Scheuerpflug, Anja Seubert, Ralf Schüle, Elke Freissler, Nalini Ramarao, Dirk Hofreuter, Dr. Christoph Dehio, Dr. Michaela Dehio, Mikki und Heiko Goller (für die Behebung von manchen Bugs), Marlene Röttgen, Andreas Popp, Dr. Willem van den Akker, Dr. Zeng-Xhin Yan, Günter Göser, Dr. Eckhard Fischer; Dr. Christa Lanz, Christian Gille, Markus Röger, Miriam Peters, Holger Löbner, Dr. Christof Hauck, Dr. Roland Barten, Dr. Roland Ryll, Dr. Wolfgang Fischer, Dr. Stefan Odenbreit, Dr. Joachim Jose, Christoph Daniel, Dr. Wilhelm Eisenbeiß, Dr. Uwe Wölk, Ana-Clara Mißlitz, Wolfgang Jost, Carola Scholz, Dr. Terry Kwock, Petra Münzner, Jochen Kocher, Uwe Kagels, Sylvia Dambrowski, Rose Jäger, Getrud Neumann, Ursel Wiedenig, Bärbel Zeller, Fred Mayer, Bozena Pichler-Brand, Solveig Hirschle, Anne Entian, Jürgen Zug.

Uwe Kagels für die exzellente Betreuung der Versuchstiere und Dr. Zeng-Xhin Yan für die Einführung in das Arbeiten mit Salmonellen.

Jochen und Anja haben sich ein Sonderlob für's Korrekturlesen (auch der Wille zählt, Jochen) und wissenschaftlichen Input verdient.

Meiner Mutter und meiner Schwester für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Céline für unzähliges Kleines und Großes.



---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Zielsetzung dieser Arbeit	6
<b>2</b>	<b>Amplifikation der Gesamt-mRNA von <i>ex-vivo</i> isolierten L3 von <i>A. viteae</i> durch RT-PCR</b>	<b>7</b>
2.1	Einleitung	7
2.2	Ergebnisse	8
2.3	Diskussion	13
2.4	Zusammenfassung	15
<b>3</b>	<b>Molekulare Charakterisierung der extrazellulären CuZn Superoxid Dismutase von <i>A. viteae</i></b>	<b>16</b>
3.1	Einleitung	16
3.1.1	Reaktive Metabolite von Sauerstoff und Stickstoff wirken zytotoxisch	16
3.1.2	Mechanismen zur Inaktivierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Intermediate	17
3.1.2.1	Enzymatische Mechanismen zur Neutralisierung von ROI und RNI	18
3.1.2.2	Nicht enzymatische Antioxidansmechanismen	20
3.2	Ergebnisse	21
3.2.1	Klonierung der cDNA der extrazellulären CuZn SOD von <i>A. viteae</i>	21
3.2.2	Expression der rekombinanten AVSOD2 in <i>E. coli</i>	25
3.2.3	Die AVSOD2 ist glykosyliert	25
3.2.4	Expression von AVSOD1 und AVSOD2 in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>A. viteae</i>	27
3.2.5	Humorale Immunantwort natürlich infizierter Gerbils gegen rAVSOD2	28
3.3	Diskussion	30
3.4	Zusammenfassung	34

<b>4</b>	<b>Immunogenität der rekombinanten AVSOD2 präsentiert durch einen attenuierten Lebendvakzinstamm von <i>S. typhimurium</i></b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.2.1	Subklonierung der rAVSOD2 in <i>aroA</i> attenuierten Vakzinstämmen von <i>S. typhimurium</i>	40
4.2.2	Expression der rAVSOD2 in <i>S. typhimurium</i>	41
4.2.3	Untersuchung der Stabilität von pLAT7 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	42
4.2.4	Der rekombinante <i>Salmonella</i> Lebendvakzinstamm SL3261::pYZ84/pLAT7 induziert eine spezifische humorale Immunantwort gegen die AVSOD2 in ora immunisierten Gerbils	44
<b>4.3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Antigenpräsentation an der Zelloberfläche attenuierter Vakzinstämme von <i>S. typhimurium</i> durch Autodispla</b>	<b>54</b>
<b>5.1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>54</b>
5.1.1	Proteinsekretion durch Gram-negative Bakterien	54
5.1.1.1	Sec-unabhängiger Expor	55
5.1.1.2	Sec-abhängiger Expor	57
5.1.1.3	Autodisplay oder Typ-IV Sekreti	57
5.1.2	Verfahren zur extrazellulären Präsentation rekombinanter Antigene durch attenuierte Vakzinstämme von <i>S. typhimurium</i>	58
5.1.2.1	Präsentation rekombinanter Antigene durch Ty -I und Typ-III Sekretion	58
5.1.2.2	Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche	59
<b>5.2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
5.2.1	Herstellung einer genetischen Fusion der AVSOD2 cDNA mit dem AIDA-I Autotransporter	61



---

5.2.2	Die Expression der AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteine in <i>E. coli</i> ist unabhängig vom <i>dsbA</i> Phänotyp	63
5.2.3	Die AVSOD2-Domäne von FP65 und FP67 wird auf der Oberfläche von <i>E. coli</i> präsentiert	64
5.2.4	Subzelluläre Lokalisierung der von FP67	65
5.2.5	Immunfärbung von oberflächenständigen FP65 und FP67	67
5.2.6	Prozessierung der AVSOD2-Domäne durch OmpT	68
5.2.7	Entwicklung eines in vivo induzierbaren Expressionssystems für AIDA-I Fusionsproteine in <i>S. typhimurium</i> Vakzinstämmen	70
5.2.8	Stabilität der AVSOD2-Expressionsvektoren in vivo	74
5.2.9	Vakzinierung mit FP68 exprimierenden <i>S. typhimurium</i> Vakzinstämmen induziert eine humorale Immunantwort in Gerbils und BALB/c	75
5.2.10	CTB induziert als Fusion mit AIDA-I eine spezifische humorale Immunantwort in Wüstenrennmäusen gegen Wildtyp CTB	79
<b>5.3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
<b>5.4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Export enzymatisch aktiver <math>\beta</math>-Laktamase auf die Zelloberfläche von <i>E. coli</i> durch Autodisplay</b>	<b>88</b>
<b>6.1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>88</b>
<b>6.2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>90</b>
6.2.1	Konstruktion eines Autodisplay-Vektors für $\beta$ -Laktamase	90
6.2.2	Die Außenmembran von FP77 exprimierenden Zellen ist intakt	93
6.2.3	Die oberflächenständige Bla ist enzymatisch aktiv	94
6.2.4	Kultivierungstemperatur und Substrat beeinflussen die Aktivität der oberflächenständigen Bla	96
6.2.5	Zytochrom C Reduktionstest zur Aktivitätsbestimmung der oberflächenständigen AVSOD2 in <i>E. coli</i> UT5600/pLAT25	97
<b>6.3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>98</b>
<b>6.4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>

<b>7</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>106</b>
<b>7.1</b>	<b>Bakterienstämme, Plasmidvektoren und Zellen</b>	<b>106</b>
7.1.1	Bakterienstämme	106
7.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>	106
7.1.3	Kultivierung von <i>H. pylori</i>	106
7.1.4	Plasmidvektoren	107
7.1.5	Zelllinie	107
<b>7.2</b>	<b>Versuchstier</b>	<b>107</b>
7.2.1	<i>Meriones unguiculatus</i>	107
7.2.2	BALB/c	107
7.2.3	<i>Ornithodoros moubata</i>	107
<b>7.3</b>	<b>Parasitologische Arbeitsmethoden</b>	<b>108</b>
7.3.1	Der Zyklus	108
7.3.2	Infestation von <i>O. moubata</i>	108
7.3.3	Bestimmung des Mikrofilarietiters im Blut patenter <i>M. unguiculatus</i>	108
7.3.4	Isolierung von adulten <i>A. viteae</i> aus <i>M. unguiculatus</i>	108
7.3.5	Isolierung von mL3 von <i>A. viteae</i> aus infestierten <i>O. moubata</i>	109
7.3.6	Isolierung postinfektiöser Larvenstadien von <i>A. viteae ex vivo</i> aus <i>M. unguiculatus</i>	109
7.3.7	Gewinnung des Kulturüberstands <i>in vitro</i> kultivierter adulter <i>A. viteae</i>	109
<b>7.4</b>	<b>Immunisierungen</b>	<b>109</b>
7.4.1	Bestimmung der <i>in vitro</i> Stabilität von Expressionsvektoren	109
7.4.2	Orale Immunisierung mit Salmonella Vakzinstämmen	110
7.4.3	Bestimmung der <i>in vivo</i> Stabilität von Expressionsvektoren	110
7.4.4	Immunisierung von BALB/c mit rekombinanter aufgereinigter AVSOD2	110
<b>7.5</b>	<b>Molekulargenetische Arbeitsmethoden</b>	<b>110</b>
7.5.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>A. viteae</i>	110
7.5.2	Schnellpräparation von Plasmid DNA durch alkalische Lyse	111

---

7.5.3	Isolierung genomischer DNA von <i>H. pylori</i>	111
7.5.4	Präparative Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	111
7.5.5	Isolierung von RNA aus <i>A. viteae</i>	111
7.5.6	Isolierung von RNA aus <i>E. coli</i>	112
7.5.7	Reverse Transkription	112
7.5.8	Fällung von DNA mit Ethanol und Isopropanol	113
7.5.9	Analytische Elektrophorese von DNA (TBE-Gelsystem)	113
7.5.10	Präparative Elektrophorese von DNA (TAE-Gelsystem)	113
7.5.11	Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen mit GeneClean (BIO101)	113
7.5.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	114
7.5.13	Verfahren zur Erstellung amplifizierter Gesamt-cDNA von <i>A. viteae</i>	114
7.5.14	Klonierung von PCR-Produkten	114
7.5.15	Southern Blot	115
7.5.16	Screening durch Kolonieblot	115
7.5.17	Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran	115
7.5.18	Detektion der gebundenen Sonde	116
7.5.19	Elution der gebundenen Sonde	116
7.5.20	Restriktionsverdau von chromosomaler und Plasmid-DNA	116
7.5.21	Zentrifugationsentsalzung (ZE) von DNA-Proben	116
7.5.22	Phenolextrakti	117
7.5.23	Dephosphorylierung des linearisierten Vektors	117
7.5.24	Ligation	117
7.5.25	Transformation von <i>E. coli</i>	117
7.5.25.1	Herstellung elektrokompetenter Zellen	117
7.5.25.2	Transformation durch Elektroporati	117
7.5.25.3	Herstellung kompetenter Zellen nach der RbC <sub>2</sub> -Methode	118
7.5.25.4	Transformation durch Hitzeschock	118
<b>7.6</b>	<b>Proteinbiochemische Arbeitsmethoden</b>	<b>118</b>
7.6.1	Herstellung von Wurmhomogenaten und -extrakten	118
7.6.2	Enzymatische Abspaltung von Kohlenhydraten	118
7.6.3	Herstellung von Ganzellysaten von <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>	119
7.6.4	Zellfraktionierung von <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>	119

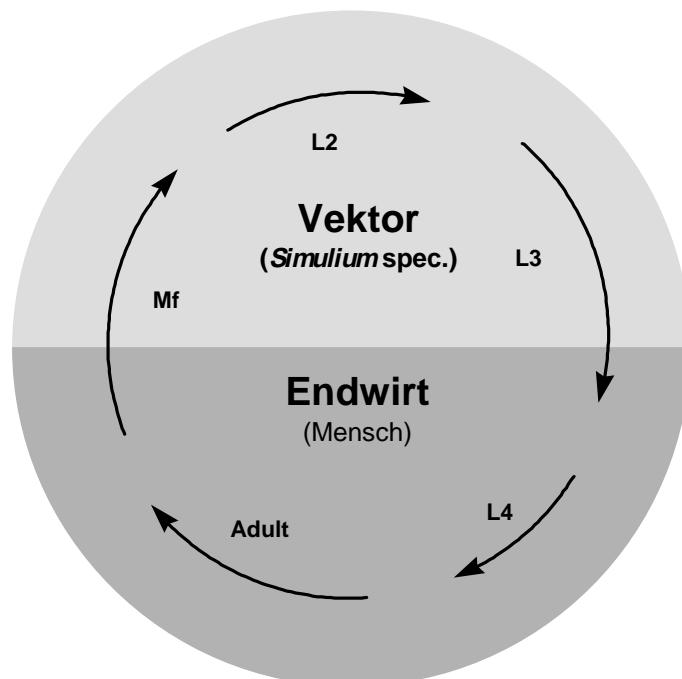
7.6.5	Abspaltung exponierter Proteindomänen von der Zelloberfläche Gram-negativer Bakterien	119
7.6.6	Bestimmung der Ganzzell Benzylpenizillinase-Aktivität von <i>E. coli</i>	119
7.6.7	Bestimmung der Ganzzell SOD-Aktivität von <i>E. coli</i>	119
7.6.8	SOD-Zymogra	120
7.6.9	Präparation rekombinanter Proteine aus Einschlußkörpern	120
7.6.10	Immunfluoreszenzfärbung von Bakterien	120
7.6.11	Immunfärbung physiologisch intakter Zellen	121
7.6.12	Trichloracetatfällung von Proteinen	121
7.6.13	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	121
7.6.14	Native PAGE	121
7.6.15	SDS-PAGE im Tricingelsystem	121
7.6.16	Färbung von Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue	122
7.6.17	Silberfärbung von Proteingelen	122
7.6.18	Western Blot	122
7.6.19	Immuno-Kolonieblot zum Nachweis rekombinanter Proteine	123
7.6.20	Absättigen von Antiseren	123
7.6.21	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	123
7.6.22	Kultur von Hybridomen	123
<b>7.7</b>	<b>Lösungen, Enzyme, Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial</b>	<b>123</b>
7.7.1	Medien für mikrobiologisches Arbeiten	123
7.7.2	Medium für die Zellkultur	124
7.7.3	Antibiotika und Zusätze	124
7.7.4	Lösungen für Agarosegelelektrophoresen	124
7.7.5	Lösungen für SDS-PAGE	124
7.7.6	Lösungen für native PAGE	124
7.7.7	Lösungen für Tricingele	125
7.7.8	Western Blot	125
7.7.9	Lösungen für die Silberfärbung	125
7.7.10	Lösungen für die Coomassie Färbung	125
7.7.11	Isolierung chromosomaler DNA von <i>A. viteae</i>	125
7.7.12	Plasmid-Schnellisolierung	125
7.7.13	Plasmid-Präparation und genomische bakterielle DNA (Qiagen)	125

	Inhalt	
7.7.14	RNA-Isolierung (saure Phenolextraktion)	126
7.7.15	RNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	126
7.7.16	Kolonieblot, Immuno-Kolonieblot:	126
7.7.17	Southern Blot	126
7.7.18	Detektion von gebunden Antikörpern in Southern Blot, Western Blot und ELISA	126
7.7.19	SOD-Zymogra	127
7.7.20	Oligonukleotide	127
7.7.21	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	127
7.7.22	Enzyme	127
7.7.23	Chemikalien	128
7.7.24	Geräte	128
7.7.25	Verbrauchsmaterial	129
7.7.26	Benutzte Software	129
<b>8</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>130</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>147</b>
<b>9.1</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>147</b>
<b>9.2</b>	<b>Parasitologische Abkürzungen</b>	<b>148</b>
<b>9.3</b>	<b>Schematische Darstellung der Primerbindestellen in der Sequenz von AVSOD1 und AVSOD2</b>	<b>148</b>
<b>9.4</b>	<b>Vollständige Aminosäuresequenz von FP67 und FP77</b>	<b>149</b>



# 1 Einleitung

Flußblindheit, hervorgerufen durch eine Infektion mit der Filarie *Onchocerca volvulus*, ist neben dem Trachom, das durch eine Infektion mit dem Bakterium *Chlamydia trachomatis* verursacht wird, die häufigste Ursache für Erblindung durch ein infektiöses Agens. In den tropischen und subtropischen Regionen Afrikas, Lateinamerikas und im Jemen sind über 17 MIO Menschen mit *O. volvulus* infiziert (World Health Organization, 1995). Filarien sind parasitäre Nematoden, deren infektiöses Stadium, die Drittstadienlarve (L3), von blutsaugenden Arthropoden während der Blutmahlzeit auf den Endwirt übertragen wird. Im Endwirt, stets ein Säugetier, entwickeln sich die übertragenen L3 innerhalb weniger Wochen, zwei Häutungen durchlaufend, zu den getrenntgeschlechtlichen Adultstadien. Adultwürmer von *O. volvulus* überleben durchschnittlich vierzehn Jahre im Endwirt (Plaisier *et al.*, 1991). Während dieses Zeitraums setzen die Weibchen Millionen von bis zu zwei Jahre lebenden Mikrofilarien (Mf) ab, die im subkutanen Bindegewebe zirkulieren.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von Filarien am Beispiel von *O. volvulus*.**

Die im Unterhautbindegewebe und der Cornea zirkulierenden Mf stellen das eigentliche pathologische Agens einer Infektion mit *O. volvulus* dar. Die Ursache für den Beginn der Pathogenese wird in einer inadäquaten Immunantwort gegen absterbende Mf gesehen (Ottesen, 1995; Ackerman *et al.*, 1990; Mackenzie *et al.*, 1987). Absterbende Mf induzieren die charakteristischen Symptome der Onchozerkose wie Dermatitis, Depigmentierung und

Atrophie der Haut, sowie Keratitis und Atrophie des Sehnervs (Murdoch, 1992; World Health Organization, 1995). Onchozerkose zeigt ein breites klinisches Spektrum, das von einer asymptomatischen Infektion bis hin zu stark pathologischen Manifestationen wie der Ausbildung der sogenannten Leopardenhaut reicht.

Die dauerhafte Persistenz von Adultwürmern und Mf im Endwirt bedingt effiziente Immunevasionsstrategien dieser Entwicklungsstadien, um die Immunantwort des Wirts zu neutralisieren. In Onchozerkomata, in der direkten Umgebung von Adultwürmern, wurden aktivierte eosinophile und neutrophile Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen sowie deren Dergranulationsprodukte auf der Wurmoberfläche nachgewiesen (Gallin *et al.*, 1995; Wildenburg *et al.*, 1996). Die Adultstadien von *O. volvulus* scheinen aber durch ihre Größe und Motilität sowie durch ihr mechanisch stark belastbares Exoskelett, die Kutikula, unempfindlich gegen den *oxidative burst* aktivierter Immuneffektorzellen zu sein. Die Kutikula von Filarien wird von der darunter lokalisierten synzytialen Hypodermis synthetisiert und besteht primär aus Kollagenen, deren Fibrillen über Tyrosinreste stark quervernetzt sind (Übersicht in Cox, 1992 und Maizels *et al.*, 1993a). Nach außen ist die Kutikula durch die trilaminare lipidreiche Epikutikula begrenzt, deren genaue Struktur jedoch noch unbekannt ist. Der Epikutikula ist lose eine karbohydratreiche Glykokalyx aufgelagert, die mechanisch leicht zu entfernen ist. An die Glykokalyx bindende Antikörper und Leukozyten können so mechanisch durch *antigen shedding* von der Oberfläche der Würmer abgestreift werden (Apfel und Meyer, 1990). Zusätzlich sind in die Glykokalyx Wirtskomponenten wie Serumalbumin eingelagert (Maizels *et al.*, 1984). Serumalbumin dient möglicherweise zur antigenen Maskierung der Filarienoberfläche und ist zudem ein effizienter *scavenger* für zweiwertige Kationen und kann so die Bildung des zytotoxischen Hydroxylradikals durch Haber-Weiss und Fenton Reaktion verhindern (Selkirk *et al.*, 1998). Darüber hinaus verfügen Filarien offenbar über ein komplexes Netzwerk an enzymatischen und nichtenzymatischen Mechanismen zu Neutralisierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite (Maizels *et al.*, 1993b; Selkirk *et al.*, 1998). Ferner sind immunsupprimierende, von Filarien sezernierte Proteine charakterisiert worden (Harnett und Harnett, 1993; Hartmann *et al.*, 1997; Pastrana *et al.*, 1998).

Bisher angewandte Strategien zur Kontrolle der Onchozerkose beruhen auf der medikamentösen Behandlung großer Bevölkerungsgruppen mit dem Medikament Mectizan (Wirkstoff Ivermectin, Molyneux und Davies, 1997), sowie der großflächigen Behandlung potentieller Brutgewässer von Simuliiden mit Insektiziden (Hougard *et al.*, 1997). Die Kombination beider Strategien führte zur signifikanten Reduzierung der Prävalenz von *O. volvulus* Infektionen in den Teilnehmerstaaten des *onchocerca control programs* (OCP) (Molyneux und Davies, 1997). Ivermectin hemmt die Motilität der Mf, worauf diese für das Immunsystem zugänglich und metabolisiert werden (Bennett *et al.*, 1988). Inzwischen treten



jedoch bei Nematoden vermehrt Resistenzen gegen Ivermectin auf (Prichard, 1994; Xu *et al.*, 1998).

Ansätze zur Immunprophylaxe von *O. volvulus* Infektionen begründen sich auf epidemiologischen Studien in für Onchozerkose endemischen Gebieten, die auf die Existenz natürlicher Immunität gegen *O. volvulus* hinweisen. So bleibt in Endemiegebieten die Anzahl der Adultwürmer in Infizierten trotz steter Re-Infektion relativ konstant (Albiez *et al.*, 1988). Ferner nimmt die Mikrofilariidermie bei mit *O. volvulus* infizierten Personen zwar bis zum zwanzigsten Lebensjahr zu, sinkt dann jedoch stetig ab (Duke und Moore, 1968). In hyperendemischen Gebieten mit hohem Transmissionspotential für *O. volvulus* wurden putativ immune (PI) Personen identifiziert, die trotz jahrelanger Exposition nachweislich nicht infiziert sind und demnach über spezifische Mechanismen verfügen müssen, die Infektion mit *O. volvulus* zu kontrollieren (Ward *et al.*, 1988; Gallin *et al.*, 1988; Boyer *et al.*, 1991; Tsang *et al.*, 1991; Elson *et al.*, 1994; Soboslay *et al.*, 1994). Wahl *et al.* (Wahl *et al.*, 1998) postulieren darüber hinaus, daß eine natürliche „heterologe Vakzinierung“ mit der zu *O. volvulus* nahe verwandten Rinderfilarie *O. ochengi* durch Simulium Arten, die sowohl *O. volvulus* als auch *O. ochengi* übertragen, einen weiteren Mechanismus für natürliche Immunität gegen *O. volvulus* darstellt.

Diese epidemiologischen Daten werden durch Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen für Filariosen bestätigt. Katzen, die wiederholt mit *Brugia pahangi* infiziert worden waren, wiesen eine konstante Parasitenlast auf (Denham *et al.*, 1983). Dies wurde auch für Gerbils (*Meriones unguiculatus*) nach wiederholter Infektion mit *Acanthocheilonema viteae* beobachtet (Barthold und Wenk, 1992). Vakzinierungsexperimente mit lebenden oder strahlungsattenuierten L3 führten in verschiedenen Tiermodellen zur signifikanten Verringerung der Rückfindungsrate von L3 einer Belastungsinfektion (Chusattayanond und Denham, 1986; Lucius *et al.*, 1986; Lucius *et al.*, 1991; Devaney *et al.*, 1993; Eisenbeiss *et al.*, 1994). Die Induktion einer protektiven Immunantwort gegen eine Belastungsinfektion war von der Inokulationsdosis (Barthold und Wenk, 1992; Lucius *et al.*, 1986) und von aktiver Proteinbiosynthese der postinfektiösen L3 abhängig (Weiss und Tanner, 1981; Lucius *et al.*, 1991; Eisenbeiss *et al.*, 1994; Lange *et al.*, 1993). Bei *A. viteae* wurde die sich zur L4 häutende postinfektiöse L3 als suszeptibles Stadium identifiziert (Eisenbeiss *et al.*, 1994). Diese Experimente zeigen, daß intrinsische Regelmechanismen bei Filarien existieren, die die Populationsdichte der Parasiten im Endwirt regulieren, und daß die postinfektiöse L3 eine zentrale Stellung in diesem Regelkreis einnimmt.

Nach der Übertragung der L3 in den Endwirt wurden komplexe Veränderungen in der Zusammensetzung der Filarienoberfläche beobachtet, die offenbar im Zusammenhang mit der Adaptation der postinfektiösen L3 an das neue Milieu stehen (Frank und Grieve, 1991;

Apfel *et al.*, 1992). In diesem Entwicklungszeitraum exprimiert die postinvasive L3 stadienspezifische Genprodukte, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Eliminierung der L3 in vor Re-Infektionen geschützten Tieren stehen (Matzen, 1994; Adam *et al.*, 1997; H. Apfel pers. Mitteilung).

Die Identifizierung protektiver Antigene von *O. volvulus* beruht auf der einen Seite auf rationalen Ansätzen, die aufgrund der biologischen Funktion, der Lokalisation *in vivo*, sowie der stadienspezifischen Expression eines Proteins dessen Potential zur Induktion einer protektiven Immunantwort abzuleiten versuchen. Nach erfolgter biochemischer oder immunologischer Charakterisierung der Genprodukte wurde die direkte Genklonierung angestrebt. Andererseits wurden *screening* Verfahren mit definierten Antiseren zur Durchmusterung von *O. volvulus* Expressionsbibliotheken entwickelt (Henkle-Dührsen, 1997). Differentielles Immunoscreening von *O. volvulus* L3 Expressionsbibliotheken führte zur Identifizierung von cDNA Klonen, die spezifisch durch Seren von Tieren, die mit attenuierten L3 vakziniert worden waren, nicht aber von Seren infizierter Tiere erkannt wurden (Li *et al.*, 1991; Lustigman *et al.*, 1991; Abdel-Wahab *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurden weitere potentiell protektive Antigene durch differentielles Immunoscreening mit Seren von PI Individuen identifiziert, die immun gegen eine Infektion mit *O. volvulus* sind (S. Lustigman, pers. Mitteilung; Rokeach *et al.*, 1994; Tree *et al.*, 1995; Erttmann *et al.*, 1996). Durch die sogenannten rationalen Ansätze wurden verschiedene Antigene mit potentiell immunprophylaktischer Wirkung, zum Teil aufgrund hoher Sequenzidentität zu bereits charakterisierten Genen anderer Pathogene, identifiziert und charakterisiert. Zu diesen Antigenen gehört eine Reihe von Antioxidansenzymen (Selkirk *et al.*, 1998). Ein stadienspezifisch exprimiertes immundominantes *A. viteae* L3 Antigen konnte durch aminoterminaler Sequenzierung als Chitinase identifiziert werden (Adam *et al.*, 1997).

Das immunprophylaktische Potential dieser und weiterer Antigene wurde in Tiermodellen überprüft. Das einzige zur Verfügung stehende Tiermodell für die humanpathogene Filarie *O. volvulus*, in dem sich die postinfektiöse L3 zu fertilen Adultwürmern entwickelt, ist der Schimpanse, da sich *O. volvulus* durch eine hohe Wirtsspezifität auszeichnet. Aus diesem Grund werden Surrogatwirtssysteme und Tiermodelle herangezogen, die unter Laborbedingungen zu handhaben sind. Als immunologisch gut charakterisiertes Surrogatwirtssystem wird der Labormausstamm BALB/c herangezogen. *O. volvulus* L3 können in BALB/c in subkutan implantierten Diffusionskammern kultiviert werden, entwickeln sich in dort allerdings nur zur L4 (Abraham *et al.*, 1992). Die Kleinsäugerfilarie *A. viteae* und ihr natürlicher Endwirt *M. unguiculatus* stellen ein natürliches Parasit-Wirt-System dar und gelten aufgrund der hohen antigenen Homologie von *A. viteae* zu *O. volvulus* (Nogami *et al.*, 1986) und der Möglichkeit zur Isolierung aller

Entwicklungsstadien von *A. viteae ex vivo* aus dem infizierten Endwirt (Eisenbeiss *et al.*, 1991) als anerkanntes Modellsystem für Onchozerkose (Lok und Abraham, 1992).

Die meisten der getesteten potentiellen Antigene von *O. volvulus* und *A. viteae* zeigten im *A. viteae* / *M. unguiculatus* System oder im BALB/c-Kammer-Modell keine protektive Wirkung oder waren nur in einem der beiden Systeme protektionsvermittelnd (Lucius, 1995; Abraham, 1995) . Lediglich OvB20, ein durch differentielles Immunoscreening identifiziertes, von larvalen *O. volvulus* Stadien exprimiertes Genprodukt unbekannter Funktion (Abdel-Wahab *et al.*, 1996) war zu 40 % im BALB/c Modell (Abraham, 1995) und zu 20 % bis 60 % im *A. viteae* / *M. unguiculatus* System protektiv (Lucius, 1995; Taylor *et al.*, 1995) und stellt daher einen potentiellen Kandidaten für eine *O. volvulus* Vakzine dar.

## **1.1 Zielsetzung dieser Arbeit**

Eine potentielle Vakzine gegen *O. volvulus* sollte gegen die postinfektiöse L3 gerichtet sein um die Entwicklung des Parasiten zu den Adultstadien zu verhindern (Henkle-Duhrsen, 1997). Antioxidansenzyme scheinen einen wichtigen Anteil an den Immunevasionsstrategien der L3 von Filarien zu besitzen (Matzen, 1994; Lu *et al.*, 1998) und gelten daher als potentielle Angriffspunkte für eine Vakzine gegen *O. volvulus* (Maizels *et al.*, 1993b; Selkirk *et al.*, 1998). Zielsetzung dieser Arbeit war die molekularbiologische Charakterisierung eines Homologs eines potentiellen Vakzinkandidaten für eine *O. volvulus* Vakzine im *A. viteae* / *M. unguiculatus* System, der extrazellulären CuZn Superoxid Dismutase von *A. viteae* (AVSOD2) (Kapitel 3). Des weiteren sollten die immunprophylaktischen Eigenschaften der AVSOD2 in einer Vakzine gegen eine *A. viteae* Infektion im Tiermodell überprüft werden. Als neuartiger Ansatz zur Kontrolle von Filarieninfektionen sollte die Effizienz der Immunstimulation eines attenuierten, rekombinante AVSOD2 exprimierenden *Salmonella typhimurium* Vakzinstantams untersucht werden (Kapitel 4). Ferner sollten alternative Strategien zur Identifizierung neuer protektiver Antigene (Kapitel 2), zur Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche von *Salmonella* Vakzinstämmen durch Autodisplay (Kapitel 5) sowie weitere, biotechnologische, Anwendungen von Autodisplay (Kapitel 6) erarbeitet werden.

## **2 Amplifikation der Gesamt-mRNA von ex-vivo isolierten L3 von *A. viteae* durch RT-PCR**

### **2.1 Einleitung**

Filarien werden von blutsaugenden Arthropoden während der Blutmahlzeit auf den Endwirt übertragen. Obwohl dieser Zeitraum einen wichtigen Schritt im Entwicklungszyklus von Filarien darstellt, ist nur wenig über die Adaptationsmechanismen der postinvasiven L3 und die zu Grunde liegenden Genprodukte bekannt (Frank und Grieve, 1991; Apfel *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996; Blaxter *et al.*, 1996). Eisenbeiß *et al.* konnten 1994 zeigen, daß die postinvasive L3 von *A. viteae* in wiederholt infizierten Gerbils das Ziel einer protektiven, vermutlich humoralen, Immunantwort ist (Eisenbeiß *et al.*, 1994). Dies läßt darauf schließen, daß die protektionsvermittelnden Antigene kurz nach der Übertragung des Parasiten in den Endwirt exprimiert werden. In der Tat konnten immundominante, stadienspezifisch von der postinvasiven L3 von *A. viteae* exprimierte Antigene beschrieben werden (H. Apfel, persönliche Mitteilung; Adam *et al.*, 1997) die vermutlich in engem Zusammenhang mit der Inaktivierung der postinvasiven L3 während der Häutung zur L4 stehen.

Die Analyse stadienspezifisch regulierter Gene von Filarien wird durch die geringe Anzahl postinvasiver L3 erschwert, die aus infiziertem Wirtsgewebe isoliert werden können. Die RNA Menge, die aus einer postinvasiven L3 isoliert werden kann, beträgt extrapoliert in etwa 5 ng Gesamt RNA pro Larve (Martin *et al.*, 1995), was den Einsatz konventioneller Techniken zur Herstellung von cDNA-Bibliotheken ausschließt. Die konventionelle Herstellung einer cDNA-Bibliothek erfordert eine Menge von mehreren Mikrogramm aufgereinigter polyadenylierter RNA. Die Amplifikation von Gesamt cDNA wurde 1989 von Belyavsky *et al.* erstmals beschrieben (Belyavsky *et al.*, 1989). Bei diesem Verfahren wurde eine homopolymere Sequenz (z.B. oligo dG) durch das Enzym terminale Transferase an das 3'-Ende der Erststrang cDNA synthetisiert. In einem darauf folgenden PCR Schritt wurde diese modifizierte Erststrang cDNA mit komplementären Primern zum poly A Schwanz und zur oligo dG Sequenz durch PCR amplifiziert.

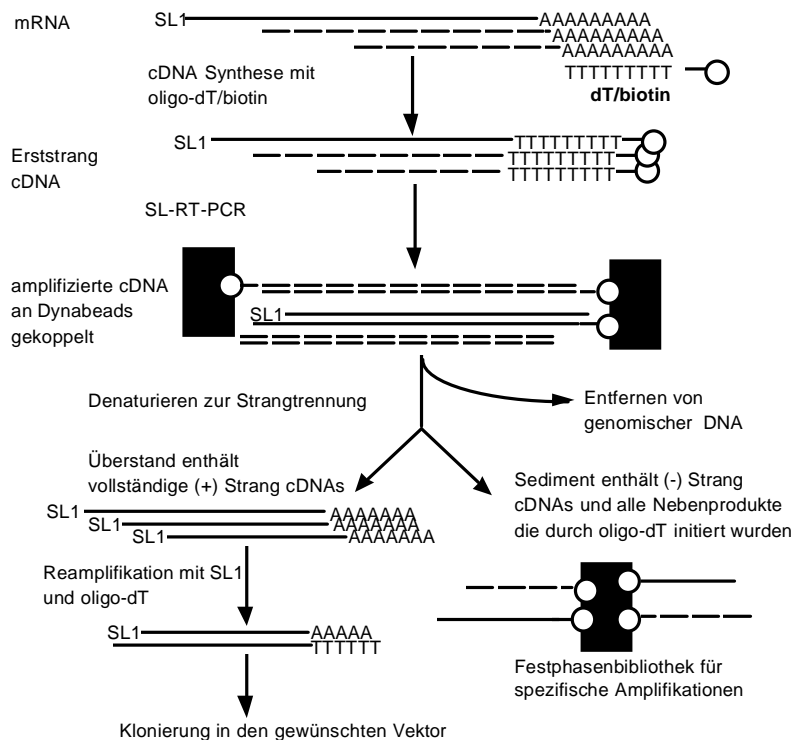
Die Amplifikation von Gesamt cDNA von Nematoden wird durch eine Konsensus-Sequenz, die am 5' Ende der meisten mRNAs lokalisiert ist, erleichtert. Dieser 22 nt lange sogenannte *spliced leader1* (SL1) wird durch den Vorgang des Trans-Spleißens an das 5' Ende eines Großteils der mRNAs von *Caenorhabditis. elegans* (Krause und Hirsh, 1987) und etwa 80-

90% der mRNAs von parasitischen Nematoden gekoppelt (Maroney *et al.*, 1995; Nilsen, 1995). Bei *C. elegans* wurden zusätzliche *spliced leader* identifiziert, deren biologische Funktion noch unklar ist (Nilsen, 1995). Die SL1 RNA besteht aus einem 22 nt langem Exon, das auf die Rezipienten mRNA transferiert wird, und einem etwa 80 nt langem Intron, das in allen Spezies eine stark konservierte Sekundärstruktur aufweist. In allen bisher untersuchten Nematoden liegt das Gen für die SL1 RNA zwischen den *repeats* der 5S rRNA Gene (Nilsen, 1993). Diese strukturelle Besonderheit der mRNAs von Nematoden ermöglicht die spezifische Amplifikation vollständiger cDNA Moleküle mit einem von der SL1-Sequenz abgeleiteten, und einem oligo dT Primer (SL-RT-PCR), während konventionelle Amplifikationsmethoden nicht zwischen der Amplifikation vollständiger und unvollständiger Transkripte diskriminieren.

## **2.2 Ergebnisse**

Das Verfahren der SL-RT-PCR wurde bereits zur Amplifikation von Gesamt cDNA verschiedener Entwicklungsstadien von Filarien eingesetzt (Henkle-Duhrsen *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1995; Blaxter *et al.*, 1996). Die Anwendung der dieses Verfahrens Gesamt cDNA von *A. viteae* Weibchen resultierte in eine Vielzahl von aberranten PCR-Produkten, die sowohl am 5' als auch am 3' Ende den oligo dT Primer trugen (Lattermann, 1995). Um diese fehlerhaften PCR-Produkte aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde ein Verfahren zur Aufreinigung korrekter Amplifikationsprodukte der SL-RT-PCR entwickelt (Abbildung 2.1). Für die reverse Transkription wurde ein am 5' Ende biotinyliertes Oligonukleotid (HA9) verwendet. Anschließend wurde die erhaltene Erststrang-cDNA einer Primär-Amplifikation über 15 Zyklen durch SL-RT-PCR mit dem SL1-spezifischen Primer HA14 und HA9 unterzogen. Die entstandenen PCR-Produkte wurden über das Biotinmolekül an HA9 an ein Konjugat von Streptavidin und paramagnetischen Partikeln (Streptavidin-Dynabeads-M280, Dynal) gekoppelt und sedimentiert. Kontaminierende genomische DNA wurde durch mehrmaliges Waschen der gekoppelten PCR-Produkte entfernt. Im Anschluß wurden die Amplifikationsprodukte denaturiert, so daß die (+) Stränge der amplifizierten cDNAs aus dem Überstand isoliert werden konnten, während durch den oligo dT Primer initiierte Fehlprodukte an den Dynabeads gekoppelt blieben. Die aufgereinigten (+) Stränge der Gesamt-cDNA wurden über 25 Zyklen mit HA14 und einem zweiten nicht biotinmarkierten oligo dT Primer HA15 reamplifiziert. Der Aufreinigungsschritt mit Streptavidin-Dynabeads stellt sicher, daß einerseits chromosomale DNA effizient aus dem Reaktionsansatz entfernt wird und andererseits alle durch den oligo dT Primer initiierten Fehlprodukte der PCR nach der ersten Amplifikation an der Affinitätsmatrix

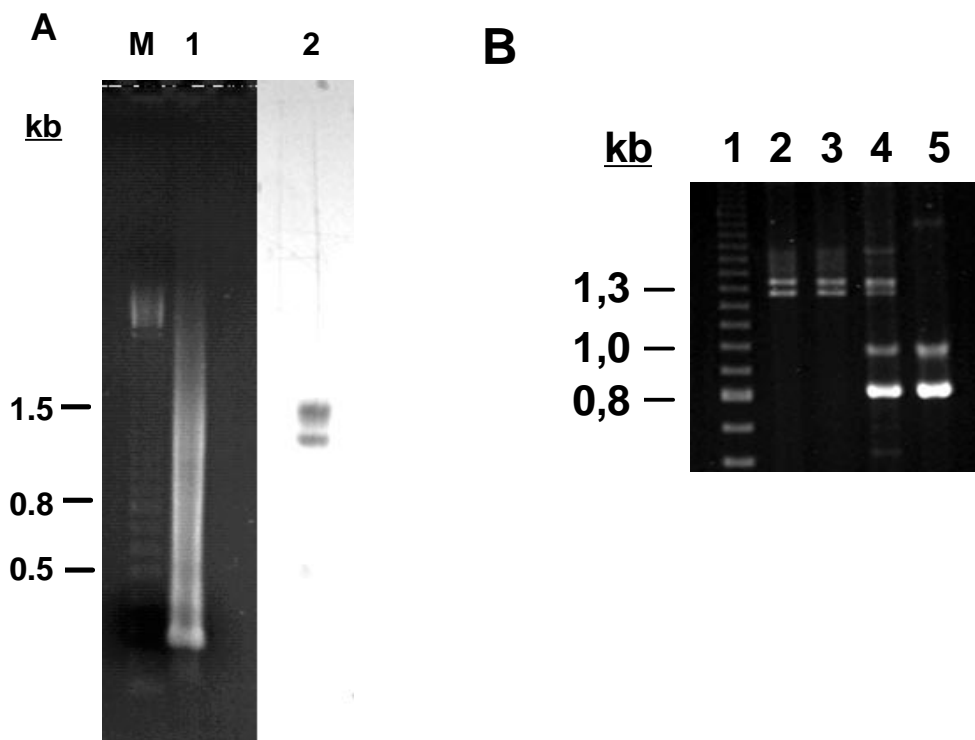
gebunden bleiben, und so nicht mit korrekt amplifizierten cDNAs während der Reamplifikation konkurrieren können.



**Abbildung 2.1: Verfahren zur Amplifikation von Gesamt-mRNA von Nematoden durch PCR.** Erwünschte Produkte der SL-RT-PCR sind als durchgezogene Linien, unerwünschte Nebenprodukte durch gestrichelte Linien dargestellt. Weitere Erklärungen im Text.

Mit diesem verbesserten Verfahren für die SL-RT-PCR wurde cDNA von *A. viteae* Weibchen amplifiziert. Etwa 1-2 µg Gesamt RNA wurden für die reverse Transkription eingesetzt, dies entspricht bei einem mRNA Anteil von 2 - 5 % an der Gesamt RNA ungefähr 10 bis 30 ng poly A+ RNA. Anschließend wurde der primäre PCR-Zyklus mit 0,2 ng Erststrang cDNA als Matrix durchgeführt und die amplifizierte cDNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe des überwiegenden Teils der Amplifikate betrug zwischen 0,25 und 2,5 kb (Abbildung 2.2A). Die Qualität der amplifizierten cDNA wurde durch eine Southern Blot Analyse überprüft, in der die Aktin cDNA als Marker verwendet wurde. Die hierzu verwendete Oligonukleotidsonde HA5 wurde aus dem zweiten Exon des *aktin1a* Gens der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* (Zeng und Donelson, 1992) abgeleitet. Im Southern Blot hybridisierte die Sonde HA5 spezifisch mit zwei cDNA Fragmenten von 1,35 beziehungsweise 1,65 kb. Sehr wahrscheinlich handelt es sich hierbei um die vollständigen cDNAs von Aktin 1 und Aktin 2, die sich bei *O. volvulus* im nicht translatierten 3' Bereich unterscheiden. Partielle oder multimerer Amplifikationsprodukte der cDNAs von Aktin konnten im Southern Blot nicht nachgewiesen

werden. Zusätzlich zur Southern Blot Analyse wurde eine für Aktin spezifische analytische PCR mit amplifizierter *A. viteae* cDNA als Matrix durchgeführt. Hierzu wurden die Oligonukleotidprimer HA18 (+) und HA19 (-) verwendet, die aus dem zweiten beziehungsweise fünften Exon des *aktin1A* Gens von *O. volvulus* abgeleitet wurden. Mit *A. viteae* cDNA als Matrix entsteht ein 810 bp großes Amplifikationsprodukt, während die Amplifikation genomischer *A. viteae* DNA zwei 1,25 bzw 1,35 große Produkte ergibt. Die Überprüfung der amplifizierten cDNA von *A. viteae* Weibchen durch die aktinspezifische PCR resultierte in dem cDNA spezifischen Amplifikationsprodukt. Fehlprodukte der SL-RT-PCR konnten auf diese Weise nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

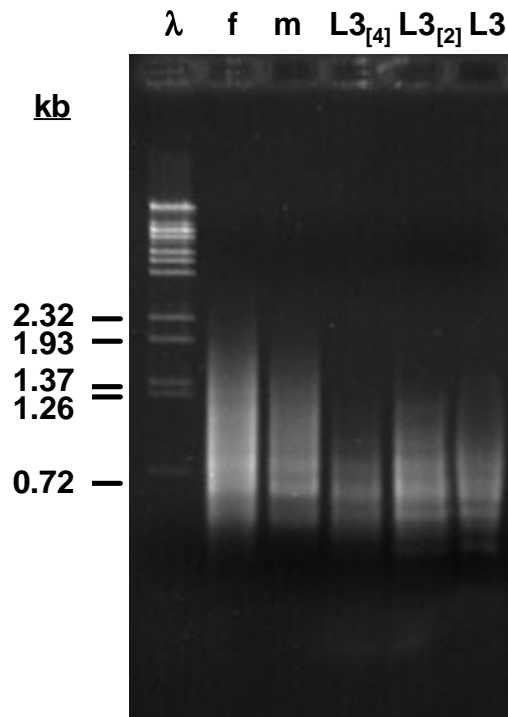


**Abbildung 2.2.: Amplifikation von Gesamt mRNA von *A. viteae* Weibchen und Mf.** Die Gesamt mRNA von *A. viteae* Weibchen und Mf wurde, wie in Abbildung 2.1 dargestellt, durch SL-RT-PCR amplifiziert. (A) Spur 1: Ethidium Bromid gefärbtes Agarosegel mit amplifizierter cDNA von *A. viteae* Weibchen. Spur 2: Southern Blot von Spur 1, hybridisiert mit der aktinspezifischen Oligonukleotidsonde HA5. (B). Ethidium Bromid gefärbtes Agarosegel mit Produkten einer Kontroll-PCR mit HA18 und HA19 mit den verschiedenen Zwischenprodukten der SL-RT-PCR von Mf mRNA als Matrix. Spur 1: 100 bp Leiter; Spur 2: genomische DNA von *A. viteae*; Spur 3: Mf Erststrang cDNA; Spur 4: Primäramplifikation von Mf cDNA; Spur 5: Aufgereinigtes Endprodukt der SL-RT-PCR.

Zur Überprüfung der Effizienz dieser Methode wurde Gesamt RNA von *A. viteae* Mf amplifiziert, die mit genomischer DNA verunreinigt war. Die Zwischenprodukte einer SL-RT-PCR dieser RNA-Präparation wurden durch die Kontroll-PCR mit dem aktinspezifischen Primerpaar HA18/HA19 überprüft (Abbildung 2.2B). Nach der reversen Transkription konnten in der Erststrang cDNA durch die Kontroll-PCR nur Aktin Produkte nachgewiesen



werden, die von genomischer DNA herrührten (Spur 3). Nach der Primäramplifikation der Erststrang cDNA konnten in der amplifizierten cDNA Aktinfragmente nachgewiesen werden, die sowohl chromosomalen Ursprungs als auch cDNA-spezifisch waren (Spur 4). Nach der Aufreinigung der amplifizierten (+) Strang cDNA durch Streptavidin-Dynabeads und anschließender Reamplifikation war keine Kontamination genomischer DNA mehr nachzuweisen (Spur 5).



**Abbildung 2.3: Amplifikation von Gesamt-mRNA larvaler Stadien von *A. viteae*.** Gesamt RNA wurde aus *A. viteae* Weibchen (f); Männchen (m), L3, L3<sub>[2]</sub> und L3<sub>[4]</sub> isoliert und einer SL-RT-PCR unterzogen. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidium-Bromid angefärbt.

Um stadienspezifische cDNA Pools aus *ex vivo* isolierten L3 zu generieren, wurden metazyklische L3 aus dem Zwischenwirt *O. moubata* sowie postinfektiöse Larvenstadien zwei Tage beziehungsweise vier Tage nach der Infektion aus dem Gewebe infizierter Gerbils isoliert. Die Gesamt RNA wurde aus jeweils 200 mL3, 150 L3<sub>[2]</sub> und 100 L3<sub>[4]</sub> isoliert und direkt für die cDNA Synthese eingesetzt. Für die Primäramplifikation der SL-RT-PCR wurde 1/5 der synthetisierten cDNA eingesetzt, was extrapoliert im Falle der L3<sub>[4]</sub> der cDNA-Menge entspricht, die aus 20 *ex vivo* isolierten Larven gewonnen werden kann. Pro L3 können in etwa 5 ng Gesamt RNA isoliert werden (Martin *et al.*, 1995). Folglich entspricht die Menge, der für die SL-RT-PCR eingesetzten Gesamt RNA in etwa 200 ng. Die SL-RT-PCR Produkte der Gesamt RNA von *A. viteae* Weibchen, Männchen, mL3, L3<sub>[2]</sub> und L3<sub>[4]</sub> wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidium-Bromid angefärbt (Abbildung 2.3).

Gesamt cDNA konnte demnach effizient aus geringsten Mengen biologischen Materials amplifiziert werden. Die Größenverteilung der cDNA Moleküle in den jeweiligen Pools der amplifizierten Gesamt cDNAs der Drittstadienlarven reicht von 0,3 bis etwa 2 kb. Die amplifizierten cDNAs wurden über in den Primern HA14 und HA15 integrierte *Bam* HI und *Pst* I Schnittstellen in pBluescript (Stratagene) und den Expressionvektor pYZT7 kloniert. pYZT7 ist ein Derivat von pRSET (Invitrogen) das keine Hintergrundexpression des Fremdantigens aufweist (Z.X. Yan pers. Mitteilung). Mit den Ligationsansätzen wurde *E. coli* Dh5 $\alpha$  oder der Expressionsstamm *E. coli* Dh5 $\alpha$ ::pYZ88 (Yan *et al.*, 1997) transformiert. Die Nukleinsäuresequenzen sechs zufällig ausgewählter Klone wiesen offene Leserahmen mit einer Durchschnittsgröße von 450 bp auf. In allen cDNAs konnte ein Start- und Stopkodon, sowie ein 3' nicht translatierter Bereich identifiziert werden. Die Insertion der cDNAs in den Vektor pYZT7 erlaubte die Identifikation von *E. coli* Klonen, die *A. viteae* cDNAs exprimierten. Dies wurde durch ein aminoterminales Reporter-Epitop RGSHis<sup>6</sup> erreicht, das in pYZT7 kodiert wird und in dessen Leserahmen die amplifizierten cDNAs fusioniert wurden.



**Abbildung 2.4: Expression von *A. viteae* cDNAs in *E. coli* Dh5 $\alpha$ ::pYZ88.** Die amplifizierte cDNA von *A. viteae* Weibchen wurde mit *Bam* HI und *Pst* I hydrolysiert und in den entsprechend vorbereiteten Expressionsvektor pYZT7 inseriert. Klone, die ein rekombinantes *A. viteae* Protein exprimierten wurden durch Immuno-Kolonieblot identifiziert und durch Western Blot mit dem monoklonalen  $\alpha$ His-Tag Antikörper untersucht.

Die Überprüfung der erhaltenen rekombinanten *E. coli* Dh5 $\alpha$ ::pYZ88 Klone im Immuno-Kolonieblot mit einem monoklonalen Antikörper, der diesen His-Tag bindet, führte zur Isolierung rekombinanter Klone, die *A. viteae* cDNAs exprimierten (nicht gezeigt). Der Anteil der im Immuno-Kolonieblot reagierenden Klone betrug etwa 10 %. Zwölf auf zufälliger Basis ausgewählte Klone wurden einer weiteren Analyse durch Western Blot mit dem His-Tag spezifischen Antikörper unterzogen (Abbildung 2.4). Die Größenverteilung der

rekombinanten *A. viteae* Proteine reicht von etwa 10 kDa bis 34 kDa, das durchschnittliche Molekulargewicht dieser Proteine beträgt etwa 20 kDa.

## 2.3 Diskussion

Diese Daten belegen, daß durch Amplifikation der Gesamt-mRNA durch das modifizierte Protokoll der SL-RT-PCR cDNA Pools aus geringsten Mengen biologischen Materials generiert werden können, die vollständige cDNAs bis zu einer Größe von 1,65 kb enthalten. Nebenprodukte der SL-RT-PCR werden durch einen Aufreinigungsschritt mit Streptavidin-Dynabeads effizient entfernt und sind in den amplifizierten cDNA-Pools nicht mehr nachzuweisen.

Die Amplifikation von Gesamt-mRNA von Filarien durch SL-RT-PCR zur Erstellung von amplifizierten cDNA Pools wurde für *O. volvulus*, *B. pahangi* und *B. malayi* beschrieben (Henkle-Dührsen *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1995; Blaxter *et al.*, 1996). Die Anwendung der beschriebenen Protokolle für die Amplifikation von *A. viteae* Gesamt-mRNA resultierte in der Entstehung aberranter PCR-Produkte in den amplifizierten cDNA Pools, die am 5' und am 3' Ende eine Bindestelle für den oligo dT Primer aufwiesen (Lattemann, 1995). Dieser Effekt ließ sich auf unspezifische Bindung des oligo-dT Primers an kontaminierende genomische DNA, die bei Filarien einen hohen AT-Gehalt aufweist (Hammond, 1994), und durch die Bildung von Haarnadelschleifen am 3' Ende der Erststrang-cDNA zurückführen. Diese Haarnadelstrukturen werden durch eine Terminale-Transferase-Aktivität von reversen Transkriptasen an das 3' Ende der Erststrang-cDNA synthetisiert, und dienen zur Initiation der Synthese des Komplementärstrangs (Rougeon und Mach, 1976). Während der ersten Zyklen der SL-RT-PCR konkurrieren die Haarnadelstrukturen offensichtlich mit dem SL1-Primer, beziehungsweise initiieren die Komplementärstrangsynthese bei unvollständig revers transkribierten cDNAs (Lattemann, 1995).

Henkle-Dührsen *et al.* wandten SL-RT-PCR zur Amplifikation der Gesamt mRNA von *O. volvulus* L3 an (Henkle-Dührsen *et al.*, 1993). Die Autoren untersuchten 60 klonierte cDNAs und konnten jedoch nur drei offene Leserahmen identifizieren, die übrigen untersuchten cDNAs wiesen Deletionen auf oder waren durch unspezifische Bindung der Primer entstanden. Die Gesamt-mRNA von L3 des Nematoden *Toxocara canis* wurde zur Klonierung der cDNA eines hyperabundanten Mucins über SL-RT-PCR amplifiziert (Gems und Maizels, 1996). Die cDNA dieses Mucins konnte in der amplifizierten cDNA als distinkte Bande in einem Agarosegel identifiziert werden. Im Southern Blot der amplifizierten L3 cDNA mit der isolierten Mucin-cDNA als Sonde zeigte sich jedoch ein Schmier aus unspezifischen Amplifikationsprodukten der cDNA des Mucins.

Zur Optimierung der SL-RT-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit die Temperatur während der Primerbindung von 52 °C auf 58 °C erhöht. Zusätzlich wurde ein Aufreinigungsschritt mit Streptavidin-Dynabeads in das Amplifikationsprotokoll integriert. Der biotinmarkierte oligo dT Primer HA9 wurde zur Initiation der reversen Transkription und während der Primäramplifikation eingesetzt, was die Abtrennung chromosomaler DNA und der aberranten durch den oligo-dT Primer initiierten PCR-Produkte aus dem Reaktionsansatz erlaubte. Die (+) Stränge der amplifizierten Gesamt-cDNA konnten durch einen einfachen Denaturierungsschritt gewonnen und einer Reamplifikation unterzogen werden. Dieses Protokoll erlaubt die effiziente Abtrennung von Fehlprodukten, die bei der Amplifikation von verunreinigten RNA-Proben entstehen können, und ermöglicht so eine effiziente Amplifikation ausgehend von geringsten Mengen biologischen Materials. Die Gesamt cDNA von 20 postinfektiösen Larven konnte effizient amplifiziert werden, was eine Steigerung der Effizienz beschriebener Protokolle bedeutet (Martin *et al.*, 1995; Blaxter *et al.*, 1996). Für die Herstellung von EST-Datenbanken (*expressed sequence tags*) von *B. malayi* und *O. volvulus* wird ein konventionelles Amplifikationsprotokoll zur Erstellung stadienspezifischer cDNA Pools verwendet (Blaxter *et al.*, 1996; M.L. Blaxter pers. Mitteilung). Diese cDNAs werden durch gerichtete Klonierung mit verschiedenen Restriktionsenzymen am 5' und 3' Ende der cDNAs in Plasmidvektoren kloniert und vom 5' Ende ausgehend ansequenziert. Die Herstellung dieser Pools geht von weitaus größeren Mengen biologischen Materials aus und toleriert eine gewisse Fehlerrate, da unspezifische Amplifikationsprodukte durch die Strategie der gerichteten Klonierung nicht kloniert werden. Bei geringen Mengen biologischen Ausgangsmaterials ist in der Amplifikationsreaktion eine größere Anzahl an Zyklen notwendig. Die Konkurrenz unspezifischer Amplifikationsprodukte mit korrekt amplifizierten cDNAs führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zu Ungunsten der korrekt amplifizierten Reaktionsprodukte (Lattemann, 1995).

Das hier beschriebene Verfahren steht nun zur Herstellung von stadienspezifischen cDNA Pools von Filarien und anderen Nematoden zur Verfügung. Das modifizierte Protokoll der SL-RT-PCR bedeutet eine Steigerung der Effizienz des beschriebenen Verfahrens und ermöglicht die molekularbiologische Analyse der Genprodukte von Entwicklungsstadien von Nematoden, die nur in geringen Mengen verfügbar sind. Die direkte Klonierung der amplifizierten cDNAs in einen Expressionsvektor ermöglichte die Identifizierung rekombinanter *E. coli* Klone die *A. viteae* cDNAs exprimieren. Die durch SL-RT-PCR amplifizierten cDNA Pools stehen somit zur Herstellung stadienspezifischer Expressionsbibliotheken von *A. viteae* zur Verfügung. Stadienspezifische L3 cDNAs können aus diesen Pools durch verschiedene etablierte Techniken der Subtraktionsklonierung angereichert werden und auf ihr immunprophylaktisches Potential hin untersucht werden.

Im Rahmen der ELI-Technik (*expression library immunization*) (Barry *et al.*, 1995; Brayton *et al.*, 1998; Manoutcharian *et al.*, 1998) können Pools von rekombinanten attenuierten Salmonellen, die definierte stadienspezifischen cDNAs von *A. viteae* exprimieren, im Tierversuch auf Protektivität gegen eine *A. viteae* Belastungsinfektion untersucht werden um protektive Antigene zu identifizieren.

Eine durch *Sau* 3A Partialverdau erhaltene genomische,  $5 \times 10^4$  cfu umfassende Expressionsbibliothek des Bakteriums *Helicobacter pylori* wurde ebenfalls in pYZT7 etabliert und rekombinante *H. pylori* Proteine exprimierende *S. typhimurium* Klone isoliert (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl der rekombinanten Klone betrug etwa 12 %, was der durch die Klonierungsstrategie erwarteten Häufigkeit entsprach. In einem Tiermodell für *H. pylori* (Gomez-Duarte *et al.*, 1998) werden die relevanten Parameter, wie Poolgröße, Infektionsdosis, antigene Konkurrenz (Ulmer und Liu, 1996) für ELI mit dieser Expressionsbibliothek ermittelt (J. Koesling pers. Mitteilung).

## 2.4 Zusammenfassung

Die Gesamt-mRNA verschiedener Entwicklungsstadien von *A. viteae* wurde durch RT-PCR mit einem von der *spliced leader 1* Sequenz von Nematoden abgeleiteten Primer und einem oligo-dT Primer amplifiziert (SL-RT-PCR). Abundante Fehlprodukte der SL-RT-PCR die durch Bindestellen für den oligo-dT Primer am 5' und am 3' Ende charakterisiert sind führten zur ineffizienten Amplifikation vollständiger cDNAs. Diese Nebenprodukte konnten durch einen Aufreinigungsschritt mit Streptavidin-Dynabeads aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. In amplifizierter cDNA, die durch das modifizierte Protokoll hergestellt worden war, konnten vollständige cDNAs von mindestens 1,65 kb nachgewiesen werden. Das Protokoll erlaubte die Amplifikation der von 40 ng Gesamt-mRNA 20 *ex vivo* isolierter postinvasiven Larven. Die Subklonierung der erhaltenen cDNAs in Expressionsvektoren resultierte in einem Anteil rekombinanter Transformanten von 10 %, die Filarien cDNAs exprimierten, die nun für weitere Fragestellungen wie Immunscreening oder ELI zur Verfügung stehen.

### **Dieses Kapitel wurde unter folgendem Titel veröffentlicht:**

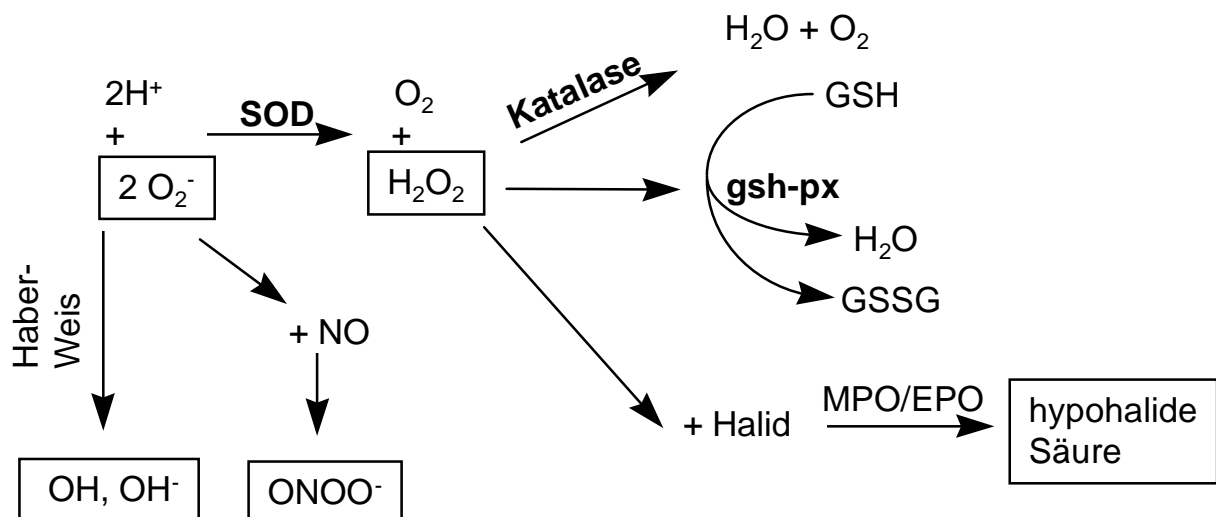
Lattemann C.T. und Apfel H. (1999). PCR-based amplification of total cDNA with high fidelity and high yield from minute amounts of parasite RNA. *International Journal for Parasitology* 27: 955-958

### 3 Molekulare Charakterisierung der extrazellulären CuZn Superoxid Dismutase von *A. viteae*

#### 3.1 Einleitung

##### 3.1.1 Reaktive Metabolite von Sauerstoff und Stickstoff wirken zytotoxisch

Oxidativer Stress ist eine unvermeidliche Konsequenz des aeroben Zellstoffwechsels. Folglich kommt der Inaktivierung reaktiver Sauerstoffintermediate (*reactive oxygen intermediates*, ROI), die in vielfältigen Stoffwechselprozessen entstehen, erhebliche Bedeutung zu. Pathogene Mikroorganismen und Parasiten sind darüber hinaus dem *oxidative burst* aktivierter Effektorzellen des Immunsystems ausgesetzt. Superoxid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und das Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ) sind die wichtigsten ROI, hinzu kommen die sogenannten reaktiven Stickstoffintermediate (*reactive nitrogen intermediates*, RNI) Stickstoffoxid ( $\text{NO}\cdot$ ) und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}\cdot$ ). Superoxid selbst wirkt durch seine oxidierende Wirkung auf Membranlipide und Proteine moderat zytotoxisch (Brunori und Rotilio, 1984), steht jedoch als Edukt bei der Bildung anderer hochreaktiver



**Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung der Bildung von ROI.** Modifiziert nach Callahan *et al.* 1988 (Callahan *et al.*, 1988). Zellschädigende Substanzen sind umrandet. Die Komponenten des ROI neutralisierenden Enzymsystems sind fett dargestellt. EPO: Eosinophile Peroxidase; MPO: Myeloperoxidase; GSH und GSSG: Glutathion (reduziert beziehungsweise oxidiert).

Sauerstoffmetabolite an zentraler Stelle (Callahan *et al.*, 1988; Bannister *et al.*, 1987; Abbildung 3.1). Als reaktivstes ROI gilt  $\cdot\text{OH}$ , es besitzt eine extrem kurze Halbwertszeit von  $1 \times 10^{-9}$  s und reagiert in biologischen Systemen bereits nach einer Diffusion von maximal zwei Moleküldurchmessern ab (Yu, 1994). Die wichtigsten physiologischen Prozesse der Bildung von  $\cdot\text{OH}$  aus Superoxid sind in Anwesenheit zweiwertiger Kationen wie  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  die Haber-Weiss sowie die Fenton Reaktion (Yu, 1994).

Des Weiteren entsteht durch spontane Dismutierung von Superoxid oder Katalyse durch das Enzym Superoxid Dismutase Wasserstoffperoxid. Während die Diffusion des negativ geladenen Superoxids durch biologische Membranen beschränkt ist, vermag  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Lipidmembranen zu diffundieren und auch intrazelluläre Targets zu oxidieren. In den Granula neutrophiler und eosinophiler Granulozyten sind die Enzyme Myeloperoxidase bzw. Eosinophile Peroxidase lokalisiert, die die Synthese von Hypochlorsäure aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Chlorid katalysieren (Albrich *et al.*, 1981). Die Ausschüttung von Hydroxylradikal und Hypochlorsäure während der Degranulation von Granulozyten führt neben der Degradation von Proteinen oder deren Quervernetzung zur Peroxidation der Fettsäurereste von Membranlipiden. Konsequenz ist die Lyse der Zielzelle.

Makrophagen gelten als Hauptproduzenten von RNI, der zweiten Klasse oxidierender Substanzen mit zytotoxischem Potential. Die Aktivierung der iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) durch Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder Lipopolysacharid (LPS) führt in Makrophagen zur Synthese großer Mengen an Stickstoffmonoxid (NO) (Ding *et al.*, 1988), das in hohen Konzentrationen, über einen längeren Zeitraum einwirkend, zytotoxisch wirkt. In nanomolaren Konzentrationen hingegen spielt NO eine wichtige Rolle in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden (Stamler, 1994). NO reagiert mit Superoxid unter der Bildung von Peroxynitrit, dessen protonierte Form rasch in Stickstoffdioxid und  $\cdot\text{OH}$  zerfällt. Hauptquellen des sehr reaktiven Peroxynitrits, das in der Lage ist Sulfhydrylgruppen (Radi *et al.*, 1991b) und Membranlipide (Radi *et al.*, 1991a) zu oxidieren und Strangbrüche in DNA einzuführen, sind neutrophile Granulozyten und Makrophagen.

### 3.1.2 Mechanismen zur Inaktivierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-intermediate

Die meisten aeroben Organismen haben als Anpassung an oxidativen Stress verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen entwickelt, um oxidierende Substanzen zu neutralisieren, ihre Entstehung zu hemmen oder ihre Reaktivität herabzusetzen. Des Weiteren wurden enzymatische Reparatursysteme charakterisiert, die

durch ROI oder RNI verursachte Schäden reparieren (Selkirk *et al.*, 1998; Maizels *et al.*, 1993b).

### 3.1.2.1 Enzymatische Mechanismen zur Neutralisierung von ROI und RNI

#### 3.1.2.1.1 Superoxid Dismutase

Der Zelle stehen verschiedene Enzyme zur Verfügung um ROI, die bei Prozessen des Zellstoffwechsels entstehen oder extern einwirken, zu neutralisieren. Das Enzym Superoxid Dismutase (SOD) liegt *in vivo* in der Regel als Dimer vor und katalysiert die Dismutierung von Superoxid ( $2 \cdot \text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ). Diese Reaktion wird häufig als primärer Abwehrmechanismus bezeichnet, da die Inaktivierung von Superoxid die Bildung weiterer zellschädigender Radikale unterbindet (siehe Abbildung 3.1). Drei Hauptklassen von SODs wurden anhand der Metallkofaktoren Fe, Mn und CuZn im aktiven Zentrum des Enzyms beschrieben. Eine Fe SOD (SodB) wurde in Prokaryonten, Protisten und niederen Grünalgen, eine Mn SOD (SodA) in Prokaryonten und Mitochondrien beschrieben, während das Vorkommen von CuZn SODs (SodC) auf Eukaryonten beschränkt schien (Bannister *et al.*, 1987). In den letzten Jahren wurden jedoch ebenfalls bei *Haemophilus influenzae* (Kroll *et al.*, 1991), *E. coli* (Benov und Fridovich, 1994) und *S. typhimurium* (Farrant *et al.*, 1997) *sodC* Gene beschrieben, deren Genprodukte im Periplasma lokalisiert sind.

Erhöhte Superoxid Dismutase Aktivität scheint in der Tat eine verbreitete Reaktion auf intrinsischen oder extrinsischen oxidativen Stress zu sein. Die Sauerstoffkonzentration des umgebenden Mediums beeinflusste den Grad der SOD Expression in *Streptococcus faecalis*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und Rattenlunge (Bannister *et al.*, 1987). In anaerob kultivierten *E. coli* wurde nach dem Zusatz von Sauerstoff zum Medium neben der konstitutiv exprimierten eisenabhängigen SodB eine manganhaltige SodA induziert (Moustafa Hassan H. und Fridovich, 1977; Yano und Nishie, 1978). Bei pathogenen Mikroorganismen spielen SODs offensichtlich eine zentrale Rolle als Pathogenitätsfaktor. So führt die chromosomale Deletion des *sodA* Gens bei *Yersinia enterocolitica* oder des *sodC* Gens bei *Salmonella* zum Verlust der Virulenz (Roggenkamp *et al.*, 1997; De Groote *et al.*, 1997), während die Überexpression der SodC in *E. coli* zu erhöhter Resistenz gegen den *oxidative burst* aktivierter Makrophagen führte (Battistoni *et al.*, 1998). In Eukaryonten wurden neben einer cytoplasmatischen (CY-SOD) auch eine extrazelluläre (EC-SOD) Form der CuZn SOD charakterisiert. So liegt die humane EC-SOD in Blutgefäßen an das Endothel gebunden vor und konnte nach intravenöser Injektion von Heparin im Blutplasma nachgewiesen werden (Karlsson und Marklund, 1987). Die physiologische Bedeutung des



Enzyms liegt vermutlich im Schutz des Endothels vor oxidativer Schädigung. In parasitären Nematoden und Trematoden konnten ebenfalls beide Varianten der CuZn SOD charakterisiert werden (Simurda *et al.*, 1988; Knox und Jones, 1992; Britton *et al.*, 1994; Selkirk *et al.*, 1998). Die beobachtete Sekretion von SOD Aktivität von Helminthen in das umgebende Medium wird in Zusammenhang mit der Immunevasion der Parasiten gebracht (Britton *et al.*, 1994; Batra *et al.*, 1990; Henkle-Dührsen *et al.*, 1997; Ou *et al.*, 1995a).

#### 3.1.2.1.2 Katalase

Das Produkt der Dismutierung von Superoxid ist  $H_2O_2$ . Dieses Sauerstoffintermediat wird in der Hauptsache durch Katalase inaktiviert. Katalase zeigt eine überschneidende Substratspezifität mit der Glutathion Peroxidase (GSH-Px, siehe unten) und ist bei hohen  $H_2O_2$ -Konzentrationen aktiv, während GSH-Px, Wasserstoffperoxid bei geringen Konzentrationen metabolisiert (Yu, 1994). Offensichtlich nimmt Katalase keine wichtige Funktion als Pathogenitätsfaktor mikrobieller Krankheitserreger ein (Khelef *et al.*, 1996; Buchmeier *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Bubert *et al.*, 1997), lediglich bei Katalase defizienten *Candida albicans* Stämmen ist die Virulenz reduziert (Wysong *et al.*, 1998). Bei Filarien scheint Katalase ebenfalls eine untergeordnete Rolle bei der Detoxifizierung zu spielen, denn in Überständen *in vitro* kultivierter Filarien wurde geringe Katalase-Aktivität nachgewiesen (Ou *et al.*, 1995b; Callahan *et al.*, 1990).

#### 3.1.2.1.3 Glutathion Peroxidase und Glutathion S-transferase

Diese Glutathion abhängigen Enzymfamilien der Oxidoreduktasen besitzen eine breite Substratspezifität. Gsh-Px liegen *in vivo* entweder als Homodimere oder -tetramere vor und besitzen im aktiven Zentrum einen reaktiven Cystein- oder Selenocysteinrest. GSH-Px katalysieren die Reduktion von organischen Hydroperoxiden unter Bildung von Wasser (siehe Abbildung 3.1). Neben  $H_2O_2$  und Peroxynitrit stellen auch Peroxide von Fettsäuren ein Substrat für GSH-Px dar. Folglich hemmt GSH-Px Aktivität die fortschreitende Peroxidierung von Membranphospholipiden und stellt somit eine wichtige Schutzfunktion für biologische Membranen dar. Neben GSH-Px besitzen Glutathion S -Transferasen der  $\alpha$ -Subklasse Spezifität für Alkylperoxide (Mannervik *et al.*, 1985), während die übrigen Subklassen als Elektronenakzeptoren im Intermediärstoffwechsel dienen. Bei Prokaryonten scheinen beide Enzyme eine untergeordnete Rolle zu spielen. Ein Glutathionstoffwechsel wurde für wenige Gruppen wie Grüne Schwefelbakterien oder Proteobakterien beschrieben (Vuilleumier, 1997). Die geringe Enzymaktivität von GSH-Px und GST, die in diesen Organismen gemessen wurde, wird vornehmlich im Zusammenhang mit dem Intermediärstoffwechsel gesehen (Vuilleumier, 1997). Im Gegensatz dazu wurde bei

parasitischen Helminthen oberflächenständige GSH-Px und GSH charakterisiert, die im Zusammenhang mit der Immunevasion diskutiert werden. Bei lymphatischen Filarien der Gattungen *Brugia* und *Wuchereria* stellt eine sekretierte oberflächenständige GSH-Px (gp29) ein Hauptoberflächenantigen dar (Cookson *et al.*, 1993), während *Schistosoma*-Arten große Mengen einer GST exprimieren. Vakzinierungsexperimente mit rekombinanter GST von *Schistosoma* unterstreichen die Bedeutung dieses Enzyms für die Immunevasion von *S. mansoni* (Capron *et al.*, 1992)

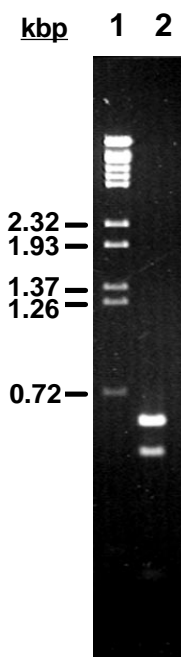
### 3.1.2.2 Nicht enzymatische Antioxidansmechanismen

Einer Vielzahl niedermolekularer Substanzen wird die Fähigkeit zugeschrieben, als Antioxidans zu wirken, darunter hydrophile Moleküle wie Ascorbinsäure oder Glutathion oder lipophile Komponenten wie  $\alpha$ -Tocopherol oder Ubiquinole.  $\alpha$ -Tocopherol ist in der Lage Alkylperoxid-Radikale zu inaktivieren und so die fortschreitende Peroxidierung von Membranlipiden zu stoppen. Die Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol wird durch Ascorbinsäure verstärkt, die *in vivo* in 100-fach höherer Konzentration vorliegt und  $\alpha$ -Tocopherol rekonstituiert (Yu, 1994). In den kutikulären Lipiden von *Brugia malayi* wurde  $\alpha$ -Tocopherol nachgewiesen, das vermutlich aus der Extrazellulärflüssigkeit der infizierten Wirte angereichert wird (Smith *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist die Epikutikula von Filarien wahrscheinlich nicht zuletzt wegen des extrem niedrigen Anteils an ungesättigten Fettsäuren außerordentlich resistent gegen oxidative Schädigungen (Selkirk *et al.*, 1998). Verschiedene Serumproteine fallen in die Kategorie nicht enzymatischer Antioxidantien. Zum einen fungieren diese Proteine als Chelatoren zweiwertiger Kationen - Serumalbumin ist in der Lage  $\text{Cu}^{2+}$  zu komplexieren während Transferrin und Laktoferrin mit hoher Affinität  $\text{Fe}^{2+}$  binden - und verhindern so die Bildung von  $\cdot\text{OH}$ . Zum anderen ist z.B. Albumin ein effizienter Scavenger von Hypochlorsäure (Halliwell und Gutteridge, 1989). Bislang ist bei Filarien kein autologes Protein mit diesen Funktionen charakterisiert worden. Serumalbumin bindet jedoch mit hoher Affinität an die Oberfläche von verschiedenen Filarienarten (Maizels *et al.*, 1984; Philipp *et al.*, 1984)(eigene Beobachtung) und schützt die Parasiten durch Maskierung der Filarienoberfläche sowie Schutz vor oxidativer Schädigung.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Klonierung der cDNA der extrazellulären CuZn SOD von *A. viteae*

Partielle cDNAs von AVSOD1 und AVSOD2 wurden durch RT-PCR mit dem spliced leader 1 Primer HA14 und dem SOD-spezifischen antisense Primer HA17 amplifiziert und deren Nukleinsäuresequenz bestimmt (Lattemann, 1995). Abbildung 3.2 zeigt zwei spezifische Amplifikationsprodukte der Reaktion. Das größere, 590 bp große, Amplifikationsprodukt entspricht der cDNA der AVSOD2, während das 470 bp große Amplifikationsprodukt für die cDNA der AVSOD1 kodiert (Lattemann, 1995). HA17 war aus einem konservierten Bereich der CuZn SODs von Filarien abgeleitet worden und bindet 42 - 62 bp stromaufwärts des Stopkodons der AVSOD2. Folglich waren die cDNAs von AVSOD1 und AVSOD2 am 3' Ende unvollständig. Zur Ermittlung der vollständigen Nukleinsäuresequenz der AVSOD2 cDNA wurde der Oligonukleotidprimer MAT2 aus der bereits bekannten Nukleinsäuresequenz der AVSOD2 cDNA abgeleitet (schematische Darstellung der Primerbindestellen in AVSOD1 und AVSOD2 im Anhang). MAT2 bindet stromabwärts des für das Signalpeptid kodierenden Sequenzabschnitts. Durch RT-PCR mit MAT2 und dem oligo dT Primer HA15 konnte ein 740 bp großes Amplifikationsprodukt generiert werden, das in den Vektor pCRScript kloniert und dessen Nukleinsäuresequenz bestimmt wurde. Das PCR-Produkt enthielt den offenen Leserahmen der AVSOD2 cDNA stromabwärts des



**Abbildung 3.2: Amplifikation von AVSOD1 und AVSOD2 mRNA durch RT-PCR.** Ethidium Bromid gefärbtes 1,2% Agarosegel. Spur 1:  $\lambda$  Bst EII Verdau. Spur 2: RT-PCR Produkte von AVSOD1 und AVSOD2 nach Amplifikation mit dem SL1 spezifischen Oligonukleotidprimer HA14 und dem SOD spezifischen antisense Oligonukleotidprimer HA17 mit gesamt RNA von *A. viteae* Weibchen als Matrix.

Signalpeptids bis zum Stopkodon und den nicht translatierten 3' Bereich.

Abbildung 3.3 gibt die vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenz der cDNA der AVSOD2 wieder. Bei *A. viteae* wird die SL1 Sequenz direkt an das Startkodon der SOD2 mRNA durch den Vorgang des Trans-Spleißens fusioniert, während bei der AVSOD1 zwischen der SL1-Sequenz und dem Startkodon 4 bp vorhanden sind. Die cDNA der AVSOD2 hat eine Größe von 793 bp und kodiert für ein naszierendes Protein von 195 Aminosäuren.

```

1  GGTTTAATTACCCAAGTTTGAGATGATGCATTCATTTATCATCTCTTTACTGTATATAAT 60
      M M H S F I I F L L Y I I -
61  TTCCGCTATCTATGCTGATTCAATGTACATTGCACGTGAAAGCAATTCTAAACTAAAAAC 120
      S A I Y A D S M Y I A R E S N S K L K T -
121  ACGAAACTATACAACAAAGATGAAAGCAGTAGCAGTATTGCGTAGTGACACCGTTAATGG 180
      R N Y T T K M K A V A V L R S D T V N G -
181  AACCATTTTCTTTCAACAGGATAATAAAAGTTCACCAGTAATGATTAATGGAAAAATTAG 240
      T I F F Q Q D N K S S P V M I N G K I S -
241  TGGTTTAAACGCCTGGTTTGCATGGTTTTCATAATCATCAGTATGGTGACATGACAAACGG 300
      G L T P G L H G F H N H Q Y G D M T N G -
301  TTGCATATCTGCCGGTGCACATTTCAATCCGTTTCGGTAAAACCTCATAGCGGTCCAACCGA 360
      C I S A G A H F N P F G K T H S G P T D -
361  TCAAGTAAAACATATTGGTGATCTTGGAAATATTAAGCTGGAGCTGATGGCATTGCTCA 420
      Q V K H I G D L G N I K A G A D G I A H -
421  TATTAATATTAGCAGTAATTACATAAAAGTTATCAGGTCCAATTTCAATAATTGGACGTTTC 480
      I N I S S N Y I K L S G P I S I I G R S -
481  ACTTGTGGTGCATGCGATGGAAGATGATTTAGGTAAAGGAATTGGTGATAAAAGGGAAGA 540
      L V V H A M E D D L G K G I G D K R E E -
541  AAGTTTGAAAACCGGTAATGCTGGTAGCCGTGTACATGCAGTATTATTGGCATTGCTGA 600
      S L K T G N A G S R V T C S I I G I A D -
601  TTCAATTTAAAGTCATTTTACTTTGAAAATAAAAATTTACTCCGTAAAGATAATTTCCCAC 660
      S I *
661  CCATATGTTTTCAACAGCATTATTAGTCTTCAACTTCCTGTCAATTATTTGTCAATTGTA 720
721  ATGTACTGTAACAGTATATTTCAAATTTTAAATAAAATTATCAAACCTGTAAAAAAAAAAAA 780
781  AAAAAAAAAAAAAA 793

```

**Abbildung 3.3: Vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenz der AVSOD2.** Die SL1 Sequenz ist durch Fettdruck hervorgehoben, das Signalpeptid und Konsensussequenzen für N- Glykosylierung sind grau unterlegt. Das Startkodon ist unterstrichen.

Am N-terminus weist das Hydrophobizitätsprofil nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) ein hydrophobes Signalpeptid aus. Vermutlich wird das Signalpeptid durch die Signalpeptidase nach dem Aminosäurerest Alanin<sup>18</sup> gespalten (spscan, Genetics Computer Group). Des weiteren weist die Aminosäuresequenz der AVSOD2 vier Motive für N-

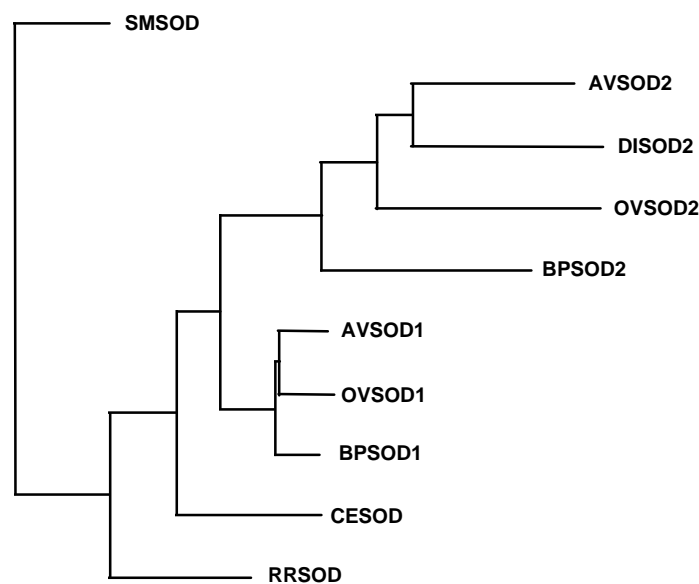
Glykosylierung auf, die in Abbildung 3.3 grau unterlegt sind (Konsensussequenz: N-X-T/S, Marshall, 1972). Die berechnete molare Masse des Proteinanteils des 177 Aminosäuren langen, reifen Genprodukts des *avsod2* Gens beträgt 18,7 kDa. Die Identität der bisher beschriebenen extrazellulären SODs verschiedener Filarienarten beträgt auf Aminosäureebene etwa 60 - 65% (Abbildung 3.4). Die Identität der Aminosäuresequenz der AVSOD2 mit der extrazellulären SOD von *O. volvulus* (James *et al.*, 1994) beträgt 60,8%, zur SOD2 von *B. pahangi* (Ou *et al.*, 1995a) wurde eine Identität von 63,7% festgestellt und zur SOD2 von *D. immitis* (Callahan *et al.*, 1993) beträgt die Identität der AVSOD2 64,6% (Abbildung 3.4). Im Gegensatz dazu weisen die Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen SODs von Filarien bis zu 90% Identität auf (Matzen, 1994).

	1		*		70
AVSOD2	MM-HSFIIIFLLYIISAIYA	DSMYIARESNSKLKT-----RNYTTKMKAVAVLRSDT--VNGTIFFQODNK			
BPSOD2	M.IA.A.A.SH.F.T.	T.NQRYFKP.MHNNMTITIR.TI.KTAT.I...H.NGNI...H...KN			
DISOD2	M.-G...FL.SI...N.IN.	LHTVHR..IHRNM-----H.GGMPK.....K.....I.Y...N.R			
OVSOD2	M-IN...VIF.SFLIF.NYA	NLVCVEATHVYGRRSNMGHNGARR.....G.AG..S.I.Y...GSG			
	71		*** * * * * * * * * *		140
AVSOD2	SSPVMINGKISGLTPGLHGFHNHQY	QDMTNGCISAGAHFNPFKTHSGPTDQVKHIGDLGNIKAGADGIA			
BPSOD2	..--TT.S.E.K.....V.....T.....P.....YN...GD...EMR.V.....V.....T.				
DISOD2	A.ATT.Y.T.N.....I.....IKA...T..A..Y...E...GR..NNI.....R.....V.				
OVSOD2	G.IIT.S.SV.....V.....Q...T...D.Y.....G..N.RI.....V...N.V.				
	141		* * * * *		
AVSOD2	HINISSNYIKLSGPI	SIIGRSLVHAMEDDLGKIGDKREESLKTGNAGSRVTC	SIIGIADSI*	195 aa	
BPSOD2	..D..DKHVQ.L.....DQ.....V...KD.....G..A.G.VA.SA*			199 aa	(63.7%)
DISOD2	NV..I..H.Q...L.V.....NP.....N..A.....IV.....P.T*			196 aa	(64.6%)
OVSOD2	EVY.N.YD...R..L.V..H.....NT...Q.T.NM.....LA.GV...AVS*			202 aa	(60.8%)

**Abbildung 3.4: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen der extrazellulären SODs von Filarien.** Die Aminosäuresequenz der AVSOD2 wurde mit den Sequenzen extrazellulärer SODs von *B. pahangi* (BPSOD2), *D. immitis* (DISOD2) und *O. volvulus* (OVSOD2) verglichen. Der Grad der Identität der Aminosäuresequenz der AVSOD2 mit den Sequenzen der extrazellulären SODs der anderen Filarienarten ist am Ende der entsprechenden Aminosäuresequenz in Prozent angegeben. Identische Aminosäuren sind als „.“ markiert. Signalpeptide, die mit dem Programm spscan (GCG) identifiziert wurden, sind grau unterlegt. Invariante Aminosäurereste von CuZn SODs nach Getzoff *et al.* (Getzoff *et al.*, 1989) sind mit einem Stern (\*) markiert.

Getzoff *et al.* untersuchten 1989 (Getzoff *et al.*, 1989) die Struktur von CuZn SODs und konnten invariante Aminosäurereste identifizieren, die zur Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur des Enzyms sowie zur Interaktion der Dimeruntereinheiten essentiell sind. In der Aminosäuresequenz der AVSOD2 sowie bei den SOD2s von *O. volvulus*, *B. pahangi* und *D. immitis* sind diese konservierten Aminosäurereste zu finden. Über weite

Sequenzbereiche weisen die extrazellulären SODs von Filarien einen hohen Grad an Identität auf. Lediglich am N-terminus divergieren die extrazellulären SODs von Filarien beträchtlich. Das Dendrogramm in Abbildung 3.5 illustriert die relativen genetischen Distanzen von Filarien CuZn SODs. Die genetischen Distanzen wurden mit dem Programm CLUSTALW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) nach der *Neighbour Joining* Methode berechnet. Die cytoplasmatischen und extrazellulären SODs bilden zwei Cluster, wobei die genetischen Distanzen der cytoplasmatischen SODs von Filarien untereinander und zur einzigen bisher beschriebenen CuZn SOD des Bodennematoden *Caenorhabditis elegans* geringer sind als zwischen den extrazellulären SODs. Die cytoplasmatischen CuZn SODs des Trematoden *Schistosoma mansoni* und der Ratte sind wie erwartet den cytoplasmatische SODs von Filarien am ähnlichsten. Die *C. elegans* SOD steht an der Basis des Astes der Filarien SODs. Dies läßt vermuten, daß das Auftreten der extrazellulären CuZn SOD mit dem Erwerb der parasitischen Lebensweise der Gattung Filarioidea korreliert.



**Abbildung 3.5: Dendrogramm der Aminosäuresequenzen der CuZn SODs von Filarien.** Verglichen wurden die Aminosäuresequenzen der cytoplasmatischen CuZn SODs von *A. viteae* (AVSOD1), *B. pahangi* (BPSOD1) und *O. volvulus* (OVSOD1), der extrazellulären CuZn SODs von *A. viteae* (AVSOD2), *B. pahangi* (BPSOD2), *O. volvulus* (OVSOD2) und *D. immitis* (DISOD2), sowie der CuZn SODs von *C. elegans* (CESOD), *S. mansoni* (SMSOD) und *Rattus rattus* (RRSOD). Das Dendrogramm wurde durch das Programm CLUSTALW nach der Neighbour Joining Methode erstellt. Die Länge der Äste zwischen den Verzweigungspunkten repräsentiert die genetische Distanz zwischen zwei Aminosäuresequenzen.

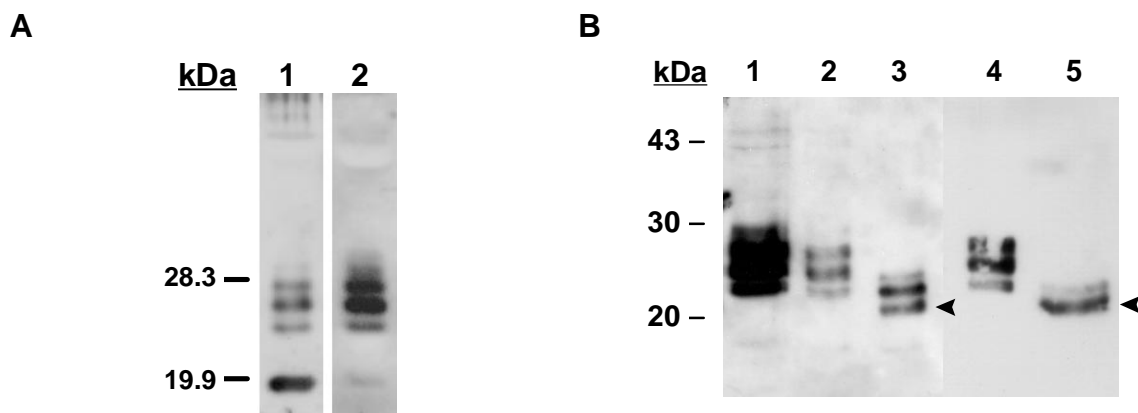
### 3.2.2 Expression der rekombinanten AVSOD2 in *E. coli*

Um die AVSOD2 rekombinant in *E. coli* zu exprimieren, wurde die AVSOD2 cDNA in den Expressionsvektor pYZ97 (Yan und Meyer, 1994) inseriert. Dieser Vektor erlaubt die Expression rekombinanter Proteine unter der Kontrolle des Promoters des Bakteriophagen T7 ( $P_{T7}$ ). Dazu wurde die AVSOD2 cDNA mit den Primern MAT2 und HA15 über PCR amplifiziert. Die Bindestelle von MAT2 wurde stromabwärts des Signalpeptids gewählt, so daß die AVSOD2 ohne Signalpeptid rekombinant exprimiert werden konnte. Anschließend wurde das MAT2/HA15 PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Pst*I restringiert, in die entsprechenden Schnittstellen von pYZ97 inseriert und der *E. coli* Expressionsstamm DH5 $\alpha$ ::pYZ88 (Yan und Meyer, 1996) mit dem resultierenden Plasmid pLAT26 transformiert. *E. coli* DH5 $\alpha$ ::pYZ88 trägt ein chromosomal integriertes phasenvariables Element, das eine temperaturabhängige Expression der unter Kontrolle des Promoters des T7 Phagen stehenden AVSOD2 cDNA erlaubt (siehe Kapitel 4). Die rekombinante AVSOD2 wird von DH5 $\alpha$ ::pYZ88/pLAT26 bei Kultivierung in  $\mu$ N bei 37°C effizient exprimiert (nicht gezeigt). Entsprechend des vorhergesagten Molekulargewichts migriert die rekombinante AVSOD2 bei etwa 19 kDa im SDS-PAGE (nicht gezeigt). Ein polyklonales Hasenserum gegen rekombinante SOD1 von *O. volvulus* rOVSOD1 (Henkle-Dührsen *et al.*, 1994) bindet im Western Blot an die rAVSOD2. Für die Herstellung eines polyklonalen Antiserums in der Maus, wurde die rAVSOD2 aus Einschlußkörpern von DH5 $\alpha$ ::pYZ88/pLAT26 isoliert (siehe M&M) und über präparative SDS-PAGE aufgereinigt. Das aufgereinigte Protein wurde mit MPL-TDM Adjuvant Emulsion (Sigma) versetzt und einer BALB/c Maus subkutan injiziert. Eine Booster Immunisierung erfolgte 4 Wochen pi, das Serum, das als AS1 bezeichnete wurde, wurde 6 Wochen pi gewonnen.

### 3.2.3 Die AVSOD2 ist glykosyliert

Totalhomogenate von *A. viteae* Weibchen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon-P Membran transferiert, die anschließend mit den polyklonalen Antiseren gegen rAVSOD2 (AS1) und rOVSOD1 inkubiert wurde. Beide Antiseren binden an ein Protein mit einer molaren Masse von ~19 kDa (Abbildung 3.6A). Des Weiteren werden mehrere Proteine im Bereich zwischen 23 und 29 kDa von beiden Antiseren erkannt. AS1 bindet stärker an die zwischen 23 und 29 kDa migrierenden Proteine als an das 19 kDa Protein. Das polyklonale Hasenserum gegen rOVSOD1 bindet im Gegensatz dazu stärker an das 19 kDa Protein als an die zwischen 23 und 29 kDa migrierenden Proteine. Dies

weist darauf hin, daß es sich bei dem 19 kDa Protein um die AVSOD1 handelt und offenbar mehrere Isoformen der AVSOD2 vorliegen. Eine Hypothese zur Erklärung dieses Effekts legt nahe, daß die AVSOD2 durch multiple N-Glykosylierungen posttranslational modifiziert wird. Um diese Hypothese zu Überprüfen wurde zur spezifischen Entfernung der Karbohydratstrukturen von der AVSOD2 ein Verdau mit Endo F / Peptid N Glykosidase F aus *Flavobacterium meningosepticum* (Oxford Glycosystems) durchgeführt. Der Verdau resultierte in der Abspaltung der Zuckerseitenketten vom Polypeptidgerüst der AVSOD2 (Abbildung 3.6B). Die Anzahl der von AS1 erkannten Proteine reduzierte sich auf den bei etwa 21 kDa migrierende Proteinateil der AVSOD2. Der Grad der Degradation der Karbohydratseitenketten durch Endo F / Peptid N Glykosidase F war abhängig von der Zeit.



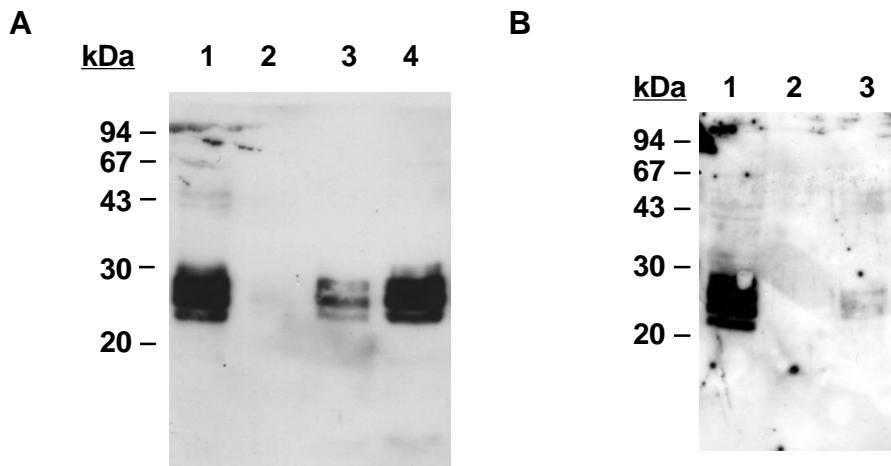
**Abbildung 3.6: Die AVSOD2 ist glykosyliert.** (A) Das Totalhomogenat von *A. viteae* Weibchen wurde über 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon-P Membran transferiert. Die Membran wurde mit einem polyklonalen Hasenserum gegen rOVSOD1 (Spur 1) und dem polyklonalen Mauserum AS1 gegen rAVSOD2 (Spur 2) inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit ECL nachgewiesen. (B) Verdau der AVSOD2 mit Endo F / Peptid N Glykosidase F von *Flavobacterium meningosepticum*. Ein *A. viteae* Weibchen wurde in TBS + 0,1% Triton X100 (TBS-Tx) durch Ultraschall aufgeschlossen. Die lösliche Fraktion wurde mit Endo F / Peptid N Glykosidase F versetzt und im vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer für 6 h (Spur 3) und 18 h (Spur 5) belassen. Spur 1: *A. viteae* Totalhomogenat. Spuren 2 und 4: TBS-Tx Extrakt von *A. viteae* Weibchen inkubiert in Reaktionspuffer für 6 beziehungsweise 18 h. Die Pfeilspitzen markieren die deglykosylierte AVSOD2.

Die AVSOD2 liegt *in vivo* offensichtlich in einem lipophilen Kontext vor. Eine Extraktion der löslichen Wurmfraktion führt nur zur Solubilisierung eines Teils der AVSOD2. Durch Zugabe von Triton X-100 konnte die AVSOD2 vollständig von unlöslichen Komponenten abgetrennt werden (Abbildung 3.7A).

Adultwürmer von *O. volvulus* sezernieren SOD-Aktivität *in vitro* (Henkle *et al.*, 1991; Henkle-Dührsen *et al.*, 1997). Zur Überprüfung der Fragestellung, ob dies ebenfalls für *A. viteae* gilt, wurden *A. viteae* Weibchen in Kultur genommen und das Kulturmedium durch Western Blot mit AS1 analysiert. Durch eine optische Überprüfung der kultivierten Würmer konnte



ausgeschlossen werden, daß durch Lyse SOD unspezifisch freigesetzt wurde. Im Kulturüberstand der untersuchten Weibchen, konnte AVSOD2 nachgewiesen werden (Abbildung 3.7B). Dies deutet darauf hin, daß AVSOD2 aktiv von *A. viteae* Weibchen sezerniert wird. Die Menge der AVSOD2 Sekretion ist bei den Individuen stark unterschiedlich.



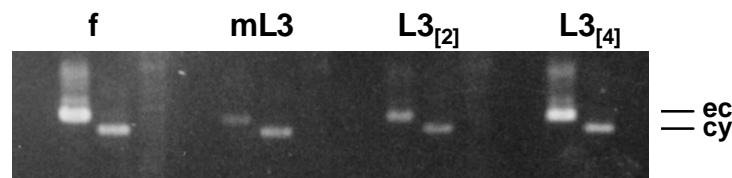
**Abbildung 3.7:** (A) Differentielle Extraktion der AVSOD2. *A. viteae* Weibchen wurden durch Ultraschall in TBS oder TBS-Tx aufgeschlossen und die löslichen Proteine durch Western Blot mit AS1 untersucht. Es wurden gleiche Volumina der Extraktion aufgetragen. Spur 1: *A. viteae* Totalhomogenat, Spur 2: unlösliche Fraktion nach TBS-Tx Extraktion; Spur 3: lösliche Fraktion nach TBS Extraktion Spur 4: lösliche Fraktion nach TBS-Tx Extraktion. (B) Sekretion der AVSOD2 in das Kulturmedium durch *in vitro* kultivierte *A. viteae* Weibchen. *Ex vivo* isolierte *A. viteae* Weibchen wurden in RPMI1640 kultiviert. Das Medium wurde in Intervallen von 12 h geerntet, am Ende des Experiments vereinigt und 100-fach konzentriert im Western Blot mit AS1 analysiert. Spur 1: *A. viteae* Totalhomogenat; Spuren 2 und 3: Kulturüberstand *in vitro* kultivierter *A. viteae* Weibchen.

### 3.2.4 Expression von AVSOD1 und AVSOD2 in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. viteae*

Sekretierte oder oberflächenständige Oxidoreduktasen von Filarien vermitteln vermutlich Schutz vor dem *oxidative burst* aktivierter Effektorzellen des Wirtsimmunsystems. Aus diesem Grund wurde die Fragestellung untersucht, ob die Expression der AVSOD2 durch den Transfer der Parasiten vom Zwischen- in den Endwirt verändert wird. Die Expression der cytoplasmatischen SOD sollte in allen Entwicklungsstadien von Filarien konstant sein, da von diesem Enzym angenommen wird, es sei ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen (Ou *et al.*, 1995a). Die Rate der Transkription beider SOD Transkripte in *A. viteae* Weibchen, mL3, L3<sub>[2]</sub> und L3<sub>[4]</sub> wurde durch semiquantitative RT-PCR mit sequenzspezifischen Oligonukleotidprimern für AVSOD1 (MAT1/HA17) und AVSOD2 (MAT2/HA17) untersucht. Dazu wurde Gesamt RNA aus den verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert und revers transkribiert. Da die Menge larvaler Stadien für eine

direkte Analyse über RT-PCR zu gering war, wurde die Gesamt cDNA vor der Sequenz spezifischen Amplifikation mit den Oligonukleotidprimern HA14/HA15 über 15 Zyklen amplifiziert (siehe Kapitel 2). Anschließend wurde die Amplifikation mit den sequenzspezifischen Oligonukleotidprimern über 30 Zyklen durchgeführt. Abbildung 3.8 zeigt ein Ethidium Bromid gefärbtes Agarosegel auf dem die Amplifikationsprodukte der RT-PCR Reaktionen aufgetrennt wurden.

Alle Entwicklungsstadien von *A. viteae* synthetisieren sowohl AVSOD1 als auch AVSOD2 mRNA. Dies gilt auch für *A. viteae* Männchen und Mikrofilarien (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.8: Die Expression der AVSOD2 mRNA nimmt nach der Übertragung in den Endwirt zu.** RT-PCR Produkte der mRNAs von AVSOD1 (cy) und AVSOD2 (ec) mRNA wurden auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit Ethidium Bromid angefärbt. Folgende Entwicklungsstadien wurden untersucht: Weibchen (f), mL3, L3<sub>[2]</sub> und L3<sub>[4]</sub>. Offenbar ist die Transkriptionsrate der AVSOD2 mRNA, verglichen mit der konstitutiv exprimierten AVSOD1 mRNA, in allen Entwicklungsstadien, die aus Gerbils isoliert wurden, höher als in mL3 die aus dem Zwischenwirt *O. moubata* isoliert wurden. Zusätzlich ist eine graduelle Zunahme der Transkriptionsrate der AVSOD2 mRNA, im Vergleich zur AVSOD1 mRNA, zu sehen. Dies deutet darauf hin das die Transkriptionsrate der AVSOD2 mRNA in Entwicklungsstadien, die aus dem Endwirt isoliert wurden höher ist, als in mL3, die aus dem Vektor isoliert wurden.

### 3.2.5 Humorale Immunantwort natürlich infizierter Gerbils gegen rAVSOD2

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, daß alle Entwicklungsstadien von *A. viteae* AVSOD2 exprimieren. Durch die konstante Sekretion von SOD2 durch Adultwürmer von Filarien *in vivo* und *in vitro* sollte demnach ein starker antigener Stimulus auf das Immunsystem des Wirts ausgeübt werden. Um das antigene Potential der AVSOD2 zu untersuchen wurde die Reaktivität von Seren patenter Gerbils auf ihre Reaktivität gegen rAVSOD2 überprüft (Abbildung 3.9.).

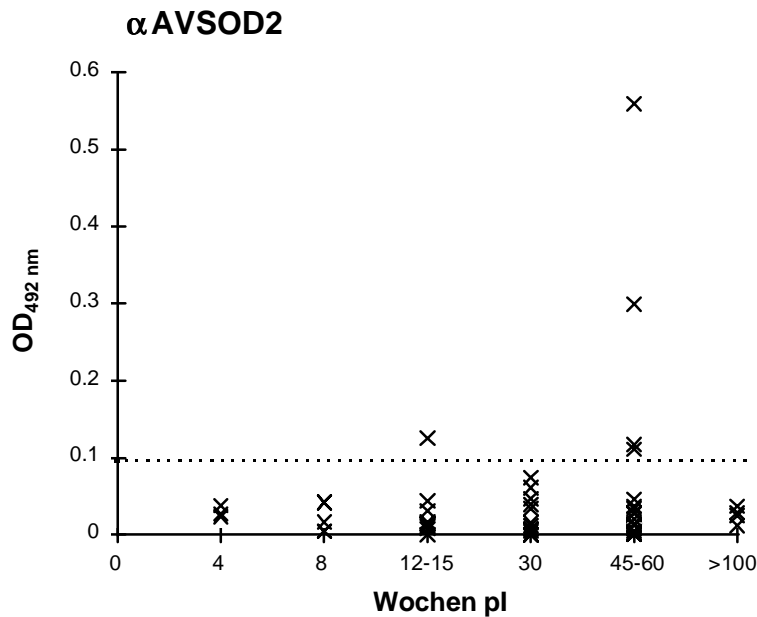


Abbildung 3.9: **Humorale Immunantwort patenter Gerbils gegen rAVSOD2.** Die Seren 59 mit *A. viteae* infizierter Gerbils wurden in einer Verdünnung von 1:100 auf ELISA-Platten aufgebracht, die mit 50 ng/Trog rAVSOD2 präinkubiert worden waren. Seren mit einer OD<sub>492</sub> von mehr als 0,1 wurden als serokonvertiert betrachtet.

Dazu wurden Seren von Gerbils mit unterschiedlicher Ausprägung der Patenz ausgewählt und im ELISA untersucht. Aufgereinigte rAVSOD2 wurde auf ELISA-Platten fixiert (50 ng/Trog) und mit den ausgewählten Seren inkubiert. Die Seren von fünf Tieren reagierten signifikant im Test, die Seren von 54 Tieren reagierten ebenso wie die Seren naiver Tiere nicht mit aufgereinigter rAVSOD2. Dies entspricht einem Anteil der reaktiven Seren von 8,6%. Darüber hinaus konnte die Serokonversion nicht mit verschiedenen Parametern der Infektion wie Stadium der Patenz oder Mikrofilariämie korreliert werden. In den Seren natürlich infizierter Gerbils liegt somit keine signifikante Reaktivität gegen AVSOD2 vor, obwohl das Enzym konstant von Adultwürmern sezerniert wird.

### 3.3 Diskussion

Eine Grundvoraussetzung für das Überleben eines Pathogens, bakterielle Krankheitserreger oder Parasiten, besteht in der Ausbildung wirksamer Mechanismen zur Detoxifikation reaktiver Sauerstoffintermediate, die von aktivierten Effektorzellen des Immunsystems während des *oxidative burst* sezerniert werden. Folglich werden Oxidoreduktasen als wichtige Pathogenitätsfaktoren auch von Filarien angesehen (Callahan *et al.*, 1988; Maizels *et al.*, 1993b; Selkirk *et al.*, 1998). In diesem Kapitel wurde die Klonierung und Charakterisierung eines Antioxidansenzym, der extrazellulären CuZn SOD, der Filarie *A. viteae* beschrieben. Die AVSOD2 besitzt ein N-terminales hydrophobes Signalpeptid, das vermutlich am Aminosäurerest Alanin<sup>18</sup> von der Signalpeptidase gespalten wird, und weist somit Charakteristika eines sezernierten Proteins auf. *In vitro* wird die AVSOD2 von *A. viteae* Weibchen in den Kulturüberstand sezerniert und Hinweise aus *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Experimenten zeigten, daß SOD2 auch von anderen Filarienarten sezerniert wird. Das von Henkle-Dühsren *et al.* (Henkle-Dühsren *et al.*, 1997) postulierte 26 Aminosäuren lange Signalpeptid der SOD2 von *O. volvulus* ist in der Lage, *in vitro* den Export der OVSOD2 sowie eines heterologen Passagiers in den Überstand einer Insektenzelllinie zu vermitteln. Des weiteren wurde im Kulturüberstand *in vitro* kultivierter Filarien SOD Aktivität nachgewiesen (Batra *et al.*, 1990; Henkle *et al.*, 1991), und Tang *et al.* konnten CuZn SODs von *B. pahangi* in der Peritonealflüssigkeit infizierter Gerbils nachweisen (Tang *et al.*, 1994). Da in dieser Arbeit sowohl die extrazelluläre, als auch die cytoplasmatische SOD nachgewiesen wurden, handelt es sich hierbei aber möglicherweise um unspezifische Freisetzung beider Enzyme durch disintegrierende Parasiten.

Im Gegensatz zu den cytoplasmatischen SODs von Filarien, deren Aminosäuresequenzen untereinander zu annähernd 90% identisch sind (Matzen, 1994), divergieren die Aminosäuresequenzen der extrazellulären SODs von Filarien stark. So beträgt Identität der Aminosäuresequenz der AVSOD2 zu der SOD2 von *D. immitis* nur 64,6%, zur SOD2 von *B. pahangi* 63,7%, und zur SOD2 von *O. volvulus* 60,8%. Dieser hohe Grad an Divergenz der ansonsten sehr konservierten SODs läßt darauf schließen, daß ein Selektionsdruck auf die Evolution der extrazellulären SODs wirkt. Möglicherweise liegt eine Adaptation der verschiedenen Filarienarten an die jeweiligen Endwirte vor, um die sezernierte SOD vor der Inaktivierung durch neutralisierende Antikörper zu schützen. Für diese Hypothese spricht ebenfalls, daß Adultwürmer von *A. viteae* zwar AVSOD2 sezernieren, die AVSOD2 jedoch nicht stark immunogen zu sein scheint. Brattig *et al.* (Brattig *et al.*, 1997) untersuchten die Immunantwort von Onchozerkosepatienten und konnten zeigen, daß die SOD1 von *O. volvulus* ebenfalls nur schwach immunogen ist, obwohl *in vitro* kultivierte Adultwürmer

von *O. volvulus* SOD sezernieren (Henkle *et al.*, 1991). Seren von Rindern, die mit dem bovinen Lungenwurm *Dictyocaulus viviparus* infiziert, beziehungsweise mit attenuierten *D. viviparus* L3 vakziniert wurden, inaktivieren die SOD des Parasiten und sind in der Lage *in vitro* die Aktivität des Enzyms zu inhibieren (Britton *et al.*, 1994).

Mindestens vier Isoformen der AVSOD2, die sich im Grad der Glykosylierung unterscheiden, konnten durch Western Blot mit dem AVSOD2 spezifischen Antiserum AS1 im Totalhomogenat von adulten *A. viteae* nachgewiesen werden. Das polyklonale  $\alpha$ OVSD1 Hasenserum bindet im Western Blot die selben Proteine wie AS1, reagiert mit der AVSOD1 jedoch stärker als mit der AVSOD2. Die Kreuzspezifität beider Antiseren ist ein Beleg sowohl dafür, daß sich cytoplasmatische und extrazelluläre SODs von Filarien in ihrer Antigenität unterscheiden, als auch dafür, daß zwischen den Filarienarten *A. viteae* und *O. volvulus* eine hohe antigene Homologie besteht (Nogami *et al.*, 1986). Die AVSOD2 ist durch multiple N-Glykosylierung charakterisiert. Mindestens vier prominente Isoformen der AVSOD2, die sich durch das Glykosylierungsmuster unterscheiden, konnten im Western Blot dargestellt werden. Die Behandlung der AVSOD2 mit Endo F / Peptid N Glykosidase F von *F. meningosepticum* führte zur Abspaltung der Kohlenhydratanteile, worauf die AVSOD2 ein einheitliches Migrationsverhalten im SDS-PAGE zeigte. N-Glykosylierung der extrazellulären SOD wurde für *B. pahangi* beschrieben (Ou *et al.*, 1995a), jedoch zeigt die BPSOD2 ein einheitliches Migrationsverhalten, was auf eine homogene Glykosylierung schließen läßt. Bei *O. volvulus* konnte keine N-Glykosylierung nachgewiesen werden (Henkle-Dührsen *et al.*, 1997).

Die mRNAs von AVSOD1 und AVSOD2 konnten in allen Entwicklungsstadien von *A. viteae* über RT-PCR nachgewiesen werden. Die semiquantitative Analyse der Transkriptionsrate beider mRNAs zeigte, daß die Transkriptionsrate der AVSOD2 mRNA im Vergleich zur AVSOD1 mRNA nach der Übertragung der L3 vom Vektor in den Endwirt zunahm. Dies deutet darauf hin, daß die postinvasive L3 von *A. viteae*, wie die übrigen im Endwirt vorkommenden Entwicklungsstadien, eine erhöhte SOD Aktivität benötigt, um den oxidativen Streß nach dem Wirtswechsel neutralisieren zu können. Matzen (Matzen, 1994) konnte durch Triton X-100 Behandlung eine Oxidoreduktase auf der Oberfläche *ex vivo* isolierter postinfektöser L3 darstellen. Während der Häutungsphase von L3 zu L4, die im Entwicklungszyklus von Filarien eine zentrale Rolle spielt, gelang dies hingegen nicht. Während der Häutung von L3 zu L4 werden postinfektöse L3 von *A. viteae* einer Belastungsinfektion von Gerbils abgetötet, die wiederholt mit niedrigen Dosen lebender L3 oder attenuierten mL3 immunisiert worden waren (Eisenbeiss *et al.*, 1994; siehe Kapitel 1). Die Motilität der in Häutung befindlichen Larven ist stark herabgesetzt, des weiteren ist die Sklerotisierung der Kutikula bei der schlüpfenden, sich in der Ecdysis befindenden L4 noch nicht abgeschlossen. Da Antikörper von Seren, die aus vor Re-Infektionen geschützten

Gerbils gewonnen wurden, an die Innenseite der abgestreiften L3 Kutikula binden, wird antikörpervermittelte Zytotoxizität (ADCC, *antibody dependent cytotoxicity*) als Ursache der Abtötung der postinfektiösen L3 angesehen (Eisenbeiss *et al.*, 1994). Folglich sind in diesem Entwicklungsstadium von Filarien essentielle Immunevasionsmechanismen der postinfektiösen L3 inaktiviert. In diesem Zusammenhang könnte die Zunahme der Transkriptionsrate der AVSOD2 mRNA in postinfektiösen L3 stehen. Möglicherweise ist die sezernierte AVSOD2 aber allein nicht in der Lage, den *oxidative burst* der an die L3 Kutikula bindenden Leukozyten, zu neutralisieren.

Die direkte Schädigung von Membranen durch Superoxid ist in seiner physiologischen Bedeutung vermutlich der Oxidation durch Peroxynitrit und  $\cdot\text{OH}$  untergeordnet. Diese beiden ROI sind die Folgeprodukte der Reaktion von Superoxid mit NO und besitzen ein hohes Oxidationspotential (siehe Abbildung 3.1). Als zentrale Funktion extrazellulärer SODs wird deshalb der Schutz der Oberfläche von Zellen oder Organismen vor Oxidation durch die Inaktivierung von Superoxid als Vorläufermolekül bei der Bildung dieser reaktiven Sauerstoffintermediate angesehen (Bannister *et al.*, 1987). So binden Merozoiten von *Plasmodium bergheii*, die nur geringe intrinsische SOD-Aktivität aufweisen, Wirts-SOD auf ihrer Oberfläche (Fairfield *et al.*, 1983). Bei Filarien wurden CuZn SODs in der Hypodermis von *O. volvulus*, *B. pahangi* und *D. immitis* mit spezifischen Antiseren nachgewiesen (Henkle-Dührsen *et al.*, 1997; Ou *et al.*, 1995a; Callahan *et al.*, 1993). Die Hypodermis ist die erste Zellschicht unter der synzytialen Kutikula von Filarien. Durch extrinsische Behandlung von Adultwürmern mit  $\text{Jod}^{135}$  konnte die SOD2 von *B. pahangi* markiert werden (Ou *et al.*, 1995a). Dieser Befund konnte durch eine elektronenmikroskopische Analyse jedoch nicht bestätigt werden. Die Autoren spekulieren, daß die BPSOD2 an spezialisierten, bisher noch nicht charakterisierten, für Sekretion zuständigen Organen für  $\text{Jod}^{135}$  zugänglich ist. Eine funktionelle Oberflächenlokalisierung einer SOD wurde bisher allerdings noch nicht bei Filarien demonstriert.

Bei *D. immitis* wurde eine starke Anfärbung von CuZn SODs durch ein spezifisches Antiserum vor allem im Vas deferens und in stoffwechselaktiven Geweben, zum Beispiel die subtegumentale Längsmuskulatur, erzielt (Callahan *et al.*, 1993). Aufgrund dessen wurde als wichtige physiologische Rolle der SOD von Filarien der Schutz der Spermatozoen vor oxidativen Schädigungen postuliert. Neueste immunohistochemische Untersuchungen bei *O. volvulus* weisen darauf hin, daß die SOD2 weder auf der Oberfläche noch in der Hypodermis der Würmer lokalisiert ist. Ein polyklonales Antiserum, das spezifisch ein synthetisches 15 Aminosäuren langes Peptid der OVSOD2 bindet, färbte nur den Intestinaltrakt von Männchen und Weibchen von *O. volvulus* (Wildenburg und Henkle-Dührsen, 1999). Die Färbung von Hypodermis, Uterus oder Mikrofilarien, die in einer früheren Studie der Autoren beobachtet wurde (Henkle-Dührsen *et al.*, 1997) wird auf die

Kreuzreaktivität des verwendeten Serums mit der OVSOD1 zurückgeführt. Eine massive Sekretion der SOD2 in das Lumen des Darms kann dennoch zur Sekretion des Enzyms führen und so die Präsenz von SOD-Aktivität im Kulturüberstand *in vitro* kultivierter Adultwürmer erklären. Mikrofilarien von *O. volvulus* werden nicht durch dieses OVSOD2-spezifische Antiserum angefärbt, Mikrofilarien vom *B. pahangi* (Ou *et al.*, 1995a) und *A. viteae* hingegen exprimieren SOD2. Vergleichende Untersuchungen dieser Spezies durch SOD-spezifische RT-PCR könnte zur weiteren Untersuchung dieser Beobachtung beitragen.

Als Abbauprodukt von Superoxid durch SOD entsteht neben Wasser das ebenfalls zytotoxische  $H_2O_2$ , das darüber hinaus eine Vorstufe in der Entstehung der reaktiven Hypochlorsäure darstellt (Callahan *et al.*, 1988). Daraus läßt sich ableiten, daß Filarien zusätzliche Enzymsysteme benötigen, um die Folgeprodukte der Neutralisierung von Superoxid durch SODs zu inaktivieren. Im Kulturüberstand *in vitro* kultivierter Filarien wurde allerdings nur geringe Katalaseaktivität nachgewiesen. Katalase spielt demnach bei der Immunevasion von Filarien eine untergeordnete Rolle, offensichtlich kommen andere Mechanismen zu tragen. Mf von *Onchocerca cervicalis* weisen nur eine geringe Katalaseaktivität und eine hohe Sensitivität gegen  $H_2O_2$  auf (Callahan *et al.*, 1990), während Adultwürmer und Mikrofilarien von *B. malayi in vitro* gegen  $H_2O_2$  resistent sind (Ou *et al.*, 1995b). Lymphatische Filarien exprimieren eine oberflächenständige GSH-Px, die ein Hauptoberflächenantigen darstellt (Cookson *et al.*, 1992; Cookson *et al.*, 1993). Dieses oberflächenständige gp29 unterscheidet sich von cytoplasmatischen GSH-Px durch den Austausch von Selenocystein zu Cystein im aktiven Zentrum.  $H_2O_2$  stellt jedoch nicht das Substrat von gp29 dar, sondern Peroxide von Membranlipiden (Tang *et al.*, 1996). Die Schutzwirkung von gp29 ist demnach indirekt, da durch  $H_2O_2$  oxidierte Membranlipide wiederhergestellt werden. Bei *O. volvulus* konnte nur geringe GSH-Px Aktivität nachgewiesen werden. *O. volvulus* kompensiert den Mangel an GSH-Px vermutlich durch Sekretion einer Glutathion S-transferase, deren Substratspezifität allerdings noch nicht bestimmt wurde (Liebau *et al.*, 1994; Liebau *et al.*, 1996) und einer in der Kutikula lokalisierten Thioredoxin Peroxidase, deren Transkript in allen Entwicklungsstadien nachzuweisen ist und bei L3 ein abundantes Transkript darstellt (Lu *et al.*, 1998).

Neben einer direkten wird eine indirekte Schutzwirkung einer sezernierten SOD diskutiert (Callahan *et al.*, 1988; Selkirk *et al.*, 1998), denn sezernierte SOD wirkt anti-inflammatorisch, indem sie Superoxid aus der näheren Umgebung der Parasiten inaktiviert und so die Aktivierung eines Chemotaxisfaktors für neutrophile Granulozyten verhindert (Petroni *et al.*, 1980). Tatsächlich findet man in der Umgebung von *ex vivo* isolierten Adultwürmern von *A. viteae* keine Anzeichen inflammatorischer Prozesse (eigene Beobachtung), während die Bindegewebsknoten (Onchozerkomata) von *O. volvulus* und

tierpathogenen *Onchocerca* Arten massiv von Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen infiltriert sind (Burchard *et al.*, 1979; Wildenburg *et al.*, 1997). In den Onchozerkomata selbst, die vitale Adultwürmer enthielten, konnte die Degranulation von Granulozyten und Mastzellen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, daß die Adultstadien von Filarien außerordentlich resistent gegen den *oxidative burst* aktivierter Effektorzellen des Immunsystems sind. Im Gegensatz dazu sind die postinfektiösen larvalen Stadien von Filarien suszeptibel sowohl gegen Antikörper vermittelte, als auch gegen komplementabhängige Zytotoxizität (Lange *et al.*, 1994; Brattig *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1994). Insofern käme der Inaktivierung der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten durch sezernierte SOD bei der Immunevasion der postinfektiösen L3 große Bedeutung zu. Offensichtlich werden Filarien-SODs vom Immunsystem der jeweiligen Wirte schlecht erkannt (Abbildung 3.9; Brattig *et al.*, 1997), obwohl Adultwürmer *in vitro* SOD in den Kulturüberstand sezernieren. *In vivo* bedeutet dies einen kontinuierlichen Stimulus des Immunsystems über einen langen Zeitraum hinweg und weist darauf hin, daß SODs von Filarien immunologisch inert zu sein scheinen. Eine Stimulation des Wirtsimmunsystems durch eine Vakzinierung mit rekombinanter SOD2, die zur Induktion einer protektiven Immunantwort führt, könnte eine schutzvermittelnde Wirkung gegen eine Infektion mit Filarien herbeiführen.

### **3.4 Zusammenfassung**

Die vollständige cDNA der extrazellulären CuZn SOD der Filarie *A. viteae* wurde durch RT-PCR kloniert und im Anschluß charakterisiert. Die 793 Nukleotide lange AVSOD2 mRNA kodiert für ein naszierendes Protein von 195 Aminosäuren Länge, das ein N-terminales Signalpeptid aufweist. Am 5' Ende weist die AVSOD2 mRNA den charakteristischen spliced leader auf, der unmittelbar an das putative Startkodon der mRNA fusioniert ist. Western Blot Analysen zeigten, daß die AVSOD2 *in vivo* in mindestens vier Isoformen vorliegt, die sich im Grad der Glykosylierung an den vier aus der Primärsequenz abgeleiteten Erkennungssequenzen für N-Glykosylierung unterscheiden. Semiquantitative Expressionsanalysen durch RT-PCR zeigten, daß die Transkriptionsrate der AVSOD2 mRNA nach dem Transfer der Parasiten in den Endwirt im Vergleich zur AVSOD1 mRNA zunimmt. Diese Hochregulierung der AVSOD2 mRNA steht möglicherweise im Zusammenhang mit erhöhtem oxidativem Stress, mit dem die Entwicklungsstadien, die im Endwirt leben, konfrontiert sind. Rekombinante AVSOD2 wird von Immunseren patentier Gerbils nur in geringem Ausmaß erkannt. Da die AVSOD2 *in vivo* und *in vitro* kontinuierlich sezerniert wird liegt hier wahrscheinlich ein Adaptationsmechanismus von Filarien an den



Endwirt vor, der die sezernierte SOD vor der Inaktivierung neutralisierender Antikörper schützt.

**Dieses Kapitel wurde unter folgendem Titel veröffentlicht:**

Lattemann, C.T., Matzen, A. und Apfel H. (1999). Up-regulation of extracellular copper/zinc superoxide dismutase mRNA after transmission of the filarial parasite *Acanthocheilonema viteae* in the vertebrate host *Meriones unguiculatus*. International Journal for Parasitology. In Druck.

## **4 Immunogenität der rekombinanten AVSOD2 präsentiert durch einen attenuierten Lebendvakzinstamm von *S. typhimurium***

### **4.1 Einleitung**

Vakzinstämme verschiedener Gram negativer Pathogene haben sich als effiziente Träger für die *in vivo* Präsentation rekombinanter Antigene erwiesen. Als Rationale hinter diesem Konzept steht die Fähigkeit dieser attenuierten Humanpathogene eine selbstlimitierende symptomlose Infektion hervorzurufen, durch die das Immunsystem des Impflings stimuliert wird. Die Applikation dieser lebend attenuierten Vakzinen verläuft analog des natürlichen Infektionswegs über die orale Route. Nach der Passage des Magens invadieren enteropathogene Gram-negative Bakterien der Gattungen *Salmonella*, *Yersinia* und *Shigella* die sogenannten M-Zellen in den Peyer'schen Plaques über spezifische rezeptorvermittelte Mechanismen (Zychlinsky *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1994; Autenrieth und Firsching, 1996). Charakteristisch für eine Infektion mit Salmonellen und Yersinien ist, im Anschluß der Passage durch die M-Zellen, der Tropismus dieser Organismen für die immunkompetenten Organe Leber und Milz, wohin sie vermutlich in infizierten Makrophagen gelangen (Frey und Neutra, 1997).

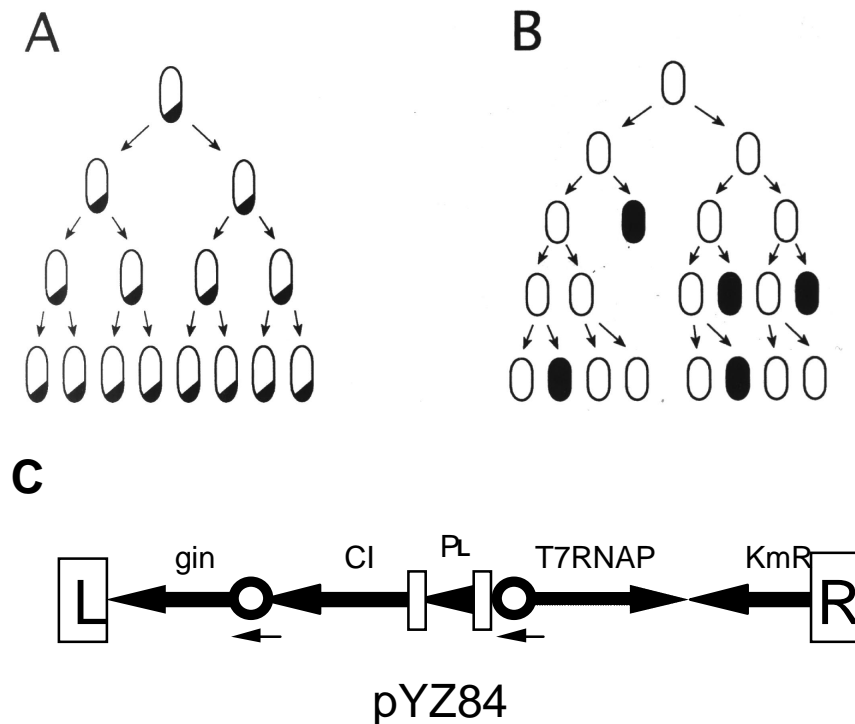
Während der erste zugelassene Humanvakzinstamm *Salmonella typhi* Ty21A (Gilman *et al.*, 1977) noch aus ungerichteter chemischer Mutagenese hervorgegangen war, werden nun aus Gründen der Biosicherheit definierte Mutationen in Gene eingeführt, die die Invasivität des betreffenden Organismus herabsetzen. Die Einführung attenuierender Mutationen zur Herstellung von Lebendvakzinstämmen wird durch (a) zu einer Auxotrophie führenden Inaktivierung von essentiellen Stoffwechselwegen, die im Impfling nicht supplementiert werden kann, (b) Mutationen in Regulatorgenen, die die Expression *in vivo* induzierter Gene steuern und (c) das direkte Ausschalten von Virulenzfaktoren erreicht. Als bekanntes Beispiel für die Inaktivierung eines Stoffwechselweges zur Herstellung attenuierter *Salmonella* Stämme dient der Chorismatbiosyntheseweg (Hoiseth und Stocker, 1981). Das Ausschalten des *aroA* Gens, das für 3-Enolpyruvylshikimat-5-phosphat-Synthase kodiert, führt zur Auxotrophie des *S. typhimurium* Stammes SL3261 für alle aromatischen Aminosäuren. Da die Konzentration freier aromatischer Aminosäuren im Wirt limitiert ist, bewirkt dies die Eliminierung der Bakterien *in vivo* nach wenigen Generationen. Auf dieser Basis wurde der Humanvakzinstamm CVD 908 aus dem *S. typhi* Stamm Ty2 durch Deletion von *aroC* und *aroD* entwickelt (Tacket *et al.*, 1992b; Tacket *et al.*, 1992a). Wahrscheinlich

ist der Grad der Attenuierung der *aro* Mutanten zusätzlich von wirtsspezifischen Faktoren bestimmt. Im Meerschweinchen sind *aroA* Mutanten von *Y. pestis* avirulent, während sie in der Maus volle Virulenz zeigen (Oyston *et al.*, 1996). Ähnliches wurde auch für den *S. typhi* Humanvakzinstamm CVD 908 beobachtet, der offenbar bei einem gewissen Prozentsatz der Probanden eine leichte Bakteriämie auslöste. Mutationen im Regulatorgen *phoP* führen zu einem pleiotropen Effekt der die Überlebensfähigkeit von *S. typhimurium* in Phago lysosomen von Makrophagen herabsetzt (Miller *et al.*, 1989; Galan und Curtiss, 1989). Die Gene *phoP* als Regulator und *phoQ* als Sensor bilden ein Zwei-Komponenten Regulatorsystem, das auf extrinsische Signale hin die Genexpression von sogenannten *pag* (*phoP* *activated genes*) und *prg* (*phoP* *repressed genes*) Genen reguliert. Die Bedeutung dieses Regulons für die Invasivität von *Salmonella* wird durch Deletionen in den *phoPQ* regulierten Loci *pagC*, *pagD* und *prgH* unterstrichen, die attenuierend wirken (Miller *et al.*, 1993). Die Eignung des in *phoPQ* deletierten *S. typhi* Vakzinstamms Ty800 wird zur Zeit in klinischen Studien überprüft (Hohmann *et al.*, 1996). Neben den *pag* und *prg* Genen wurden weitere Virulenzgene als potentielle Angriffspunkte für eine Attenuierung ausgeschaltet. Die Deletion des *sodA* Gens von *Y. enterocolitica* führt zu einer signifikanten Reduktion der Kolonisierung von Milz und Leber im Mausmodell, während die Proliferation im Darm und den Peyer'schen Plaques nicht beeinträchtigt war (Roggenkamp *et al.*, 1997). Zusätzlich zu dieser Attenuierung wurden Mutanten im *yadA* oder *irp* Locus, untersucht. Immunisierungsexperimente im Mausmodell lassen zeigen, daß alle drei Stämme als Vakzine gegen eine Infektion mit *Y. enterocolitica* geeignet zu sein scheinen (Igwe *et al.*, 1998). Des weiteren wird die attenuierende Wirkung von Deletionen in der zweiten bei Salmonellen charakterisierten Pathogenitätsinsel (SPI2, *Salmonella pathogenicity island 2* (Shea *et al.*, 1996)) untersucht, die essentiell für das intrazelluläre Überleben von Salmonellen in Makrophagen ist (C.J. Hueck, persönliche Mitteilung). Kombinationen der einzelnen Strategien werden zur weiteren Abschwächung der Vakzinstämme genutzt, zum Beispiel eine Kombination von Deletionen in *aro* Genen mit der Deletion in *htrA*, eines Hitzeschockproteins (Chatfield *et al.*, 1992b; Tacket *et al.*, 1997).

Obwohl Salmonellen in phago lysosomalen Kompartimenten verbleiben (Hueck, 1998), vermögen mit Salmonellen infizierte Makrophagen antigenspezifische Peptide sowohl über MHC I als auch über MHC II Moleküle zu präsentieren (Pfeifer *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1993; Wick *et al.*, 1994). Dies zeigte sich im Tiermodellen und beim Menschen, wo durch eine Immunisierung mit rekombinanten attenuierten *Salmonella* Stämmen, die heterologe Antigene exprimieren, sowohl zytotoxische als auch humorale Immunantworten, die spezifisch gegen diese Antigene gerichtet waren, induziert werden konnten (Maskell *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1987; Turner *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 1994; Hopkins *et al.*, 1995). Des

weiteren wurde die protektive Wirkung von rekombinanten attenuierten *Salmonella*-Vakzinen im Tierversuch gegen Belastungsinfektionen mit viralen, bakteriellen und parasitischen Krankheitserregern gezeigt. Die Expression des Nukleoproteins des Influenza A Virus in attenuierten *Salmonella* Stämmen war ebenso schutzvermittelnd gegen eine homologe Belastungsinfektion (Tite *et al.*, 1990), wie die Expression des M Proteins von Streptokokken (Poirier *et al.*, 1988), des *Leishmania* Antigens gp63 (Yang *et al.*, 1990) oder Urease von *Helicobacter pylori* (Corthésy-Theulaz *et al.*, 1998; Gomez-Duarte *et al.*, 1998). Um eine Immunantwort effizient induzieren zu können, muß das rekombinante Antigen *in vivo* in großen Mengen über einen gewissen Zeitraum dem Immunsystem präsentiert werden. Die Expression großer Mengen rekombinanter Antigene in *Salmonella* interferiert jedoch häufig mit der Vitalität der Trägerbakterien *in vivo* und resultiert deshalb in einer suboptimalen Stimulation des Immunsystems (Abbildung 4.1A). Die intrinsische Toxizität heterologer Antigene führt bei konstitutiver Expression häufig zur schnellen Eliminierung des Trägerstamms *in vivo* (Khan *et al.*, 1994; Oyston *et al.*, 1995). Um die stabile Expression heterologer Antigene in *Salmonella* Stämmen zu erreichen, wurde das Konzept des Zwei-Phasen-Expressionsystems entwickelt (Yan *et al.*, 1990). Dazu wurde das Polymerase/Promotor System des Bakteriophagen T7 (Tabor und Richardson, 1985) mit einem temperaturabhängigen phasenvariablen Element kombiniert (Yan und Meyer, 1994; Yan und Meyer, 1996). Dies führt zur Aufspaltung der Population des Vakzinestamms in eine Subpopulation, die große Mengen rekombinanten Antigens exprimiert und einer zweiten Subpopulation, die phänotypisch dem Wildtyp gleicht (Abbildung 4.1B). Während die Antigen exprimierenden Zellen durch die hohe Antigenproduktion zugrunde gehen, erneuert die phänotypische Wildtyp-Population durch Phasenvariation den Pool der antigenexprimierenden Zellen. Die Expression des heterologen Antigens, dessen Gen auf einem Plasmid *in trans* unter der Kontrolle des T7 Promotors ( $P_{T7}$ ) vorliegt, wird durch eine Zwei-Phasen-Expressionskassette gesteuert, die in das Chromosom des *aroA* attenuierten *S. typhimurium* Vakzinestamms SL3261::pYZ84 integriert wurde (Abbildung 4.1.1C) (Yan und Meyer, 1996). Der  $P_L$  Promotor des Bakteriophagen  $\lambda$  wurde in das invertierbare G-Element des Bakteriophagen Mu inseriert und wird durch den hitzelabilen Repressor  $Ci^{857}$  reprimiert. In der OFF Position kontrolliert  $P_L$  die Expression des Enzyms *gin* Invertase. Während der Kultivierung des Vakzinestamms bei 28°C wird der  $P_L$  Promotor durch  $Ci^{857}$  reprimiert, bei erhöhten Temperaturen *in vivo* wird durch Derepression des  $P_L$  Promotors die Expression der *gin* Invertase induziert. *Gin* Invertase bindet an die *inverted repeats* des G-Elements und bewirkt die Inversion des  $P_L$  Promotors der nun die Transkription des Gens der RNA-Polymerase des T7 Phagen (T7RNAP) aktiviert. Durch T7RNAP wird schließlich die Transkription des *in trans* auf dem Expressionsvektor lokalisierten heterologen Antigens induziert, was zur Expression großer Mengen der rekombinanten Untereinheiten A und B

der Urease von *H. pylori* und des Nef Proteins des HIV führte (Yan und Meyer, 1994; Yan und Meyer, 1996).



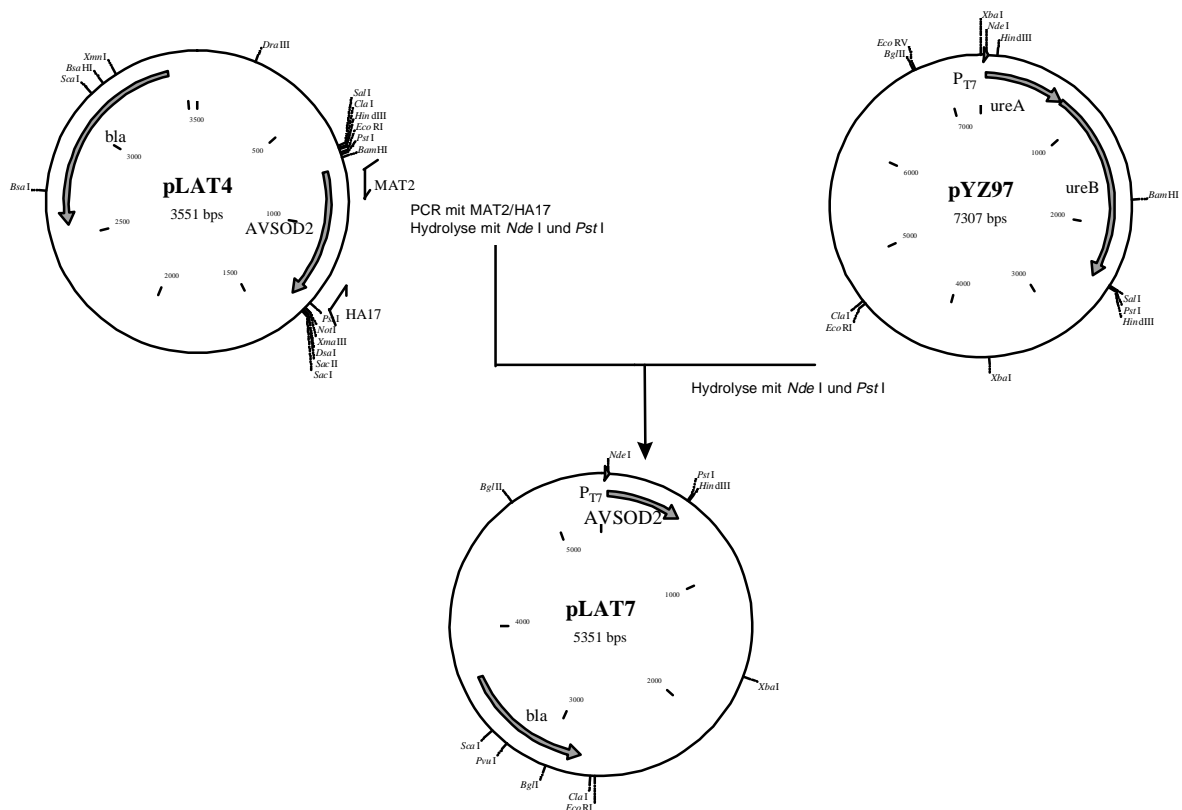
**Abbildung 4.1: Zwei-Phasen-System zur stabilen Expression von Fremdantigenen in Vakzinstämmen von *S. typhimurium*.** (A): Konstitutive Expression des heterologen Antigens führt aufgrund intrinsischer Toxizität häufig zu verminderter Fähigkeit des Trägerstamms zur Kolonisierung. (B): Das Zwei-Phasen-System erlaubt die Expression großer Antigenmengen unter Erhaltung der Kolonisierungsfähigkeit des nicht rekombinanten Trägerstamms. (C): Schematische Darstellung des phasenvariablen Elements im Chromosom des Vakzinstamms SL3261::pYZ84. gin: *gin* Invertase; CI: hitelabiler  $\text{CI}^{857}$   $\lambda$ -Repressor;  $P_L$ :  $\lambda$   $P_L$ -Promotor; T7RNAP: RNA-Polymerase des T7-Phagen; KmR: Kanamycin Resistenzgen; L und R linker bzw. rechter *inverted repeat* des Transposons Tn7. (A) und (B) wurden aus (Yan und Meyer, 1996), (C) aus (Yan und Meyer, 1994) entnommen.

## 4.2 Ergebnisse

CuZn Superoxid Dismutasen gelten als Virulenzfaktoren von Filarien (Kapitel 3). Bislang liegen jedoch nur wenige Daten über die Eignung dieser Enzyme als Vakzine gegen Filarieninfektionen vor. Rekombinante SOD2 von *O. volvulus* wurde Gerbils mit verschiedenen Adjuvantien appliziert, bei den immunisierten Tieren konnte jedoch keine Serokonversion beobachtet werden (Lucius, 1995). Um das immunogene Potential der AVSOD2 in einer attenuierten *Salmonella* Vakzine zu untersuchen, wurde die cDNA der AVSOD2 in *aroA* attenuierten Vakzinstämmen von *S. typhimurium* SL3261 zur Expression gebracht und Gerbils mit diesen rekombinanten Vakzinstämmen immunisiert.

### 4.2.1 Subklonierung der rAVSOD2 in *aroA* attenuierten Vakzinstämmen von *S. typhimurium*

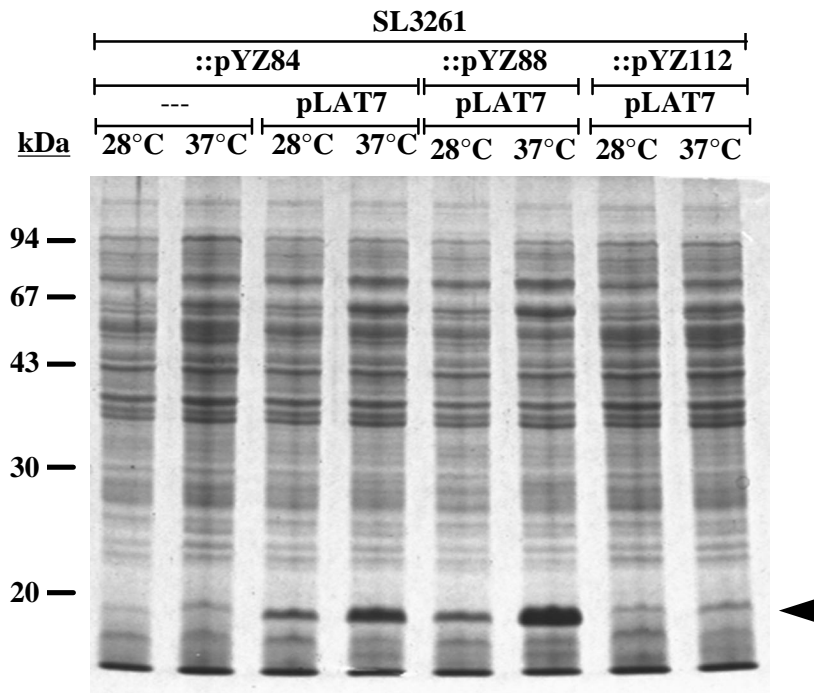
Die cDNA der AVSOD2 wurde durch PCR mit Oligonukleotidprimern MAT2 und HA17 amplifiziert. Als Matrix diente das Plasmid pLAT4, in dem die am 3' Ende unvollständige cDNA der AVSOD2 vorliegt (Lattemann, 1995). Der (+) Primer MAT2 bindet in der cDNA der AVSOD2 stromabwärts des Signalpeptids und trägt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Nde* I. Dies erlaubte die Insertion der AVSOD2 cDNA in das Startkodon von des Expressionsvektors pYZ97 (Yan und Meyer, 1994). Das 490 bp große MAT2/HA17 Amplifikationsprodukt der AVSOD2 cDNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Nde* I und *Pst* I hydrolysiert und in den entsprechend vorbereiteten T7 Expressionsvektor pYZ97 inseriert (Abbildung 4.2). Bedingt durch die Strategie der RT-PCR, die für die Klonierung der cDNA AVSOD2 gewählt wurde (Lattemann, 1995), ist das subklonierte cDNA-Fragment der AVSOD2 am 3' Ende um 42 Nukleotide verkürzt. Die *aroA* attenuierten *S. typhimurium* Vakzinstämme SL3261::pYZ84 (Yan und Meyer, 1996), SL3261::pYZ88 (Yan *et al.*, 1997) sowie SL3261::pYZ112 und SL3261::pYZ113 (Z.-X. Yan, nicht veröffentlichte Daten) wurden mit dem resultierenden Expressionsplasmid pLAT7 transformiert und für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Die T7 Expressionskassette im Plasmid pYZ88 unterscheidet sich durch eine höhere Expressionsrate von pYZ84, während die *inverted repeats* des G Elements in pYZ112 und pYZ113 verkürzt sind, was zu einer verringerten Inversionsfrequenz des P<sub>L</sub> Promotors führt (Z.-X. Yan, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 4.2: Strategie zur Subklonierung der cDNA der AVSOD2 in den T7 Expressionsvektor pYZ97.** Die cDNA der AVSOD2 wurde durch PCR mit MAT2/HA17 amplifiziert, mit *Nde* I und *Pst* I hydrolysiert und in den entsprechend vorbereiteten Vektor pYZ97 inseriert.

#### 4.2.2 Expression der rAVSOD2 in *S. typhimurium*

Die Expression der rAVSOD2 in *S. typhimurium* wurde durch SDS-PAGE untersucht. Zur Induktion der rAVSOD2 wurden die mit pLAT7 transformierten *S. typhimurium* Vakzinstämme üN entweder bei 28°C oder 37°C in LBamp<sup>100</sup> schüttelnd inkubiert. Gleiche Mengen der Ganzzellsate wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (Abbildung 4.3). Bei 37°C angezchtet, produzieren SL3261::pYZ84/pLAT7 und SL3281::pYZ88/pLAT7 große Mengen der rAVSOD2, während in den Lysaten von SL3261::pYZ112/pLAT7 und SL3261::pYZ113/pLAT7 (nicht gezeigt) nur sehr geringe Mengen rAVSOD2 exprimiert wurden, die durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue nicht nachgewiesen werden konnten. Bei Kultivierung unter reprimierenden Bedingungen bei 28°C wurde bei SL3261::pYZ84/pLAT7 und SL3281::pYZ88/pLAT7 eine Hintergrundexpression der rAVSOD2 beobachtet. Im Western Blot reagierte das gegen die SOD1 von *O. volvulus* gerichtete Hasenserum sowie das AVSOD2 spezifische Serum AS1 mit der rAVSOD2 (nicht gezeigt), die im Polyacrylamid Gel bei etwa 17 kDa migriert.



**Abbildung 4.3: SDS-PAGE Analyse der Expressionsstärke der rAVSOD2 in verschiedenen *S. typhimurium* Vakzinstämmen.** Gleiche Mengen Totalhomogenat von SL3261::pYZ84, -::pYZ84/pLAT7, -::pYZ88/pLAT7 und -::pYZ112/pLAT7 wurden in einem 12,5 % Polyacrylamid Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Pfeilspitze markiert das Molekulargewicht der rAVSOD2.

#### 4.2.3 Untersuchung der Stabilität von pLAT7 *in vitro* und *in vivo*

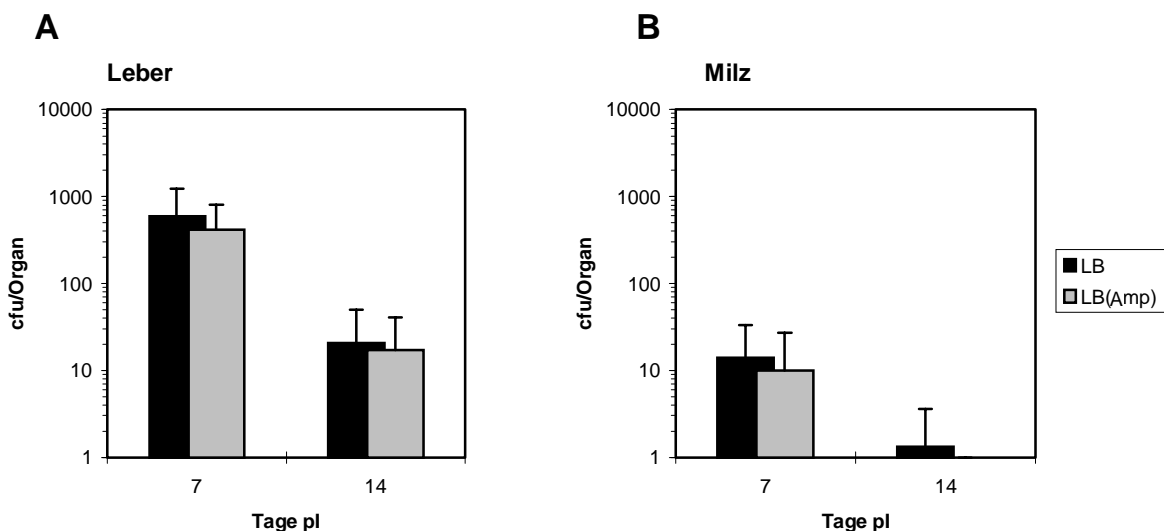
Um eine effiziente Antigenpräsentation durch rekombinante Lebendvakzinen zu gewährleisten, ist eine hohe Stabilität des Expressionsplasmids ohne Selektion durch Antibiotika erforderlich. Die Stabilität von pLAT7 *in vitro* wurde in den verschiedenen Vakzinstämmen durch mehrmaliges Passagieren der Bakterien ohne Antibiotikaselektion untersucht. Dazu wurden 10 ml LB -Medium mit 10 µl einer stationären üN Kultur (28°C, LBamp<sup>100</sup>) der verschiedenen Vakzinstämmen inokuliert und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach jeweils 12 h wurden Verdünnungsreihen der Kulturen auf selektivem und nicht-selektivem Medium ausplattiert sowie wiederum LB-Medium für weitere Passagen von 12 h inokuliert. In SL3261::pYZ84, SL3261::pYZ112 und SL3261::pYZ113 wird pLAT7 über drei beziehungsweise 4 Passagen von jeweils 12 h ohne Selektion durch Ampicillin stabil propagiert (Tabelle 4.1). Im Gegensatz dazu sinkt der prozentuale Anteil ampicillinresistenter Klone bei SL3261::pYZ88/pLAT7 bereits nach einer Passage auf 50 % ab. Nach zwei Passagen sind noch 0,1 % der Salmonellen ampicillinresistent.



	Prozent ampicillinresistenter Klone			
	SL3261			
Passagen à 12h	::pYZ84	::pYZ88	::pYZ112	::pYZ113
1	100	50	100	92
2	95	0,1	100	91
3	100	0	92	85
4	85	n.g.	n.g.	n.g.

**Tabelle 4.1: Stabilität von pLAT7 *in vitro*.** Die Stabilität von pLAT7 in den *S. typhimurium* Vakzinstämmen SL3261::pYZ84, ::pYZ88, pYZ112 und ::pYZ113 wurde durch mehrmaliges Passagieren ohne Selektion durch Ampicillin untersucht. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils ampicillinresistenter Bakterien wurden Verdünnungen der Kulturen auf selektivem und nicht selektivem Medium plattiert und nach Inkubation üN bei 28°C analysiert. n.g.: nicht getestet.

Aus Abbildung 4.3 und Tabelle 4.1 geht hervor, daß SL3261::pYZ84/pLAT7 für Vakzinierungsexperimente am geeignetsten scheint. Dieser Vakzin Stamm exprimiert nach Induktion große Mengen rAVSOD2 und propagiert den Expressionsvektor stabil über einen langen Zeitraum. Um die Stabilität von pLAT7 *in vivo* zu untersuchen wurden adulte Gerbils mit  $5 \times 10^8$  cfu SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert. Sieben beziehungsweise 14 Tage nach der Immunisierung wurden die Tiere abgetötet, Leber und Milz entnommen und in sterilem H<sub>2</sub>O homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend auf selektiven und nicht-selektiven LB-Platten ausplattiert und üN bei 28°C inkubiert (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4: *In vivo* Stabilität von pLAT7.** Die Organe mit  $5 \times 10^8$  cfu SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisierter Gerbils wurden an Tag sieben (n=6, zwei unabhängige Experimente) und 14 (n=3) entfernt, homogenisiert und auf LB-Platten mit oder ohne Ampicillin (100 mg/ml) plattiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte nach Inkubation üN bei 28°C.

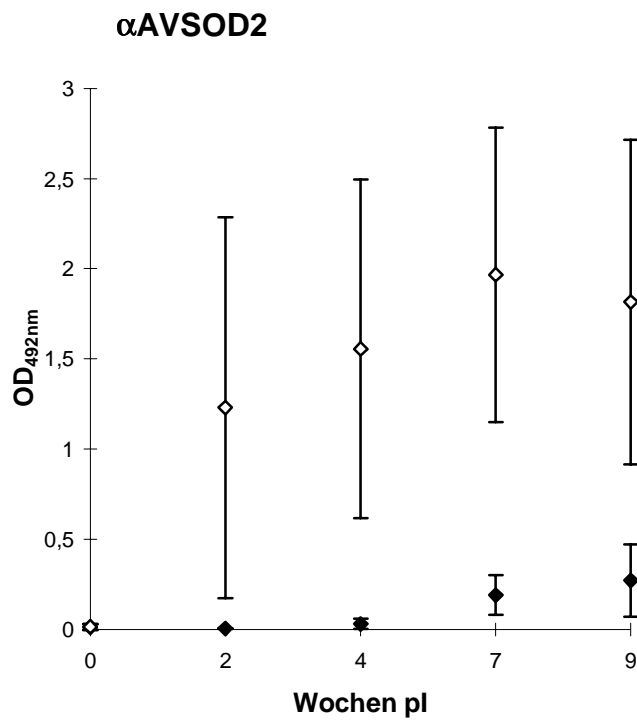
Durchschnittlich konnten an Tag sieben 590 cfu, an Tag 14 20 cfu aus der Leber sowie 14 cfu aus der Milz an Tag sieben isoliert werden. An Tag 21 konnten keine Salmonellen aus immunisierten Gerbils isoliert werden. Dies bestätigt, daß Mutationen in *aroA* eine sichere Methode darstellen, um *Salmonella* Stämme effizient zu attenuieren. Die Anzahl der reisolierten Salmonellen schwankte beträchtlich unter den einzelnen Individuen. An Tag sieben variierte die Zahl der aus Leber isolierten Salmonellen zwischen 0 cfu und 1540 cfu. Zu jedem Zeitpunkt lag der Anteil der ampicillinresistenten Salmonellen bei etwa 70 %. 96% Prozent der Klone, die von LB-Platten isoliert wurden, waren resistent gegen Ampicillin. Sechs an Tag sieben isolierte, zufällig ausgewählte ampicillinresistente Klone wurden zur Überprüfung der Expression von rAVSOD2  $\Delta$ N angezogen und durch SDS-PAGE untersucht. Alle Klone exprimierten rAVSOD2 (nicht gezeigt).

Analog zu den Experimenten *in vitro* war die *in vivo* Stabilität von pLAT7 im hochexprimierenden Stamm SL3261::pYZ88 drastisch reduziert. Zu keinem Zeitpunkt konnten ampicillinresistente Klone aus Leber und Milz immunisierter Gerbils isoliert werden (nicht gezeigt).

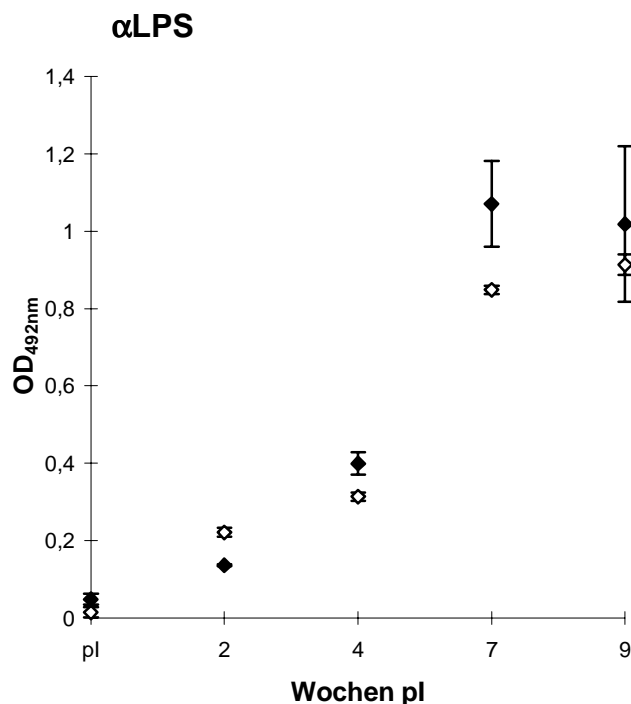
#### **4.2.4 Der rekombinante *Salmonella* Lebendvakzinstamm SL3261::pYZ84/pLAT7 induziert eine spezifische humorale Immunantwort gegen die AVSOD2 in oral immunisierten Gerbils**

Die humorale Immunantwort mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisierter Gerbils wurde durch ELISA und Western Blot untersucht. Die Tiere wurden mit jeweils  $5 \times 10^8$  cfu des Vakzinstamms SL3261::pYZ84/pLAT7 oder des nicht rekombinanten Parentalstamms SL3261::pYZ84 oral immunisiert oder erhielten als Kontrolle sterile Saline. In Woche fünf erfolgte eine Booster-Immunsierung nach dem selben Protokoll. Die Gerbils der Versuchsgruppe, die mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert worden war, entwickelten nach der ersten Immunisierung eine spezifische humorale Immunantwort gegen rAVSOD2 im ELISA (Abbildung 4.5A). Durch die Booster-Immunsierung konnte die Antikörperantwort der immunisierten Tiere weiter gesteigert werden, zwei Wochen nach der Booster-Immunsierung erreichte die Reaktivität der Seren das Maximum und nahm leicht bis Woche sieben ab. Die Seren von Tieren, die mit dem Parentalstamm SL3261::pYZ84 immunisiert wurden (Abbildung 4.5A) oder Saline erhielten (nicht gezeigt) reagierten nicht mit rAVSOD2.

A

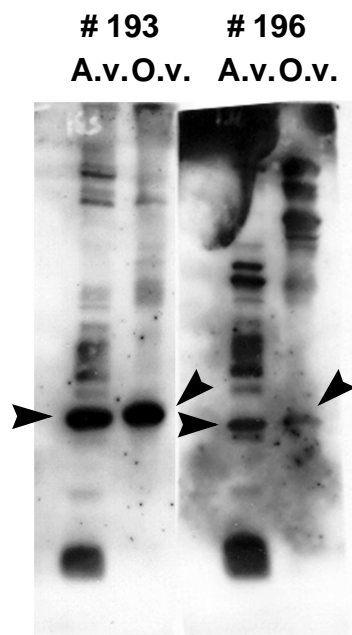


B



**Abbildung 4.5: Humorale Immunantwort von Gerbils gegen rAVSOD2 und *Salmonella* LPS.** Die humorale Immunantwort von Gerbils, die mit SL3261::pYZ84/pLAT7 (n=6; weiße Rauten) oder SL3261::pYZ84 (n=5; schwarze Rauten) oral immunisiert wurden, wurde im ELISA gegen **(A)** aufgereinigte rAVSOD2 (50 ng/well) und **(B)** *Salmonella* LPS untersucht. Die Seren der immunisierten Tiere wurden zwei, vier, sieben und neun Wochen nach der ersten Immunisierung gewonnen und in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Ein nicht serokonvertiertes Tier wurde aus der Studie ausgeschlossen.

Die Antikörperantwort gegen LPS von *S. typhimurium* war in den Versuchsgruppen, die mit SL3261::pYZ84 oder SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert worden waren, ähnlich (Abbildung 4.5B), während keine Antikörper gegen LPS bei Tieren, die Saline erhalten hatten, nachgewiesen werden konnten (nicht gezeigt). Dies zeigt, daß die Fähigkeit zur Kolonisierung von SL3261::pYZ84/pLAT7 nicht durch die Expression der AVSOD2 beeinträchtigt war. Die Reaktivität der Immunsereen von vakzinierter Tieren wurde im Western Blot mit Totalhomogenat von *A. viteae* und der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* untersucht. Die Seren Immunisierter erkennen die SOD1 bei ~19 kDa und die multiplen SOD2 Isoformen zwischen 23 und 29 kDa im Totalhomogenat von *A. viteae* Weibchen, und binden im *O. volvulus* Homogenat an eine ~19 kDa große Proteinbande in der OVSOD1 und OVSOD2 komigrieren (Abbildung 4.6). Tiere die mit nicht rekombinanten SL3261::pYZ84 immunisiert worden waren, reagierten nicht mit dem Totalhomogenat beider Filarienarten (nicht gezeigt). Die Seren von Gerbils, die mit SL3261::pYZ88/pLAT7 immunisiert worden waren, reagierten weder im ELISA noch im Western Blot mit den SODs von Filarien.

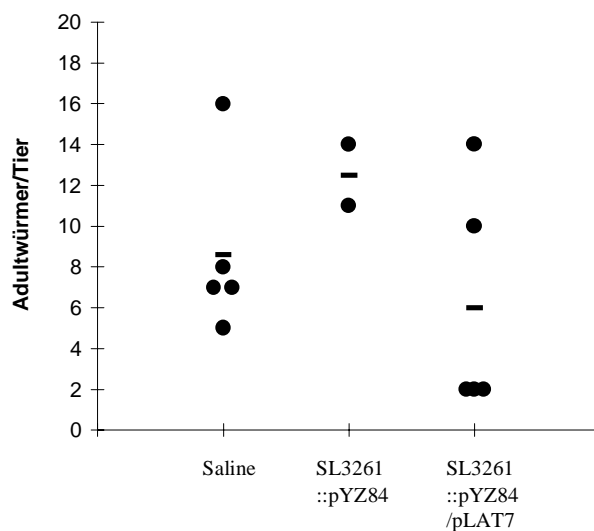


**Abbildung 4.6:** Immunsereen von Wüstenrennmäusen erkennen native SOD1 und SOD2. Totalhomogenat von *A. viteae* (A.v.) und *O. volvulus* (O.v.) Weibchen wurde durch 15% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Die Membran wurde mit einer 1:100 Verdünnung von Seren mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisierter Gerbils inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden durch ECL nachgewiesen. Die Pfeilspitzen markieren die SOD1 von *A. viteae* sowie SOD1 und SOD2 von *O. volvulus*. Im *A. viteae* Homogenat erkennen die Seren multiple SOD2 Banden zwischen 22 und 29 kDa. Die Färbung durch beide Seren ist repräsentativ.

	Saline	SL3261::pYZ84	SL3261::pYZ84 /pLAT7	SL3261::pYZ88 /pLAT7
Expression der rAVSOD	n.g.	-	+++	++++
Stabilität von pLAT7 <i>in vitro</i>	n.g.	n.g.	+++	-
Stabilität von pLAT7 <i>in vivo</i>	n.g.	n.g.	++	-
Immunantwort	-	-	+++	-

**Tabelle 4.2.:** Tabellarische Zusammenfassung der Eigenschaften der für Immunisierungsexperimente eingesetzten *S. typhimurium* Vakzinstämme. n.g.: nicht getestet; +: relatives Maß für Stärke der Expression, induzierter Immunantwort oder Plasmidstabilität; -: keine Expression; Immunogenität oder Stabilität.

Zur Überprüfung des immunprotektiven Potentials von SL3261::pYZ84/pLAT7 wurde ein Protektionsexperiment durchgeführt. Versuchsgruppen von jeweils fünf Gerbils wurden oral mit  $5 \times 10^8$  cfu SL3261::pYZ84/pLAT7 oder SL3261::pYZ84 immunisiert und nach fünf Wochen einer Booster-Immunsierung unterzogen. Neun Wochen nach der ersten Immunisierung wurde den immunisierten Tieren eine Belastungsinfektion mit 50 mL3 von *A. viteae* gesetzt.



**Abbildung 4.7:** Wurmlast von Wüstenrennmäusen nach oraler Immunisierung mit rAVSOD2 exprimierenden Salmonellen. Gerbils wurden  $5 \times 10^8$  cfu SL3261::pYZ84/pLAT7, SL3261::pYZ84 in 200 µl steriler Saline oder das selbe Volumen Saline oral inokuliert. Nach 5 Wochen erfolgte eine Booster Immunisierung. Nach 9 Wochen wurden die Tiere mit 50 *A. viteae* mL3 infiziert. Die Wurmlast wurde 6 Monate pl bestimmt.

Als Infektionsmarker diente zunächst der Mikrofilariantiter der infizierten Tiere, der im Abstand von vier Wochen bestimmt wurde. Im Mittel unterschied sich der Mikrofilariantiter

von Tieren, die mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert worden waren nicht von Tieren der Kontrollgruppe (nicht gezeigt). 6 Monate nach der Belastungsinfektion wurden die Tiere obduziert und die Wurmlast bestimmt (Abbildung 4.7). Da während des Versuchs drei Tiere, die mit SL3261::pYZ84 immunisiert worden waren, eingegangen waren, wurden beide Kontrollgruppen zusammengefaßt. Die mittlere Wurmlast lag bei mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisierten Tieren bei  $6 \pm 5,6$  Adultwürmern (Mikrofilariantiter:  $49,4 \pm 92,7$  Mf/ $\mu$ l Blut) pro Tier, bei den Kontrollgruppen bei  $9,71 \pm 4,0$  (Mikrofilariantiter:  $33 \pm 30,7$  Mf/ $\mu$ l Blut). Dies entspricht einer Reduktion der Wurmlast bei immunisierten Tieren um 38%. Aus drei immunisierten Gerbils konnten nur jeweils zwei vitale Adultwürmer isoliert werden. Diese Tiere wiesen sehr geringe Mikrofilariantiter von 0-3 Mf/ $\mu$ l Blut auf. Die beiden anderen Tiere der Versuchsgruppe waren offenbar nicht geschützt, die Wurmlast lag bei 10 beziehungsweise 14 Adultwürmern mit Mikrofilariantitern von 28 beziehungsweise 214 Mf/ $\mu$ l Blut.

### 4.3 Diskussion

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine orale Immunisierung mit attenuierten *Salmonella* Stämmen eine vielversprechende Strategie für die Entwicklung eines Impfstoffs gegen Filarieninfektionen ist. Die SOD2 von *A. viteae* wurde effizient rekombinant im *aroA* attenuierten Vakzinestamm SL3261::pYZ84/pLAT7 exprimiert, wodurch eine starke humorale Immunantwort in Gerbils gegen das Enzym ausgelöst werden konnte. Nur bei drei von insgesamt 16 mit SL3261::pYZ84/pLAT7 vakzinieren Tieren wurde ein schwacher Antikörpertiter beobachtet. Die übrigen Tiere zeigten eine starke spezifische humorale Immunantwort gegen rekombinante AVSOD2 im ELISA. Darüber hinaus reagierten die Immunsereen mit AVSOD1 und AVSOD2 im Western Blot mit *A. viteae* Totalhomogenat. Mit *O. volvulus* Totalhomogenat wurde ebenfalls eine spezifische Reaktion der Immunsereen beobachtet. Diese Kreuzreaktivität der Seren belegt die Eignung des natürlichen Parasit-Wirt-Systems *A. viteae* / *M. unguiculatus* als Tiermodell für Onchozerkose. Protektionsexperimente mit *O. volvulus* Antigenen im *A. viteae* / *M. unguiculatus* System werden durch die hohe antigene Homologie beider Filarienarten (Nogami *et al.*, 1986) als erste Bewertung des protektiven Potentials zu testender Antigene herangezogen (Lok und Abraham, 1992). Die starke Reaktivität der Immunsereen steht im Gegensatz zu den Verhältnissen in natürlichen Filarieninfektionen. Onchozerkosepatienten haben einen schwachen Antikörpertiter gegen CuZn SODs (Brattig *et al.*, 1997) und nur ein geringer Prozentsatz natürlich infizierter Gerbils bildet Antikörper gegen die AVSOD2 (siehe Kapitel 3). Des weiteren war es in Immunisierungsexperimenten mit aufgereinigter SOD2 von *O.*

*volvulus*, die Gerbils mit verschiedenen Adjuvantien appliziert worden war, nicht möglich eine humorale Immunantwort gegen OVSOD2 zu stimulieren (Lucius, 1995). Offensichtlich wird durch die Präsentation der rAVSOD2 durch die rekombinante *Salmonella* Vakzine effizient stimuliert. Die Effizienz der Stimulation einer humoralen Immunantwort durch rekombinante *Salmonella* Vakzinstämme korreliert offenbar mit der Menge des produzierten rekombinanten Antigens (Fayolle *et al.*, 1994). Die Überexpression rekombinanter Antigene ist jedoch häufig toxisch für die antigenproduzierende Zelle (Dong *et al.*, 1995). Dies führt *in vivo* oft zu einer schnellen Eliminierung des Trägerstammes oder zum schnellen Verlust des Expressionsplasmids (Khan *et al.*, 1994; Oyston *et al.*, 1995). Dieser Effekt wurde ebenfalls bei SL3261::pYZ88/pLAT7 beobachtet. Dieser Stamm produziert zwar große Mengen rAVSOD2, eliminiert pLAT7 aber unter nicht selektiven Bedingungen *in vitro* und *in vivo* nach wenigen Generationen. Offensichtlich reicht der kurze Zeitraum der Antigenpräsentation durch diesen Stamm nicht aus, um eine Stimulation des Immunsystems zu erreichen. Die Stabilität des Expressionsvektors pLAT7 *in vivo* wurde durch das natürliche Phänomen der Phasenvariation erreicht, wodurch eine heterogene Population des Vakzinstamms zu erzeugt wurde (Yan und Meyer, 1996). Dies gewährleistet die kontinuierliche Präsentation großer Mengen der rAVSOD2 über einen langen Zeitraum. Die Überexpression der rAVSOD2 durch SL3261::pYZ84/pLAT7 führte offensichtlich nicht zu einer Verringerung der Fähigkeit des Vakzinstamms zur Kolonisierung der immunisierten Tiere, wie die Analyse der Immunantwort der Gerbils gegen *S. typhimurium* LPS belegte. Die Bedeutung der Art und Weise der Antigenpräsentation für das Design einer gegen Filarieninfektionen Vakzine wird durch eine weitere Arbeit hervorgehoben. In einer experimentellen Infektion mit *B. malayi* waren BALB/c Mäuse (Haplotyp H-2d) nicht in der Lage eine Antikörperantwort gegen das Hauptoberflächenantigen gp29, eine GSH-Px, zu bilden. Auch eine Immunisierung mit Totalhomogenat der Parasiten in inkomplettem Freund'schem Adjuvans führte in BALB/c nicht zur Stimulierung einer humoralen Immunantwort, während C57/Black6 Mäuse eine effiziente Immunantwort gegen gp29 ausprägten. Die Präsentation von gp29 durch eine attenuierte *S. typhimurium* Lebendvakzine führte zur Aufhebung der Haplotypenrestriktion und einer Serokonversion zumindest eines Teils der immunisierten Tiere (Chacon *et al.*, 1996). Die Autoren dieser Arbeit führen diesen Effekt auf die Unterschiede in der Art der Antigenpräsentation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen zurück.

Die Effektormechanismen, die zu einer protektiven Immunantwort gegen Filarien führen sind nur unvollständig verstanden. Bewohner von Endemiegebieten für Onchozerkose werden in drei Subpopulationen gruppiert: (a) Endemisch Normale (EN) Individuen, die trotz fortdauernder Exposition zu *O. volvulus* keine Mikrofilariidermie entwickeln, (b) weitgehend asymptomatisch infizierte Individuen, deren *skin snips* Mikrofilarien nachgewiesen werden

können (Mf-positiv) und (c) Personen die eine starke Pathogenese aufweisen und deren Immunantwort durch Hyperreaktivität gegen *O. volvulus* Antigene charakterisiert ist (Soboslay *et al.*, 1997). Unbekannt ist wie Immunreaktionen gegen eine Infektion oder Re-Infektion mit *O. volvulus* beziehungsweise pathologische Reaktionen gegen den Parasiten ausgelöst und reguliert werden. Unterschiede in der serologischen Reaktivität gegen *O. volvulus* Antigene von EN Personen zu suszeptiblen Individuen konnten beschrieben werden. EN Personen haben signifikant niedrigere Antikörpertiter gegen *O. volvulus* Antigen von IgE und jeder IgG Subklasse als Mf-positive Individuen (Elson *et al.*, 1994; Soboslay *et al.*, 1997). Der Serumtiter von IgG4 gegen *O. volvulus* Antigen ist bei Mf-positiven Personen extrem erhöht (Soboslay *et al.*, 1997). Ebenso wird eine verstärkte antigen- und mitogenstimulierte Proliferation von mononukleären Zellen (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) bei EN Personen beobachtet, die als protektionsvermittelnd angesehen wird (Nutman *et al.*, 1991; Elson *et al.*, 1995; Soboslay *et al.*, 1997). Durch *O. volvulus* Antigen stimulierte PBMCs von EN Individuen sezernieren signifikant mehr IFN- $\gamma$  (Soboslay *et al.*, 1994; Soboslay *et al.*, 1997) und Interleukin-2 (IL-2) (Ward *et al.*, 1988; Soboslay *et al.*, 1994) als PBMCs Mf-positiver Individuen. Diese Daten deuten darauf hin, daß eine Immunantwort vom Th1 Typ protektionsvermittelnd gegen eine Infektion mit *O. volvulus* ist (Elson *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu EN Personen zeigen Individuen, deren Infektion asymptomatisch abläuft eine moderate Tendenz zu einer Th2 Antwort, während die Immunreaktion in Patienten mit einer starken Ausprägung von Symptomen durch eine starke Th2 Antwort gekennzeichnet sind. Dies ist durch hohe *O. volvulus* spezifische Serum IgG4 und IgE Titer (Soboslay *et al.*, 1997), sowie der Sekretion von IL-4 und IL-5, den Leitzytokinen des Th2 Typs durch mit *O. volvulus* Antigen stimulierte PBMCs charakterisiert (Plier *et al.*, 1996).

Scheinbar im Widerspruch dazu stehen Beobachtungen aus einem Mausmodell für *O. volvulus* das auf der Applikation infektiöser L3 in eine spezielle implantierte Kammer beruht, die für Effektorzellen des Immunsystems frei zugänglich ist (Abraham *et al.*, 1993). BALB/c stellt für *O. volvulus* einen sogenannten Surrogatwirt dar, in dem sich die infektiöse L3 bis zu einem späten L4 Stadium entwickeln kann. Dieses System wird für das Studium der immunologisch wichtigen Häutungsphase von Filarien verwendet. BALB/c Mäuse, die mit attenuierten *O. volvulus* L3 immunisiert worden waren, eliminierten in signifikanter Weise die L3 einer Belastungsinfektion (Lange *et al.*, 1993). In den Diffusionskammern geschützter Mäuse konnte IL-4 nachgewiesen werden, des weiteren wurde ein starke Akkumulation eosinophiler Granulozyten in den Kammern beobachtet (Lange *et al.*, 1994). Die Depletion von IL-4 oder IL-5 führte zu einem Verlust des Immunschutzes (Lange *et al.*, 1994), ebenso waren IL-4 defiziente Mäuse nicht in der Lage eine protektive Immunantwort



zu entwickeln während IFN- $\gamma$  defiziente Mäuse die L3 einer Belastungsinfektion normal eliminierten (Johnson *et al.*, 1998). Dies zeigt, daß im Mausmodell eine Th2 dominierte Immunantwort zur Eliminierung der invadierenden Larvenstadien führt und eosinophile Granulozyten als entscheidender Faktor für protektive Immunität gelten, die im Menschen für die Pathogenese verantwortlich gemacht werden. Die Diskrepanz der Daten aus epidemiologischen Untersuchungen und dem Mausmodell ist möglicherweise auf unterschiedliche Protektionsmechanismen zurückzuführen, die im natürlich infizierten Endwirt Mensch und im Surrogatwirt Maus zum tragen kommen.

Rekombinante *Salmonella* Vakzinen sind in der Lage ein breites Spektrum an Antikörperisotypen gegen Antigene von Helminthen zu induzieren (Chacon *et al.*, 1996; Comoy *et al.*, 1997), Dies deutet darauf hin, daß rekombinante *Salmonella* Vakzinen in der Lage sind T-Helferzellen zu stimulieren, die Zytokine vom Th1 und vom Th2 Typ sezernieren.

Die Ausprägung der Immunantwort gegen definierte Antigene wird einerseits vom Adjuvans und andererseits vom Antigen selbst bestimmt. Immunisierungen mit an TetC fusionierten Peptiden der Glutathion S-transferase von *S. mansoni* mit Alum als Adjuvans bedingten hohe IgG1 und vernachlässigbare IgG2a Serumtiter, Komplettes Freund'sches Adjuvans führte zu einer ähnlichen Stimulation von IgG1 und IgG2a Titern während die Applikation der Peptide als Fusion mit TetC exprimiert durch rekombinante Salmonellen zu einer IgG2a dominierten humoralen Immunantwort gegen *S. mansoni* GST führte (Comoy *et al.*, 1997). Das Verhältnis der Serumtiter von IgG1 zu IgG2a ist im Mausmodell ein Maß für die Orientierung der Immunantwort in Richtung einer Th1 oder Th2 Antwort. Dies bedeutet, daß die Immunantwort für die *Salmonella* präsentierten GST-Peptide Th1 dominiert war. Eines dieser Peptide induzierte jedoch vergleichbare IgG1 und IgG2a Titer. Die Analyse der zellulären Immunantwort zeigte jedoch, daß sowohl IFN- $\gamma$  als auch IL-4 von Stimulierten PBMC sezerniert wurden also antigenspezifische T-Zellen des Th1 sowie des Th2 Typs vorlagen.

Eine Th1 geprägte Immunantwort wurde in Mäusen gegen TetC, das von attenuierten *Salmonella* Stämmen präsentiert wurde (Roberts *et al.*, 1998) und in Freiwilligen gegen *Salmonella* Antigen durch die *Salmonella typhi* Humanvakzinstämme CVD906 und CVD908 induziert (Sztein *et al.*, 1994). Ein *phoP*<sup>c</sup> attenuierter Vakzinstamm von *S. typhimurium*, der UreAB von *H. pylori* im Zwei-Phasen-System exprimiert, induzierte vergleichbare IgG1 und IgG2 Titer gegen aufgereinigte Urease (Corthésy-Theulaz *et al.*, 1998). Im *M. unguiculatus* / *A. viteae* Modell ist die Bestimmung der Antikörper-Subklassen nicht möglich, da die entsprechenden immunologischen Werkzeuge fehlen. Die oben genannten Experimente lassen jedoch den Schluß zu, daß rekombinante die AVSOD2

*Salmonella*-Vakzine in der Lage ist, T<sub>H</sub>-Helferzellen des Th1 und des Th2 Typs zu stimulieren.

Bezüglich des postulieren Exoenzyms AVSOD2 wäre vermutlich die Induktion neutralisierender Antikörper wünschenswert, die die sezernierte SOD inaktivieren. Die hier vorgestellten Immunisierungsexperimente zeigen, daß durch die rekombinanten *Salmonella* Vakzine AVSOD2 spezifische Antikörper induziert wurden. Eine Aussage über die Protektivität der erzielten humoralen Immunantwort ist jedoch nur bedingt möglich, da die Daten des durchgeführten Protektionsexperiments nicht statistisch signifikant sind. Die Aufspaltung der mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisierten Versuchsguppe in zwei nicht geschützte Tiere mit hoher Wurmlast und drei Tiere mit jeweils nur zwei reisolierten Adultwürmern läßt jedoch den Schluß zu, daß ein immunprohylaktisches Potential der AVSOD2 besteht. Die Immunantwort kann möglicherweise durch die Applikation eines Cocktails von Salmonellen, die verschiedene Filarienantigene exprimieren, gesteigert werden. Eine vielversprechende Strategie hierzu wäre die Applikation eines Pools von Salmonellen, die einen Cocktail aller bisher bei Filarien charakterisierten Antioxidansenzyme exprimieren.

#### **4.4 Zusammenfassung**

Die cDNA der extrazellulären CuZn Superoxid Dismutase von *A. viteae* (AVSOD2) wurde unter Kontrolle des T7 Promotors in einen Expressionsvektor kloniert und das resultierende Plasmid pLAT7 in den *aroA* attenuierten *S. typhimurium* Stamm SL3261::pYZ84 eingebracht. Dieser Vakzinestamm enthält ein chromosomal integriertes phasenvariables Element mit einer temperaturabhängig induzierbaren T7 RNA Polymerase. Die rekombinante AVSOD2 wurde im Vakzinestamm SL3261::pYZ84/pLAT7 effizient exprimiert, die rekombinante AVSOD2 machte bis zu 5% des zellulären Proteins aus. Untersuchungen der *in vitro* und *in vivo* Stabilität des Expressionsvektor pLAT7 zeigten, daß pLAT7 in SL3261::pYZ84 *in vivo* über einen Zeitraum von 2 Wochen ohne Antibiotikaselektion stabil propagiert wird. Gerbils, die oral mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert wurden, entwickelten eine starke humorale Immunantwort gegen die AVSOD2. In einem als vorläufig zu bewertenden Protektionsexperiment nahm die Wurmlast in Tieren, die mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert worden waren, im Vergleich zu den Kontrollgruppen um 38% ab. Die Signifikanz dieses Ergebnisses, das das immunprotektive Potential dieser Vakzine aufzeigt, muß durch weitere Experimente bestätigt werden.

**Dieses Kapitel wurde unter folgendem Titel veröffentlicht:**

Lattermann C.T., Yan Z.-X., Matzen A., Meyer T.F. und Apfel H. (1999). Immunogenicity of the extracellular copper/zinc superoxide dismutase of the filarial parasite *Acanthocheilonema viteae* delivered by a two-phase vaccine strain of *Salmonella typhimurium*. *Parasite Immunology* 21:219-224

## **5 Antigenpräsentation an der Zelloberfläche attenuierter Vakzinstämme von *S. typhimurium* durch Autodisplay**

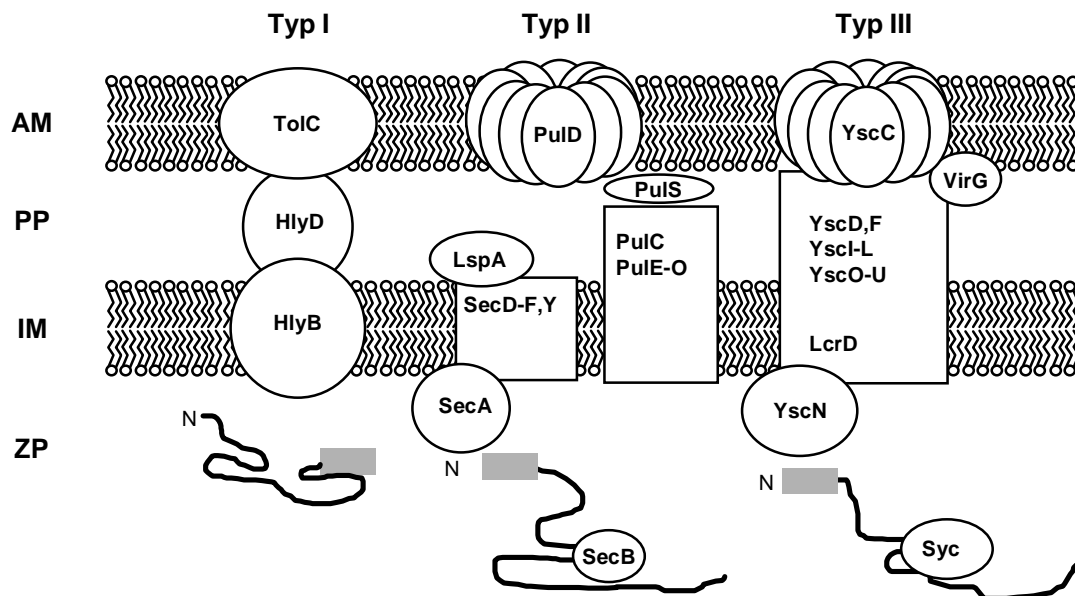
### **5.1 Einleitung**

Das Potential zur Induktion einer protektiven Immunantwort durch Vakzinstämme von *S. typhimurium* ist durch verschiedene Faktoren limitiert. Wichtige Gesichtspunkte sind die Stabilität der Antigenexpression und die Menge des *in vivo* präsentierten Antigens (siehe Kapitel 4). Experimentelle Befunde deuten darauf hin, daß auch die Form, in der das rekombinante Antigen durch attenuierte Salmonellen dargereicht wird, eine bedeutende Rolle spielen kann. So konnten Hess *et al.* 1997 zeigen, daß eine spezifische protektive Immunantwort gegen eine experimentelle Infektion mit *Listeria monocytogenes* durch einen Salmonella-Vakzinstamm, der die in *L. monocytogenes* somatisch vorliegende SOD sekretierte, stimuliert werden konnte. Die zytoplasmatische Expression der SOD zeigte keinen protektiven Effekt (Hess *et al.*, 1997). Dies zeigt, daß in bestimmten Fällen eine alternative Präsentation des rekombinanten Antigens durch den Vakzinstamm vorteilhaft gegenüber konventioneller zytoplasmatischer Expression sein kann.

#### **5.1.1 Proteinsekretion durch Gram-negative Bakterien**

Der Export von Proteinen wird bei Gram-negativen Bakterien durch den Aufbau der Zellhülle erschwert. Das Zytoplasma ist bei Gram-negativen Bakterien durch eine konventionelle biologische Zellmembran, die innere Membran begrenzt. Daran schließt sich der periplasmatische Raum an, in dem der Mureinsacculus lokalisiert ist. Die äußere Begrenzung der Zelle bildet die asymmetrisch aufgebaute äußere Membran. Die dem Periplasma zugewandte Seite der Doppelmembran ist analog zur inneren Membran aus Membranlipiden aufgebaut während die äußere Schicht aus Lipopolysaccharid (LPS) besteht. In die äußere Membran sind integrale Membranproteine eingelagert, die in der Hauptsache als Strukturproteine (OmpA, *outer membrane protein*), dem Austausch niedermolekularer Substanzen und Oligosaccharide durch, zum Teil gerichtete, Diffusion (OmpF/C, PhoE, LamB) oder der rezeptorvermittelten Aufnahme von Substanzen, deren Molekulargewicht die Ausschlußgrenze der Porine überschreitet, dienen. Ebenso wie die Aufnahme ist auch die Sekretion von Molekülen, deren Molekulargewicht größer als ~600 Da ist, durch die äußere Membran eingeschränkt. Während die Translokation von Proteinen

über die Zytoplasmamembran durch den sogenannten *general secretory pathway* (GSP) bei Pro- und Eukaryonten außerordentlich konserviert ist (Dalbey und Von Heijne, 1992; Sakaguchi, 1997), werden Proteine bei Gram-negativen Bakterien durch spezifische Sekretionsmechanismen über beide Membranen transloziert (zur Übersicht siehe Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1: Schematische Übersicht über Typ-I, Typ-II und Typ-III Sekretionssysteme am Beispiel von *E. coli*  $\alpha$ -Hämolyysin, Pullulanase Sekretion von *K. oxytoca* und Yop Sekretion durch *Y. enterocolitica* nach Hueck (Hueck, 1998).** AM, äußere Membran; PP, Periplasma; IM, innere Membran; ZP, Zytoplasma. N, Aminoterminus der sezernierten Proteine. Die Proteinsekretion verläuft unter ATP-Hydrolyse von HlyB, SecA bzw. YscN. Die Signalsequenz für den Export ist grau unterlegt, bei der Typ-III Sekretion kann sich das Signal am 5' Ende der mRNA des sezernierten Proteins befinden. Typ-II und Typ-III Sekretion erfordern die Bindung eines periplasmatischen Chaperons an das zu sezernierende Protein. Bei der Typ-II Sekretion verläuft der Export in zwei Stufen über ein periplasmatisches Intermediat, die Translokation in das Periplasma wird durch den GSP erbracht. Weitere Erklärungen im Text.

#### 5.1.1.1 Sec-unabhängiger Export

Typ-I und Typ-III Exportsysteme Gram-negativer Bakterien vermitteln den Export von Zielproteinen unabhängig vom GSP. Die zu exportierenden Proteine werden unter Auschluss des Periplasmas in einem Schritt über die Zellhülle transloziert und in das umgebende Medium sezerniert. Eine Prozessierung der exportierten Proteine findet nicht statt.

Der Proteinexport durch Typ-I Sekretion benötigt drei akzessorische Komponenten für die Translokation von Zielproteinen: (a) eine in der inneren Membran lokalisierte ATPase, die die benötigte Energie bereitstellt, (b) ein integrales Außenmembranprotein, das über den GSP in das Periplasma transloziert wird, und (c) ein kanalbildendes Protein im Periplasma, das in der inneren Membran verankert ist und das Periplasma durchspannt. Als Erkennungsmotiv für die Translokation dient eine Signalsequenz, die in den carboxyterminalen 60 Aminosäuren lokalisiert ist (Übersicht in Schlor *et al.*, 1997). Als am besten untersucht gilt der Export von  $\alpha$ -Hämolyysin (HlyA) von *E. coli*. Die ATPase HlyB und das periplasmatische Protein HlyD bilden mit dem integralen äußeren Membranprotein TolC einen Komplex für den Export von HlyA. Die kürzeste durch das Hämolybinsystem exportierte Polypeptidkette umfaßt die carboxyterminalen 62 Aminosäuren von HlyA (Jarchau *et al.*, 1994).

Während Typ-I Sekretion eine echte Sekretion von meist enzymatisch aktiven Proteinen in das umgebende Medium darstellt, dienen Typ -III Systeme bei einer Vielzahl von Pathogenen für Mensch, Tier und Pflanzen dazu, Effektorproteine direkt in eukaryote Zielzellen zu injizieren (Übersicht in Hueck, 1998). Typ-III Systeme wurden bei *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* und enteropathogenen *E. coli* charakterisiert. Bei *S. typhimurium* wurden zwei Typ -III Sekretionssysteme identifiziert, die in zwei unabhängigen Pathogenitätsinseln SPI -I und SPI -II (*Salmonella Pathogenicity Island*) vorliegen (Collazo und Galan, 1997; Shea *et al.*, 1996). SPI-I wird bei Salmonellen mit der Invasion von und SPI-II mit dem intrazellulären Überleben in Makrophagen assoziiert. Die zu exportierenden Proteine werden unter Ausschluß des Periplasmas durch eine komplexe Kanalstruktur aus mehr als 20 akzessorischen Komponenten sezerniert. Bei *Y. enterocolitica* geschieht dies nach dem Kontakt eines Ventilproteins, YopN (Yop = *Yersinia outer protein*), mit einem Rezeptor auf der Zielzelle (Rosqvist *et al.*, 1994). Aus diesem Grund werden Typ -III Systeme auch als kontaktabhängig bezeichnet. Offensichtlich bestehen signifikante Homologien von Proteinen des basalen Teils der Typ -III Sekretionssysteme zum Basalapparat von Flagellen (Hueck, 1998). Dieser basale Teil besteht bei *Yersinia* aus der ATPase YscN (*Yop secretion*), LcrD, das eine Pore in der inneren Membran bildet, sowie mehreren Ysc-Genprodukten, die den periplasmatischen Kanal formen. In der äußeren Membran bildet YscC offenbar als multimeres Aggregat eine Pore, die durch das Chaperon VirG stabilisiert und durch YopN nach außen hin abgeschlossen wird. Die Signalsequenz für die Sekretion und Translokation in die Zielzelle durch Typ -III Systeme ist am Aminoterminal der Exportproteine lokalisiert. Reporterfusionen mit den aminoterminalen Aminosäuren 1-15 des Zytotoxins YopE oder 1-17 der Tyrosinphosphatase YopH von *Y. enterocolitica* waren ausreichend für eine Sekretion der Fusion in den Überstand, für die Translokation des Reportergens in die Zielzelle waren 50 beziehungsweise 70

aminoternale Aminosäuren von YopE beziehungsweise YopH nötig (Sory *et al.*, 1995). Neuere Daten weisen darauf hin, daß das Exportsignal möglicherweise am 5' Ende der mRNA der exportierten Proteine lokalisiert ist (Anderson und Schneewind, 1997). Während YopE und YopH offenbar sehr permissiv für Austausch von großen Aminosäureabschnitten sind (Sory *et al.*, 1995), wird die Translokation der meisten Sips (*Salmonella invasion protein*; SPI-I) von *S. typhimurium* in die Zielzelle durch größere heterologe Insertionen unterbunden (H. Rüssmann, pers. Mitteilung).

### 5.1.1.2 Sec-abhängiger Export

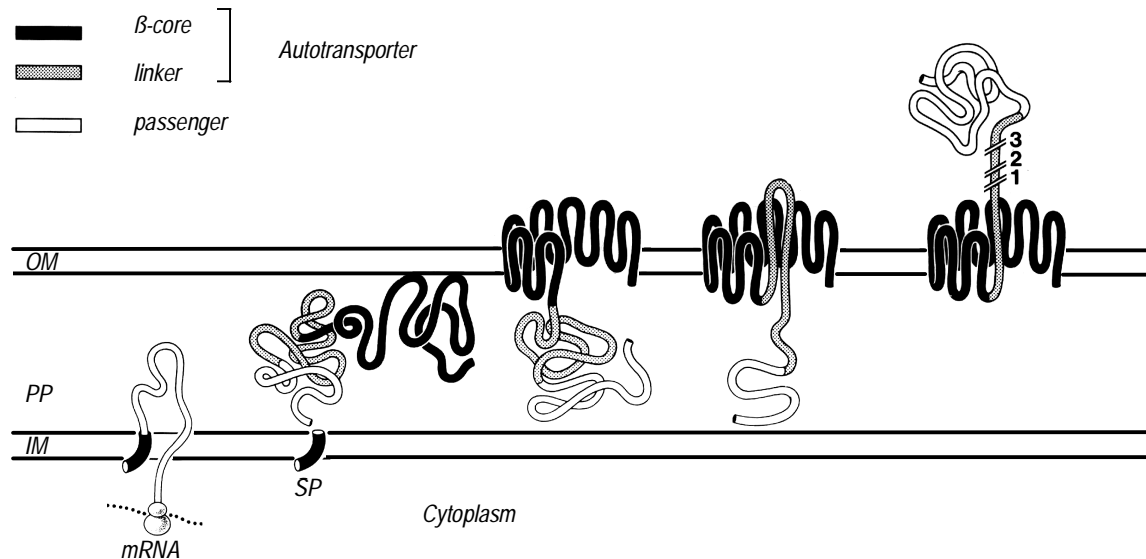
Proteine, die über Typ -II und Typ -IV Sekretionssysteme sezerniert werden, besitzen ein aminoternales Signalpeptid und werden durch den GSP in das Periplasma transloziert. Der Transport über die äußere Membran erfordert im Falle des Exports von Pullulanase von *Klebsiella oxytoca* zusätzlich 14 akzessorische Genprodukte, von denen mindestens sieben in der Zytoplasmamembran lokalisiert sind. PulS und PulD bilden analog zu YscC eine Pore in der äußeren Membran (Pugsley *et al.*, 1997), deren Struktur offenbar homolog zum Aufbau von Typ-IV Pili ist (Hobbs und Mattick, 1993). Heterologe Proteine konnten als Fusion mit Pullulanase nur unzureichend exportiert werden, so war eine 843 Aminosäuren lange aminoternale Domäne der Pullulanase notwendig um die Translokation eines Fusionspartners zu ermöglichen (Kornacker und Pugsley, 1990).

Bei den bisher beschriebenen Sekretionssystemen ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener akzessorischer Komponenten zur Sekretion der Zielproteine erforderlich. Im Gegensatz dazu ist bei Mitgliedern der Proteinfamilie der Autotransporter die ganze Information, die zur Translokation einer Proteindomäne über beide Membranen benötigt wird, auf einer mehrere Domänen umfassenden Polypeptidkette enthalten (Jose *et al.*, 1995; Loveless und Saier, Jr., 1997).

### 5.1.1.3 Autodisplay oder Typ-IV Sekretion

Pohlner *et al.* beschrieben 1987 den Exportmechanismus der IgA1-Protease von *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner *et al.*, 1987). Kennzeichnend für Autotransporter ist ein aminoternales Signalpeptid für den Sec abhängigen Export in das Periplasma, sowie eine carboxyterminale Autotransporterdomäne, die die Translokation einer oder mehrerer Passagierdomänen über die äußere Membran bewirkt (Jose *et al.*, 1995; Loveless und Saier, Jr., 1997). Die Autotransporterdomäne besteht aus einem sogenannten  $\beta$ -Faß, das aus 14 antiparallelen amphipatischen  $\beta$ -Faltblättern gebildet wird, die die äußere Membran durchspannen. Das  $\beta$ -Faß lagert sich als porinähnliche Struktur in die äußere Membran. Durch dessen wäßrige Pore wird die Passagierdomäne, vermutlich in einer

Haarnadelschleife, transloziert. Die durchweg als Virulenzfaktoren angesehenen Passagierdomänen werden zum Teil proteolytisch abgespalten (Pohlner *et al.*, 1987), oder verbleiben auf der Zelloberfläche (Benz und Schmidt, 1989; Schmitt und Haas, 1994). Bis 1998 wurden 28 der Mitglieder der Proteinfamilie der Autotransporter charakterisiert (Henderson *et al.*, 1998).



**Abbildung 5.2: Modell für den Export von Proteindomänen an die Zelloberfläche von Gram-negativen Bakterien durch den Autotransporter AIDA-I.** OM, Außenmembran; PP, Periplasma; IM, Innenmembran; SP, Signalpeptid. Die Prozessierungsstellen durch die Proteasen Chymotrypsin (1), Trypsin (2) und OmpT (3) sind gekennzeichnet. (Nach Maurer *et al.* Maurer *et al.*, 1997)

## 5.1.2 Verfahren zur extrazellulären Präsentation rekombinanter Antigene durch attenuierte Vakzinestämme von *S. typhimurium*

### 5.1.2.1 Präsentation rekombinanter Antigene durch Typ-I und Typ-III Sekretion

Die Präsentation rekombinanter Antigene durch attenuierte *Salmonella*-Stämme wurde mittels Typ-I und Typ-III Sekretion beschrieben. Das *E. coli*  $\alpha$ -Hämolysinsystem wurde erfolgreich für die Sekretion rekombinanter Antigene genutzt. Als Fusionen mit der carboxyterminalen Domäne von HlyA wurden p60 und SOD von *L. monocytogenes* sowie die B Untereinheit des *E. coli* Shiga-artigen Toxins durch *S. typhimurium* Vakzinestämme exportiert (Hess *et al.*, 1997; Tzschaschel *et al.*, 1996a). Die durch die *Salmonella* Vakzine induzierte Immunantwort gegen SOD und p60 war protektionsvermittelnd gegen eine Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes* (Hess *et al.*, 1997).



Die Serinprotease SptP von *S. typhimurium* wird durch das Typ-III Sekretionssystem, das in SPI-I kodiert ist, in Makrophagen transloziert (Fu und Galan, 1998) und wurde als *carrier* für die Präsentation eines heterologen T-Zell Epitops über MHC-I Moleküle verwendet. Die Insertion des immundominanten T-Zell Epitops des Influenza Nukleoproteins (Aminosäure 366 bis 374) an eine permissive Stelle von SptP führte zur effizienten Translokation des Fusionsproteins in Henle 407 Zellen und zur Stimulation einer protektiven Immunantwort gegen Influenza im Tiermodell (Rüssmann *et al.*, 1998). Die Effizienz der Präsentation des Epitops durch antigenpräsentierende Zellen war vom MHC-Haplotyp abhängig.

### 5.1.2.2 Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche

Die Präsentation von Antigenen auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien beschränkt sich auf die Insertion von Polypeptiden in variable Bereiche von Proteinen der äußeren Membran, Flagellen oder Fimbrien. Das Außenmembranprotein OmpA von *E. coli* tolerierte Insertionen von je 21 Aminosäuren Länge in die extrazellulären Schleifen zwei und vier (Freudl, 1989) sowie bis zu 80 Aminosäuren lange Insertionen der Malariaantigene Pf155/RESA und M3 (Haddad *et al.*, 1995). In verschiedene extrazelluläre Schleifen der Porine PhoE und LamB von *E. coli* konnten Insertionen von bis zu 58 Aminosäuren Länge inseriert werden (Charbit *et al.*, 1986; Charbit *et al.*, 1988; Agterberg *et al.*, 1987; Agterberg und Tommassen, 1991; Struyve *et al.*, 1993; Tommassen *et al.*, 1993; McCarvil *et al.*, 1993; Janssen und Tommassen, 1994a; Janssen *et al.*, 1994b). Durch Immunisierungen mit aufgereinigten Porin-Hybridmolekülen konnten spezifische Immunantworten gegen das jeweilige inserierte heterologe Epitop hervorgerufen werden (Tommassen *et al.*, 1993; Janssen *et al.*, 1994b; Janssen und Tommassen, 1994a). Dies gelang ebenfalls nach intravenöser Applikation eines *E. coli* Stamms, der eine Fusion eines Epitops des OMP1 von *N. meningitidis* mit LamB exprimiert (McCarvil *et al.*, 1993). Die Fusion der B-Untereinheit von Shiga-Toxin mit LamB und deren Expression in einem *Salmonella* Vakzinstamm führte in immunisierten Mäusen zwar zu einer spezifischen mukosalen Immunantwort gegen Shiga-Toxin, die Fusion ist jedoch translokationsinkompatibel und wird im Zytoplasma des Vakzinstamms angereichert (Su *et al.*, 1992). Die Insertion von immundominanten B-Zell Epitopen des Hauptaußenmembranproteins MOMP von *Chlamydia trachomatis* in extrazelluläre Schleifen von LamB führte zur Induktion einer schwachen Immunantwort gegen MOMP (Hayes *et al.*, 1991). Ebenso wurde durch Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Salmonellen, die eine M3 OmpA-Fusion exprimierten, eine M3-spezifische humorale Immunantwort induziert (Haddad *et al.*, 1995). Eine weitere Strategie zur Präsentation von Antigenen auf der Oberfläche rekombinanter *Salmonella* Vakzinstämme, ist die Insertion von B- oder T-Zell Epitopen in Flagellen oder Fimbrien.

Epitope verschiedener Antigene, darunter der B Untereinheit des Toxins von *Vibrio cholerae* (CTB) (Newton *et al.*, 1989), Llo (Verma *et al.*, 1995), Influenza Hämagglutinin (McEwen *et al.*, 1992) oder HIV gp41 (Newton *et al.*, 1995), wurden in die hypervariable Region des Flagellins (FliC) inseriert und waren auf der Oberfläche von funktionellen Flagellen exponiert. Die Immunantwort gegen die FliC-Fusionsproteine war unterschiedlich. Spezifische Antikörper konnten in Seren immunisierter Mäuse nach oraler Immunisierung mit in FliC inserierten Epitopen von Hämagglutinin (McEwen *et al.*, 1992) oder Hepatitis B core antigen (Wu *et al.*, 1989) nachgewiesen werden, während durch diese Strategie keine Immunantwort gegen das HIV gp41 und das CTB Epitop induziert werden konnte. Die Insertion von heterologen Epitopen in FimA, der Hauptstrukturkomponente von Fimbrien wird als weitere Strategie zur Oberflächenpräsentation von Antigenen durch attenuierte Vakzinstämme untersucht (Stentebjerg-Olesen *et al.*, 1997).

Autodisplay durch Typ-IV Sekretion stellt ein weiteres Verfahren dar, heterologe Passagierdomänen auf der Zelloberfläche von *E. coli* oder *S. typhimurium* zu präsentieren. Die Autotransporterdomäne der IgA1 Protease von *N. gonorrhoeae* vermittelte den Export von CTB auf die Oberfläche von *E. coli* und *S. typhimurium* (Klauser *et al.*, 1990; Klauser *et al.*, 1992). Pseudoazurin von *Alcaligenes faecalis* wurde durch die Autotransporterdomäne der Serinprotease SSP von *Serratia marcescens*, sowie MalE und PhoA von *E. coli* durch die Autotransporterdomäne von VirG aus *S. flexneri* exportiert (Shimada *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1995). Maurer *et al.* (Maurer *et al.*, 1997) zeigten den Export von CTB und eines B-Zell Epitops des Nef Proteins von HIV durch den Autotransporter AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence* (Benz und Schmidt, 1989)) von *E. coli*. Beide heterologen Passagiere wurden effizient auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert, die Menge des exportierten CTB betrug etwa 5 % des gesamten zellulären Proteins.

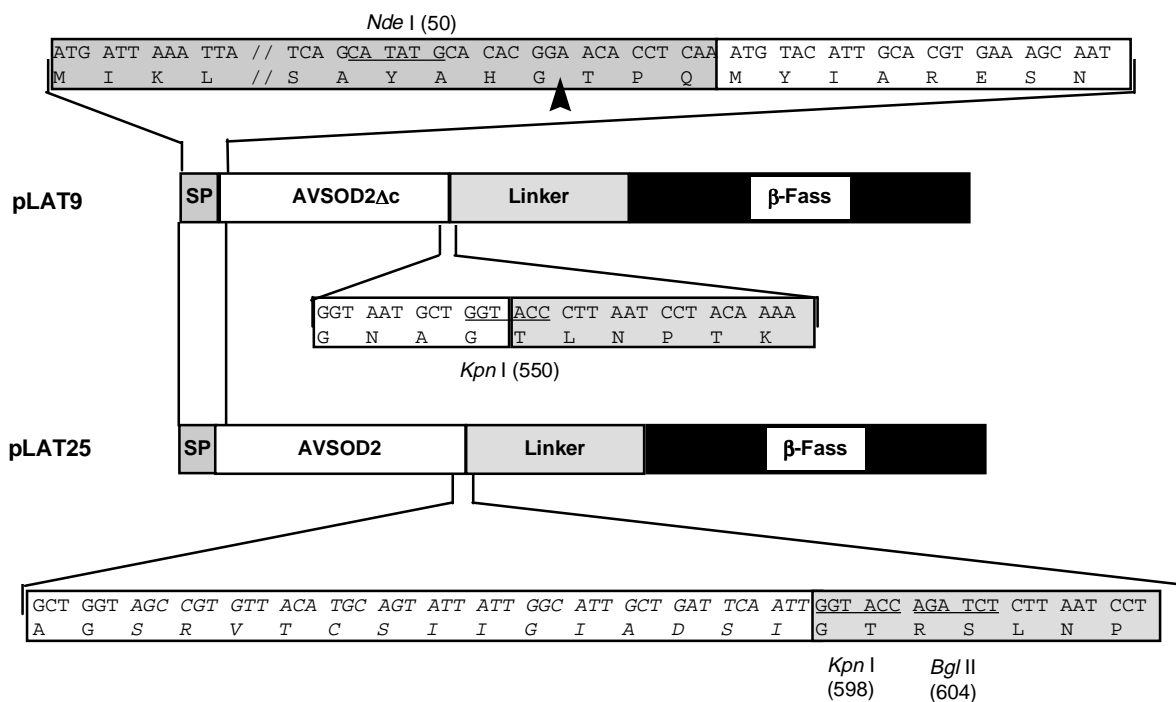
## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 Herstellung einer genetischen Fusion der AVSOD2 cDNA mit dem AIDA-I Autotransporter

Zu Beginn sollte die Translokationskompatibilität der AVSOD2 als Passagier des den Autotransporter AIDA-I (Benz und Schmitt 1989) untersucht werden. Analog zur Strategie der Oberflächenpräsentation des Nef Epitops durch die Autotransporterdomäne von AIDA-I (Maurer *et al.*, 1997), sollte das AVSOD2-AIDA-I Fusionsprotein durch das Signalpeptid des CTB über die Innenmembran transloziert werden. Die Aminosäuresequenz der AVSOD2 weist jedoch zwei Cysteinreste (Cys<sup>74</sup> und Cys<sup>183</sup>) auf, die den Daten aus Röntgenbeugungsexperimenten mit Kristallen von SODs anderer Organismen zufolge eine Disulfidbrücke bilden (Getzoff *et al.*, 1989). Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß die Ausbildung von stabilen Tertiärstrukturen im Periplasma, zum Beispiel Disulfidbrücken, die Effizienz der Oberflächenpräsentation des Passagiers stark verschlechtern (Klauser *et al.*, 1990; Klauser *et al.*, 1992). Durch Deletion der periplasmatisch lokalisierten Oxidoreduktase DsbA konnte die Kinetik der Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma so verlangsamt werden, daß der Export von Wildtyp CTB, das im Periplasma eine Disulfidbrücke bildet, durch die Autotransporterdomäne der IgA1 Protease von *N. gonorrhoeae* möglich war (Jose *et al.*, 1996). Vakzinstämme von *S. typhimurium* sind in dieser Hinsicht jedoch nicht optimiert. Aus diesem Grund wurden zwei Genfusionen der AVSOD2 cDNA mit der Autotransporterdomäne von AIDA-I hergestellt. In der Fusion von AVSOD2 und der Autotransporterdomäne von AIDA-I die auf pLAT9 kodiert ist, ist die AVSOD2-Untereinheit um 14 Aminosäuren am Carboxyterminus verkürzt, was zur Deletion von Cys<sup>186</sup> führt. In dem von pLAT25 kodierten AVSOD2-AIDA-I Fusionsprotein ist die AVSOD2 am Carboxyterminus vollständig (Abbildung 5.3).

Zur Herstellung der verkürzten Genfusion in pLAT9 wurde das entsprechende Fragment der AVSOD2 cDNA mit den Oligonukleotidprimern LAT20/LAT21 durch PCR amplifiziert und in den Vektor pJM7 (Maurer *et al.*, 1997) inseriert. pJM7 ist von dem Vektor pBA (ein pBR322 Derivat mit hoher Kopienzahl) abgeleitet und kodiert für eine Fusion eines mutierten CTB, bei dem die Reste Cys<sup>9</sup> und Cys<sup>86</sup> des reifen CTB durch Leucin beziehungsweise Glycin ersetzt wurden (Klauser, 1991), mit der Autotransporterdomäne von AIDA-I. Die Expression des CTB-AIDA-I Fusionsproteins FP59 wird durch den starken konstitutiven Promotor P<sub>TK</sub> (Klauser, 1991) gesteuert. Die Bindestelle des Oligonukleotidprimers LAT20 auf der AVSOD2 cDNA wurde so gewählt, daß das Signalpeptid der AVSOD2 nicht in der

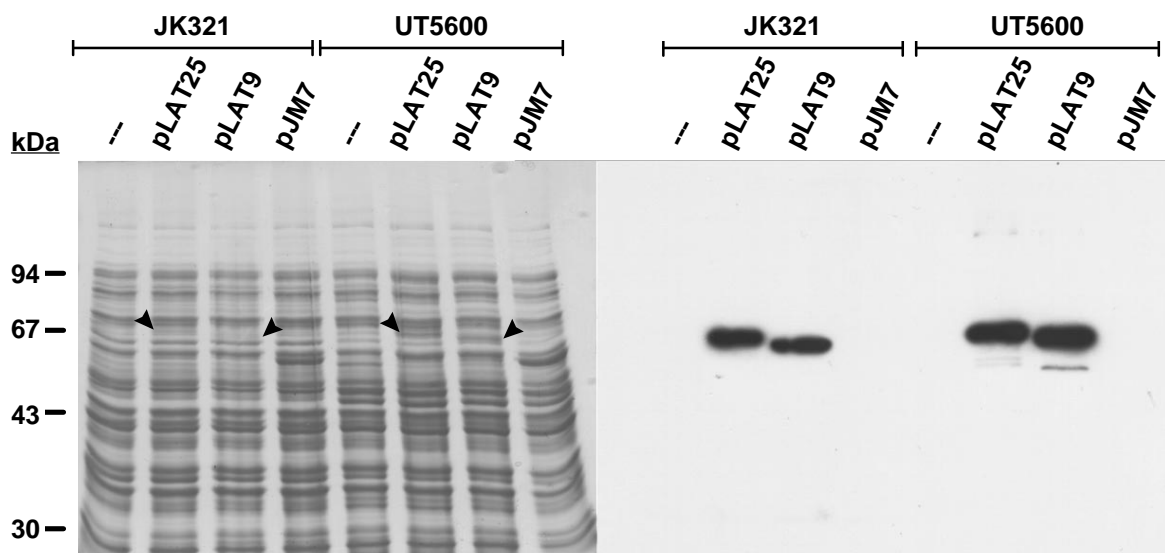
Genfusion enthalten war. Am 5' Ende weist LAT20 einen Sequenzabschnitt auf, der für die carboxyterminalen Aminosäuren N-SAYAHGTPQ-C des Signalpeptids von CTB kodiert, so daß das generierte PCR-Fragment in die *Nde* I Schnittstelle bei Nukleotid 50 von pJM7 unter Beibehaltung des offenen Leserahmens inseriert werden konnte. Im reifen Fusionsprotein wurden vor dem Beginn der AVSOD2 Sequenz die Aminosäuren Threonin, Prolin und Glutamin von CTB belassen, um die korrekte Prozessierung durch die Signalpeptidase zu gewährleisten. Am 3' Ende wurde die AVSOD2 cDNA über eine in LAT21 vorliegende *Asp* 718I / *Kpn* I Schnittstelle mit der Autotransporterdomäne von AIDA-I fusioniert. Der Vektor pLAT25 wurde durch einer ähnlichen Strategie hergestellt. Unter Beibehaltung des nativen 3' Endes wurde die AVSOD2 cDNA durch PCR mit dem Primerpaar LAT20/LAT22 amplifiziert und nach Hydrolyse mit *Nde* I und *Bgl* II in den entsprechend vorbereiteten Vektor pJM369 inseriert. pJM369 ist ein Derivat von pJM7, in dem das CTB deletiert ist. Heterologe Passagiere kodierende DNA-Fragmente, können in diesem Vektor durch eine *Bgl* II Schnittstelle zwischen CTB-Signalpeptid und Autotransporterdomäne inseriert werden (Maurer, 1998).



**Abbildung 5.3: Schematische Darstellung AVSOD2 -AIDA-I Fusionsproteine.** Die Fusionsstellen der cDNA Fragmente der AVSOD2 mit dem Signalpeptid von CTB und der Autotransporterdomäne sind hervorgehoben. Die Sequenzabschnitte sind entsprechend ihrer Herkunft unterlegt. SP, Signalpeptid von CTB (dunkelgrau); AVSOD2  $\Delta$ c, carboxyterminal verkürzte AVSOD2 cDNA, bzw. AVSOD2, vollständige cDNA (weiß); Linker: Verbindungsregion der Autotransporterdomäne (hellgrau);  $\beta$ -Faß (schwarz). Die in pLAT25 zusätzlich vorhandenen Aminosäuren bzw. Nukleotide sind kursiv dargestellt, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen, die Position im jeweiligen Konstrukt angegeben. Die Prozessierungsstelle der Signalpeptidase ist durch eine Pfeilspitze markiert.

## 5.2.2 Die Expression der AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteine in *E. coli* ist unabhängig vom *dsbA* Phänotyp

Zur Überprüfung der Expression der AVSOD2 -AIDA-I Fusionen wurde der *E. coli* Stamm JK321 ( $\Delta ompT$ , *dsbA::kan*) (Jose *et al.*, 1996) mit pLAT9 oder pLAT25 transformiert. Beide Fusionsproteine wurden in JK321 exprimiert und waren nach SDS -PAGE von Ganzzelllysate mit Coomassie Brilliant Blue anfärbbar (Abbildung 5.4). Beide Fusionsproteine migrierten entsprechend ihres vorhergesagten Molekulargewichts bei ungefähr 65 kDa (JK321/pLAT9) beziehungsweise 67 kDa (JK321/pLAT25) und wurden aus diesem Grund als FP65 beziehungsweise FP67 bezeichnet. Die Expression beider AVSOD2 Fusionsproteine war deutlich schwächer als die des CTB-AIDA-I Fusionsproteins FP59 (Maurer *et al.*, 1997). Die Fusionsproteine wurden durch das AVSOD2-spezifische polyklonale Antiserum AS1 im Western Blot nachgewiesen.



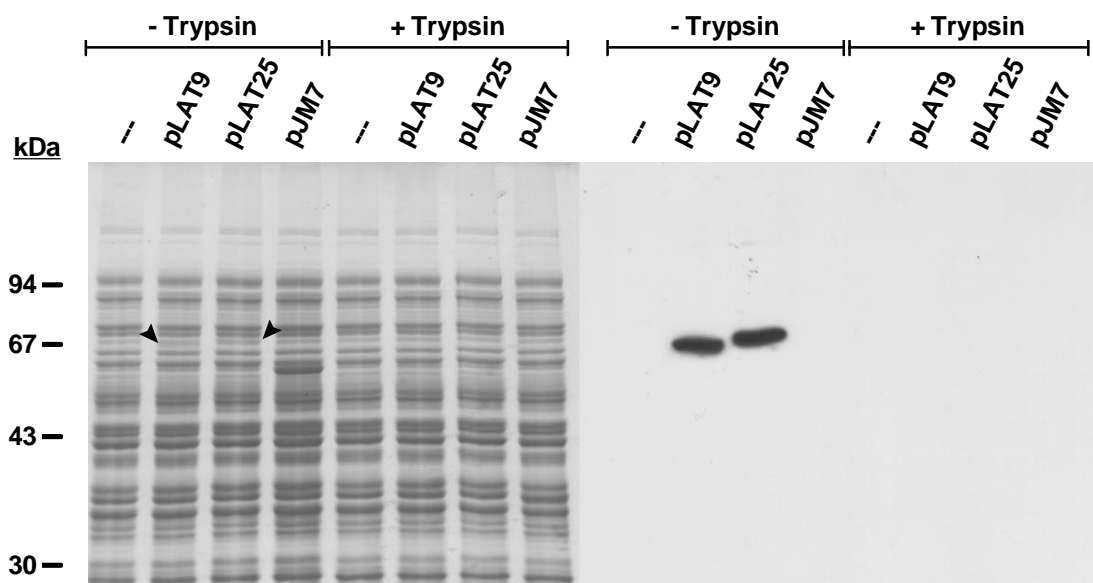
**Abbildung 5.4: Expression von FP65 und FP67 in *E. coli* JK321 und *E. coli* UT5600.** Ganzzelllysate von FP65, FP67 oder FP59 exprimierenden *E. coli* JK321 und *E. coli* UT5600 wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (linke Seite) beziehungsweise auf eine Immobilon-P Membran (Millipore) transferiert (rechte Seite). Die Membran wurde mit AS1 inkubiert und AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteine durch ECL nachgewiesen. Die Pfeilspitzen markieren FP65 im Ganzzelllysate von JK321/pLAT9 und UT5600/pLAT9 beziehungsweise FP67 im Ganzzelllysate von JK321/pLAT25 und UT5600/pLAT25.

Offenbar nimmt die periplasmatische Oxidoreduktase DsbA keinen Einfluß auf den Export der AVSOD2 Domäne durch AIDA-I. *E. coli* UT5600 (*dsbA*<sup>+</sup>), der Parentalstamm von JK321, wurde mit pLAT9 und pLAT25 transformiert und die Expression von FP65 und FP67 untersucht. Die Menge von FP67, das beide Cysteinreste zur Ausbildung einer Disulfidbrücke enthält, ist im Ganzzelllysate von UT5600/pLAT25 vergleichbar mit der Menge

an FP65 in UT5600/pLAT9 (Abbildung 5.4). FP65 und FP67 werden in UT5600/pLAT9 bzw. UT5600/pLAT25 deutlich stärker exprimiert als in JK321/pLAT9 beziehungsweise JK321/pLAT25. Die aminoterminalen Aminosäuresequenz von FP65 wurde durch Edman-Abbau ermittelt. Die Sequenz der aminoterminalen Aminosäuren lautete TPQ-MYIARES<sub>N</sub> und stimmt mit dem vorhergesagten Aminoterminus des durch die Signalpeptidase prozessierten reifen FP65 überein.

### 5.2.3 Die AVSOD2-Domäne von FP65 und FP67 wird auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert

Zur Überprüfung der Oberflächenpräsentation von Fusionsproteinen auf der Oberfläche von Bakterien dient die Behandlung intakter Zellen mit exogen zugegebenen Proteasen. Die Inkubation intakter Zellen mit Proteinase K, Chymotrypsin oder Trypsin führte zur spezifischen Abspaltung oberflächenexponierter heterologer Passagierdomänen, während periplasmatisch lokalisierte Proteine nicht beeinflusst wurden (Klauser *et al.*, 1990; Klauser *et al.*, 1992; Maurer *et al.*, 1997).

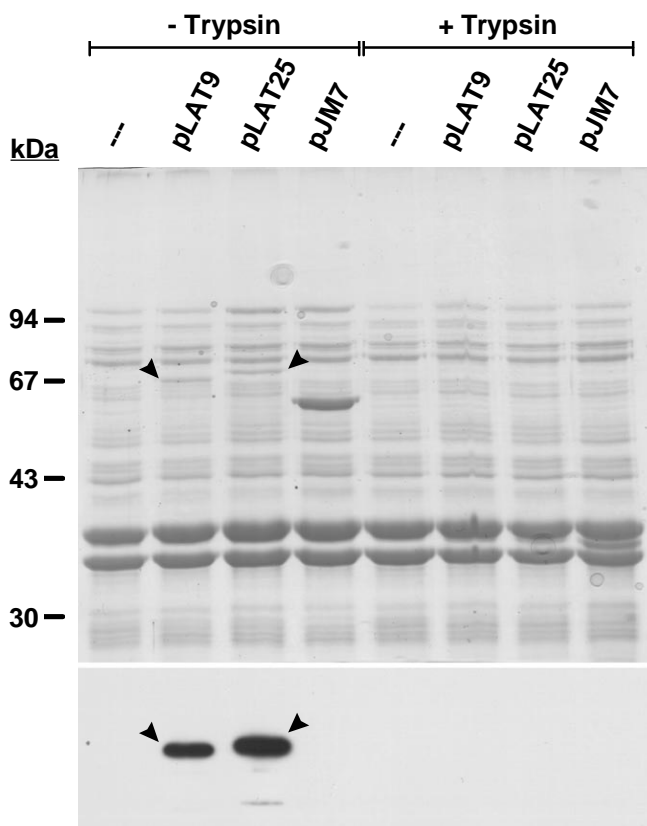


**Abbildung 5.5: Oberflächenexposition von FP65 und FP67.** Physiologisch intakte FP65, FP67 oder FP59 exprimierende JK321 Zellen wurden mit Trypsin behandelt. Anschließend wurden die Ganzzelllysate durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (links), oder durch Western Blot mit dem AVSOD2 spezifischen Antiserum AS1 untersucht (rechts). FP65 und FP67 sind mit Pfeilspitzen markiert.

Dies erlaubt eine gültige Vorhersage über die Oberflächenexposition heterologer Passagierdomänen von Autotransportern. Nach der Behandlung von physiologisch intakten *E. coli* JK321/pLAT9 oder JK321/pLAT25 Zellen mit Trypsin waren FP65 und FP67 weder durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue noch durch das AVSOD2 spezifische

Antiserum AS1 im Ganzzellsatz von JK321/pLAT9 bzw. JK321/pLAT25 nachzuweisen (Abbildung 5.5).

Die Membraninsertion von FP65 und FP67 wurde durch die Präparation von Außenmembranen von JK321/pLAT9 und JK321/pLAT25 nach der Sarkosylmethode (Filip *et al.*, 1973) überprüft. Abbildung 5.6 zeigt, daß FP65 und FP67 in der Außenmembran von JK321/pLAT9 beziehungsweise JK321/pLAT25 angereichert werden. Der Verdau von JK321/pJM7 Zellen resultierte wie erwartet in einer partiellen Degradation von FP59 zu dem in die äußere Membran integrierten trypsinresistenten  $\beta$ -Faß (Maurer *et al.*, 1997). Dies wurde analog für FP65 und FP67 angenommen.



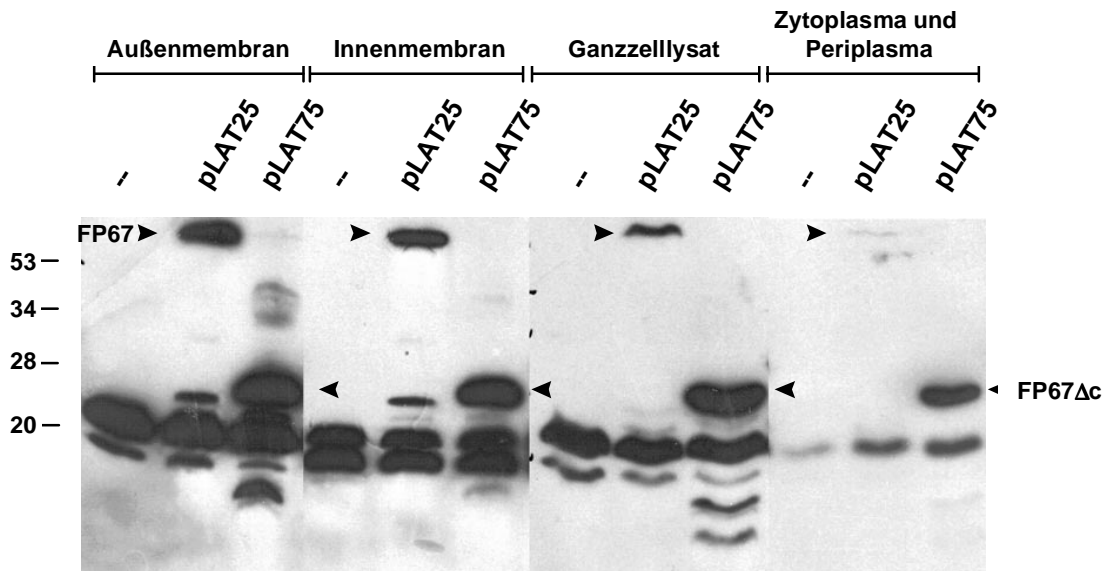
**Abbildung 5.6: FP65 und FP67 werden in der Außenmembran angereichert.**

Außenmembranen von FP65, FP67 oder FP65 exprimierenden *E. coli* JK321 wurden durch die Sarkosylmethode präpariert, durch SDS-PAGE angefärbt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die oberflächenständigen AIDA-I Fusionsproteine wurden durch eine Trypsinbehandlung intakter Zellen vor der Membranpräparation abgespalten (+ Trypsin). FP65 und FP67 (durch Pfeilspitzen markiert) wurden durch AS1 im Western Blot nachgewiesen (unterer Abschnitt).

#### 5.2.4 Subzelluläre Lokalisierung der von FP67

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von FP67 wurde eine fraktionierte Extraktion der Membranproteine von JK321/pLAT25 durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Derivat von pLAT25 hergestellt, bei dem die Autotransporterdomäne durch Hydrolyse des Plasmids mit *Bgl* II und *Bam* HI deletiert wurde und gleichzeitig eine Mutation im Leserahmen nach der für die AVSOD2-Domäne kodierenden Sequenz gesetzt wurde. Das resultierende Plasmid

pLAT75 kodiert für einen 213 Aminosäuren langen offenen Leserahmen, der die Fusion der AVSOD2 cDNA mit dem Signalpeptid von CTB beinhaltet und am Carboxyterminus klonierungsbedingt 13 zusätzliche Aminosäuren aufweist. Das reife Protein birgt 193 Aminosäuren, besitzt ein kalkuliertes Molekulargewicht von 20 kDa und wurde als FP67  $\Delta$ c bezeichnet. FP67  $\Delta$ c wird durch das CTB-Signalpeptid in das Periplasma exportiert und ist gegen den Verdau physiologisch intakter Zellen mit Trypsin resistent (nicht gezeigt). Ganzzellysate von JK321, JK321/pLAT25 und JK321/pLAT75 wurden durch die Sarkosylmethode in eine lösliche, Zytoplasma und Periplasma enthaltende Fraktion, sowie Innenmembranen und Außenmembran fraktioniert. Die starke Anreicherung der Markerproteine OmpA beziehungsweise OmpF/C in der Außenmembranfraktion zeigte, daß durch diese Präparationsmethode die Innenmembran von der Außenmembran separiert werden konnte (nicht gezeigt).



**Abbildung 5.7: Subzelluläre Verteilung von FP67.** Totalhomogenate von JK321, JK321/pLAT25, JK321/pLAT75 wurden durch die Sarkosylmethode in Außenmembran, Innenmembran sowie Zytoplasma plus Periplasma fraktioniert. Zur jeweiligen Zellzahl äquivalente Proteinmengen wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot mit AS1 untersucht.

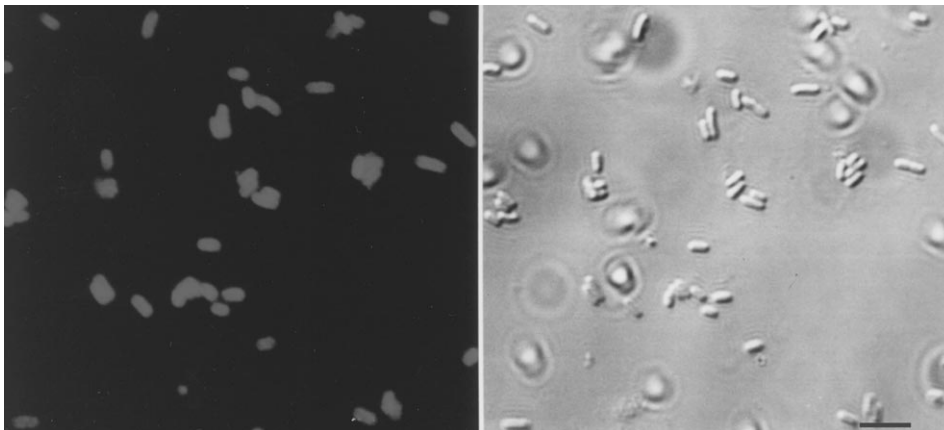
FP67 wird eindeutig in den Membranfraktionen angereichert, kommt jedoch in der Innen- und Außenmembranfraktion gleichmäßig verteilt vor (Abbildung 5.7). Offensichtlich wird das  $\beta$ -Fass von FP67 leicht durch die Zugabe von Sarkosyl aus dem Außenmembranverbund gelöst. In der löslichen Fraktion sind verschwindend geringe Mengen FP67 zu finden, die eventuell periplasmatische Intermediate von FP67 darstellen. FP67  $\Delta$ c migriert bei etwa 23 kDa und ist in allen drei Fraktionen zu gleichen Teilen zu finden. Möglicherweise ist die



AVSOD2 lose mit den Membranen assoziiert und/oder wird durch Mizellenbildung nach Lyse der Zellen mit zusammen mit eingeschlossenem Periplasma mit den Membranen sedimentiert.

### 5.2.5 Immunfärbung von oberflächenständigen FP65 und FP67

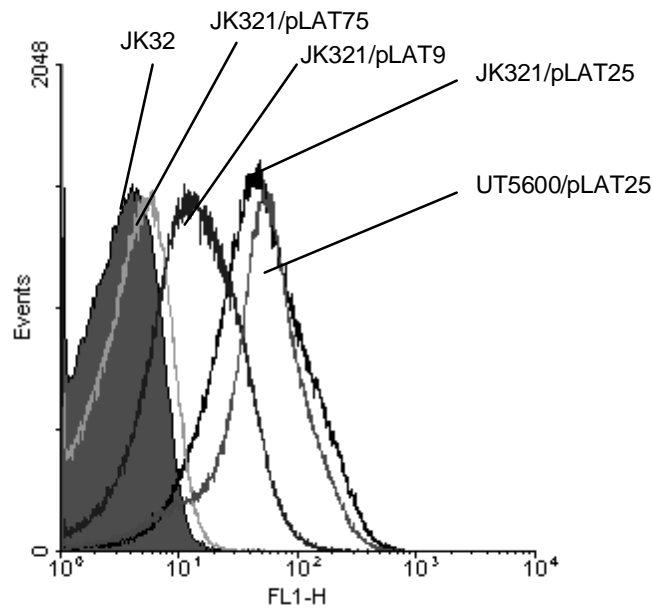
Zusätzlich zur Proteasesensitivität der Fusionsproteine wurde die Immunmarkierung physiologisch intakter Zellen mit dem AVSOD2-spezifischen Antiserum AS1 als Kriterium für Oberflächenständigkeit herangezogen. Dazu wurden FP65 exprimierende *E. coli* UT5600/pLAT9 wurde mit AS1 und als sekundärem Antikörper mit einem Ziege- $\alpha$ Maus-Texas-Red-Konjugat inkubiert um einen indirekten Immunfluoreszenztest durchzuführen. UT5600/pLAT9 zeigt eine starke Fluoreszenz (Abbildung 5.8), während die als Negativkontrollen eingesetzten Stämme UT5600 und UT5600/pJM22 (Maurer *et al.*, 1997) nicht fluoreszierten (nicht gezeigt).



**Abbildung 5.8: Indirekte Immunfluoreszenz als Nachweis zur Oberflächenexposition von FP65.** FP65 exprimierende JK321/pLAT9 Zellen wurden fixiert und mit AS1 (1:200) inkubiert. Der Nachweis an der Oberfläche gebundener Antikörper erfolgte über ein polyklonales Ziege- $\alpha$ Maus-Texas Red-Konjugat. Linkes Bild: Immunfluoreszenzaufnahme; rechtes Bild: Durchlichtaufnahme des selben Ausschnitts. Die Länge des Balkens entspricht 5  $\mu$ m.

Als weiteres Experiment zur Überprüfung der Oberflächenständigkeit von FP65 und FP67 wurde die Methode der Durchflußzytometrie herangezogen (Abbildung 5.9). Physiologisch intakte Zellen von JK321, transformiert mit pLAT9, pLAT25 oder pLAT75, wurden mit AS1 und einem Ziege- $\alpha$ Maus-FITC-Konjugat inkubiert. Die oberflächengebundenen Antikörperkomplexe wurden in einem Durchflußzytometer nachgewiesen. Die relative Fluoreszenz von JK321/pLAT25 war um den Faktor 14 höher als die Fluoreszenz von JK321, während die periplasmatisch lokalisierte AVSOD2 in JK321/pLAT75 nicht durch das

AVSOD2-spezifische Antiserum gefärbt wurde. Die relative Fluoreszenz von JK321/pLAT9 liegt deutlich über der Hintergrundfluoreszenz von JK321 und JK321/pLAT75, ist aber um den Faktor 4 schwächer als bei JK321/pLAT25. UT5600/pLAT25 zeigt gegenüber JK321/pLAT25 eine leicht erhöhte Fluoreszenz. Diese Resultate zeigen deutlich, daß FP65 und FP67 an der Zelloberfläche von JK321/pLAT9 beziehungsweise JK321/pLAT25 präsentiert werden.

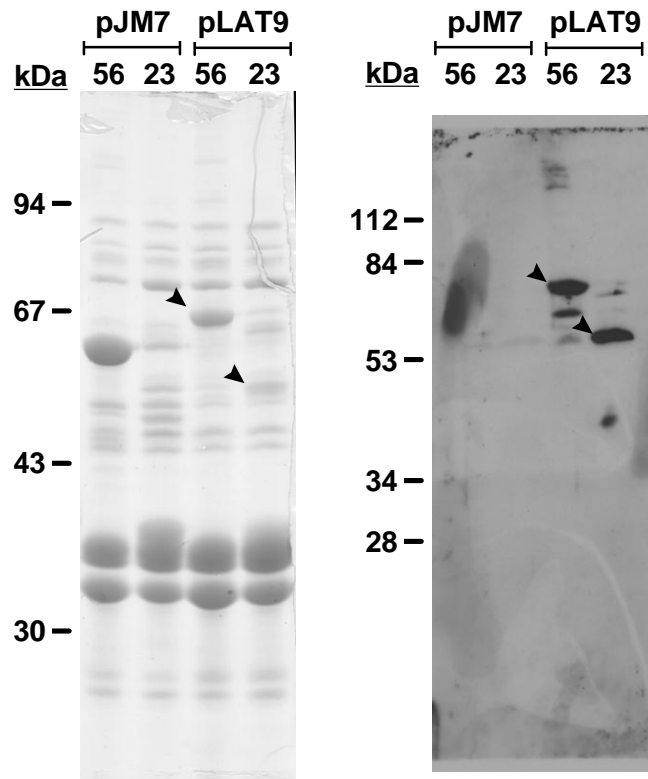


**Abbildung 5.9: Durchflußzytometrischer Nachweis der Oberflächenexposition von FP65 und FP67.** Messung der relativen Fluoreszenz von JK321 Zellen, die oberflächenständige AVSOD2 (pLAT9 und pLAT25) beziehungsweise periplasmatisch lokalisierte AVSOD2 (pLAT75) exprimieren. Zusätzlich wurde die relative Fluoreszenz von UT5600/pLAT25 bestimmt. Physiologisch intakte Zellen wurden für 1 h mit AS1 (1:100 in PBS+10 % FCS) sowie mit einem Ziege- $\alpha$ Maus-FITC—Konjugat als sekundärem Antikörper inkubiert.

### 5.2.6 Prozessierung der AVSOD2-Domäne durch OmpT

Klauser *et al.* (1992) und Maurer *et al.* (1997) haben die Freisetzung von Antigenen von der Oberfläche von *E. coli* Stämmen durch die membranassoziierte Protease OmpT beobachtet (Klauser *et al.*, 1992; Maurer *et al.*, 1997). Da die Freisetzung bestimmter Antigene durch attenuierte *Salmonella* Vakzinstämme offensichtlich ein entscheidendes Stimulans für das Immunsystem darstellen kann (Hess *et al.*, 1997) wurde überprüft, ob die AVSOD2 durch OmpT von der Zelloberfläche abgespalten werden kann. Dazu wurde FP65 in einem *ompT*

positiven Hintergrund, *E. coli* UT2300, exprimiert und das Profil der Membranproteine untersucht (Abbildung 5.10).

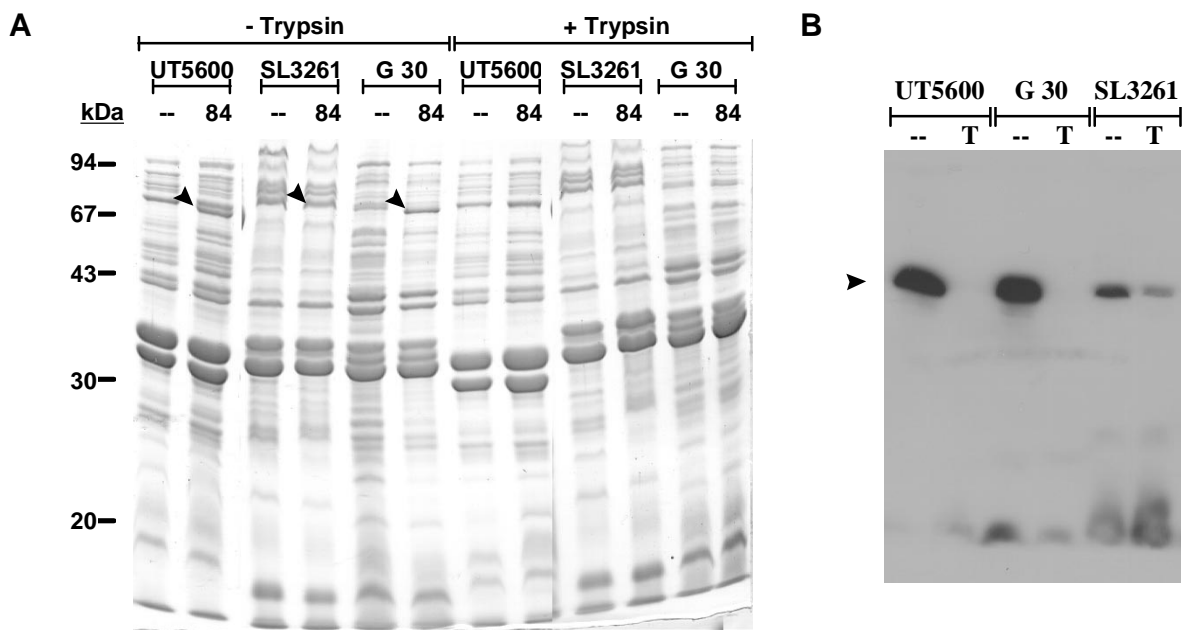


**Abbildung 5.10: OmpT abhängige Spaltung der AVSOD2 Untereinheit von FP65 in *E. coli* UT2300.** Außenmembranen vom *E. coli* UT5600 (56) und UT2300 (23) transformiert mit pJM7 oder pLAT9 wurden durch die Sarkosylmethode präpariert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (links) beziehungsweise durch Western Blot mit AS1 untersucht (rechts). FP65 und das etwa 55 kDa große Spaltprodukt von FP65 in UT2300/pLAT9 sind mit Pfeilspitzen markiert.

Die Prozessierung des CTB-AIDA-I Fusionsproteins FP59 durch OmpT in UT 2300/pJM7 erzeugt ein bei ca. 42 kDa migrierendes Spaltprodukt, das in der Außenmembran integriert ist. In UT2300/pLAT9 ist ein etwa 55 kDa großes Spaltprodukt zu erkennen, das durch das AVSOD2 spezifische Serum AS1 erkannt wird. Diese Prozessierung wurde ebenfalls für FP67 beobachtet (nicht gezeigt). Offenbar ist die von Maurer *et al.* beobachtete OmpT-Prozessierungsstelle in der Verbindungsregion des Autotransporters durch die Passagierdomäne in FP65 maskiert. Statt dessen stellt offenbar eine in der AVSOD2 vorhandene Prozessierungsstelle das Substrat für OmpT dar, was zur Abspaltung eines etwa 10 kDa großen Fragments von der AVSOD2-Domäne führt. Das abgespaltene Fragment der AVSOD2 konnte nicht im Kulturüberstand von JK321/pLAT9 nachgewiesen werden.

## 5.2.7 Entwicklung eines in vivo induzierbaren Expressionssystems für AIDA-I Fusionsproteine in *S. typhimurium* Vakzinstämmen

Zunächst wurde die Expression des AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteins in Vakzinstämmen von *S. typhimurium* überprüft. Dazu wurde der *S. typhimurium aroA* Vakzinstamm SL3261 (Hoiseh und Stocker, 1981) sowie *S. typhimurium* G30 (Osborn *et al.*, 1964) mit pLAT84 transformiert und die Expression des AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteins untersucht. Die Aminosäuresequenz des AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteins FP68, das auf pLAT84 kodiert ist, ist mit pLAT25 nahezu identisch. Zwischen der AVSOD2-Domäne und dem Autoporteranteil ist jedoch zusätzlich das HIV Nef Epitop PEYFK zum Nachweis des Fusionsproteins mit einem monoklonalen Antikörper inseriert.



**Abbildung 5.11: Expression des AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteins in *S. typhimurium*.** (A) Die Außenmembranen von *E. coli* UT5600, *S. typhimurium* SL3261 und G30 ohne Plasmid oder transformiert mit pLAT84 wurden mittels Sarkosylmethode präpariert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Zellen wurden vor der Membranpräparation mit Trypsin behandelt (+Trypsin) oder unbehandelt belassen (-Trypsin). FP68 ist durch Pfeilspitzen markiert. (B) Oberflächenexposition von FP68. Western Blot mit Außenmembranen von *E. coli* UT5600, *S. typhimurium* SL3261 und G30 transformiert mit pLAT84. Die Zellen wurden vor der Membranpräparation trypsinisiert (T) oder unbehandelt belassen (--). FP68 wurde durch AS1 nachgewiesen und ist durch eine Pfeilspitze markiert.

Die Insertion des Nef Epitops hat keinen negativen Einfluß auf die Effizienz der Expression von FP68 im Vergleich zu FP67 (nicht gezeigt). FP68 wird sowohl in SL3261 als auch in G30 stabil exprimiert und in die äußere Membran integriert (Abbildung 5.11A). Die Behandlung physiologisch intakter Zellen mit Trypsin führt zur vollständigen Abspaltung des

AVSOD2-Anteils von FP68 von der Oberfläche von G30/pLAT84, während FP68 unter den gewählten Reaktionsbedingungen nur zum Teil abgespalten wurde (Abbildung 5.11B). Möglicherweise wird die Passagierdomäne durch das Wildtyp-LPS von SL3261 zu einem gewissen Grad gegen exogene Proteasen geschützt. Im Gegensatz dazu trägt *S. typhimurium* G30 eine Mutation in *galE* und prägt ein kurzes LPS aus.

Die Stabilisierung von Expressionsvektoren in einem *Salmonella*-Vakzinestamm kann, neben dem Einsatz des Zwei-Phasen-Systems (siehe Kapitel 4), durch Antigenexpression unter der Kontrolle von *in vivo* induzierbaren (*ivi*) Promotoren erreicht werden. *ivi*-Promotoren regulieren die Expression von *in vivo* essentiellen Genprodukten, die unter den spezifischen im Wirt herrschenden Umweltbedingungen von Salmonellen benötigt werden. Ein Antigen dessen Expression durch einen *ivi*-Promotor reguliert wird, wird infolgedessen erst am Ort der Antigenpräsentation gebildet. Zur Herstellung eines *in vivo* induzierbaren Expressionssystems wurde der Promotor des *nirB* Gens ( $P_{nirB}$ ), einem Gen im Operon der NADH abhängigen Nitritreduktase von *E. coli*, ausgewählt. Die Expression der Nitritreduktase wird durch den Regulator FNR reguliert, der  $P_{nirB}$  unter aeroben Bedingungen reprimiert. Unter anaeroben Kultivierungsbedingungen wird  $P_{nirB}$  dereprimiert. Dies führt zur Induktion der Expression der von  $P_{nirB}$  regulierten Genprodukte (Griffiths und Cole, 1987). Unter der Kontrolle von  $P_{nirB}$  wurden verschiedene Antigene in *Salmonella*-Vakzinestämmen exprimiert (Newton *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Gómez-Duarte *et al.*, 1995).

Zur Herstellung des *in vivo* induzierbaren Expressionsvektors wurde das Plasmid pBRD940 herangezogen. Dieses Plasmid enthält das Fragment C von Tetanus Toxin (TetC) von *Clostridium tetani* dessen expression von  $P_{nirB}$  reguliert wird (O.G. Gómez-Duarte, persönliche Mitteilung). Um FP68 unter Kontrolle von  $P_{nirB}$  zu exprimieren war die Herstellung verschiedener Konstrukte zur Subklonierung der Genfusion erforderlich (schematisch dargestellt in Abbildung 5.12). Zunächst wurde ein für die AVSOD2 Domäne kodierendes Fragment mitsamt  $P_{TK}$  Promotor durch PCR mit den Primern EF16 und JM55 amplifiziert und in den mit *SrfI* linearisierten Vektor pC RScript SK+ inseriert. Demnach kodiert das entstandene Plasmid pLAT102 für eine periplasmatisch exprimierte AVSOD2 ohne Autotransporteranteil. Ein 113 bp großes *ClaI* Restriktionsfragment wurde zur Deletion des konstitutiven Promotors  $P_{TK}$  aus pLAT102 entfernt. Das resultierende Plasmid pLAT111 wurde mit *ApaI* und *BglII* hydrolysiert und das 764 bp große, die AVSOD2 enthaltende Restriktionsfragment in den entsprechend präparierten Vektor pBRD940 inseriert. Das so hergestellte Plasmid pLAT114 enthält stromaufwärts von TetC die mit dem CTB-Signalpeptid fusionierte AVSOD2 cDNA, deren Expression durch  $P_{nirB}$  reguliert wird.

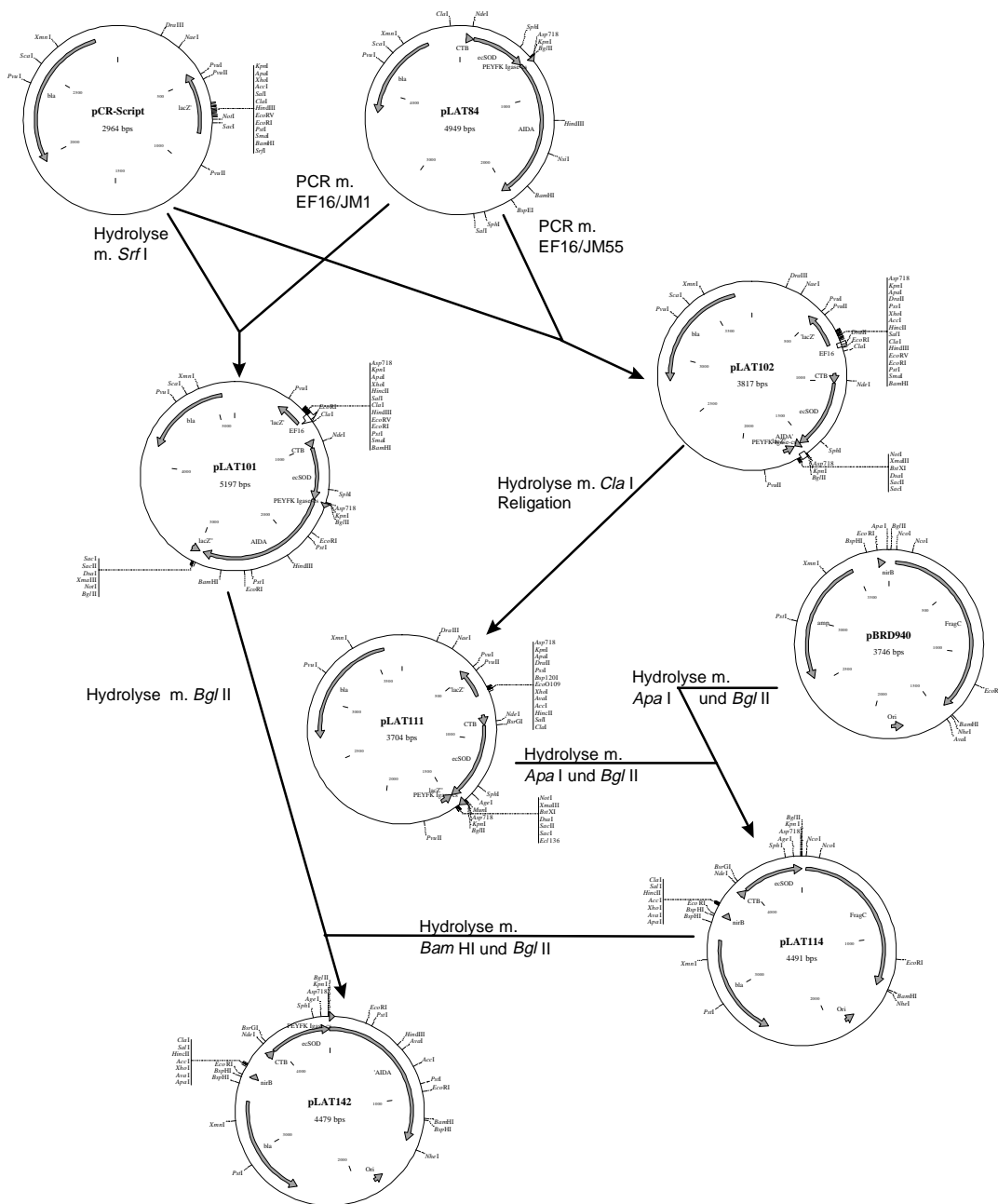
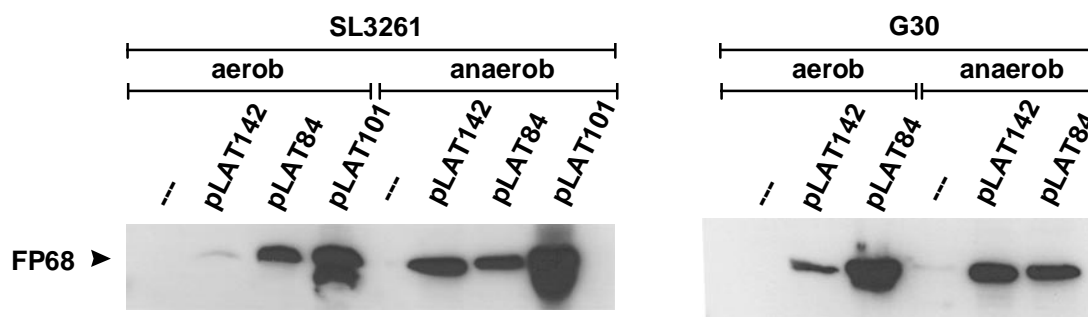


Abbildung 5.12: Schematische Darstellung der Strategie zur Subklonierung der AVSOD2-AIDA-I Genfusion in pBRD940. Erläuterungen im Text.

FP68 wurde durch die Insertion des für den Autotransporteranteil kodierenden *Bgl II* Fragments aus dem Plasmid pLAT101 wiederhergestellt, das durch die Insertion eines EF16/JM1 PCR-Produkts von pLAT84 in pCRScript SK+ entstand. Dazu wurde pLAT101

mit *Bgl* II hydrolysiert und das 1,4 kb große, für den Autotransporteranteil kodierende, Restriktionsfragment in den mit *Bgl* II und *Bam* HI präparierten Vektor pLAT114 anstelle des TetC Fragments inseriert. Das resultierende Plasmid pLAT142 birgt die AVSOD2-AIDA-I Genfusion, deren Expression durch  $P_{nirB}$  reguliert wird.

*E. coli* JK321 wurde mit pLAT142 transformiert und zur Induktion der Expression von FP68 ün unter anaeroben Bedingungen auf LB-Medium kultiviert. Western Blot Analysen zeigten eine vergleichbare Expression von FP68 in JK321/pLAT142 unter induzierenden Bedingungen und JK321/pLAT84 (nicht gezeigt). Aerob kultivierte JK321/pLAT142 Zellen exprimierten kein FP68 (nicht gezeigt). Zur Überprüfung Induktion von FP68 in *S. typhimurium* G30 und SL3261 wurden die Vakzinstämme mit pLAT142 transformiert und ün unter anaeroben Bedingungen kultiviert. SL3261/pLAT142 und G30/pLAT142 zeigen unter aeroben Kultivierungsbedingungen eine schwache Hintergrundexpression von FP68. Unter Sauerstoffausschluß wird die Expression von FP68 induziert (Abbildung 5.13). Die Menge an FP68 in SL3261/pLAT142 und G30/pLAT142 entspricht den jeweiligen mit pLAT84 transformierten Stämmen. SL3261/pLAT101 exprimiert große Mengen FP68 aufgrund der hohen Kopienzahl des Vektors pLAT101, der einen ColE1 Replikationsursprung trägt.



**Abbildung 5.13: Regulation der Expression von FP68 durch  $P_{nirB}$ .** *S. typhimurium* SL3261 und G30 wurden mit pLAT142, pLAT84 oder pLAT101 transformiert und unter aeroben oder anaeroben Bedingungen ün kultiviert. Gleiche Mengen Ganzzelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Bot mit AS1 untersucht. Die Pfeilspitze markiert FP68.

### 5.2.8 Stabilität der AVSOD2-Expressionsvektoren *in vivo*

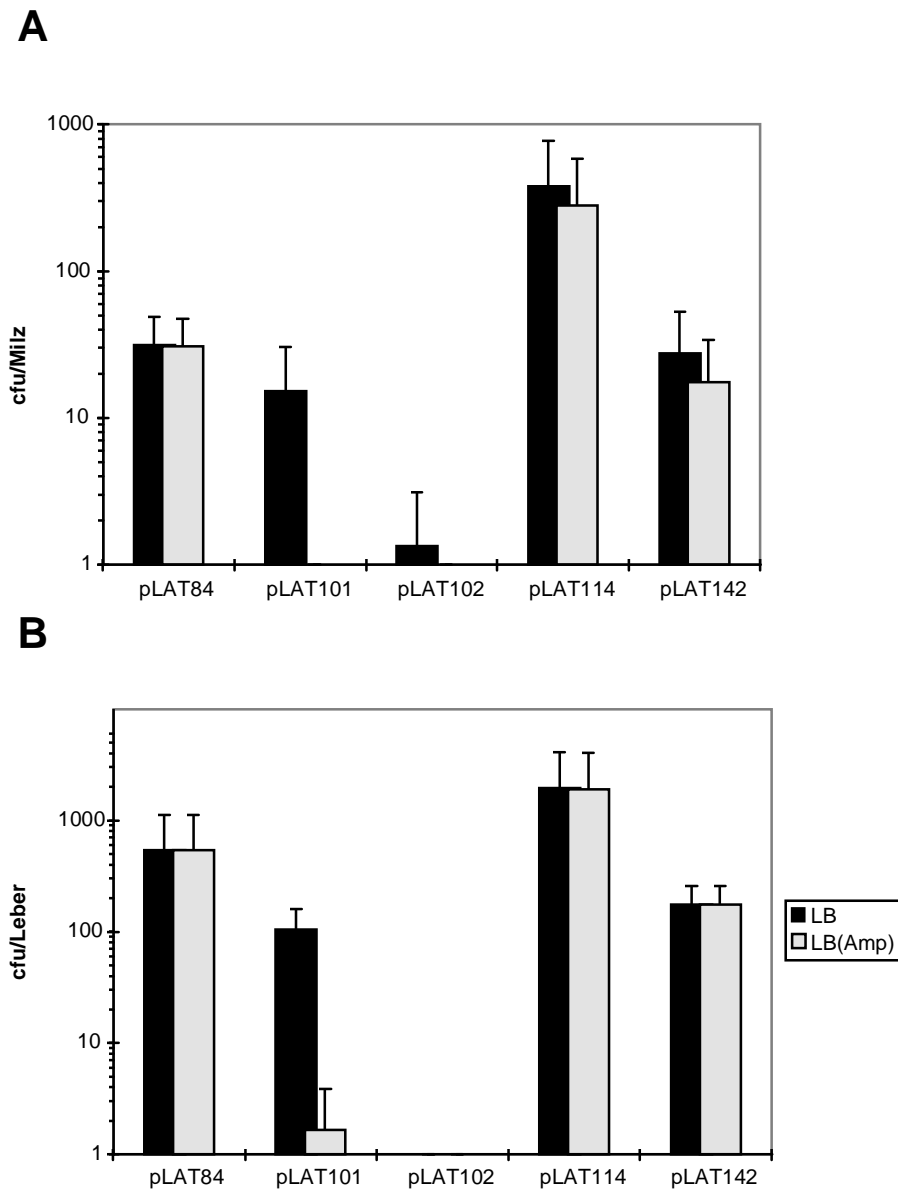
Für Vakzinierungsexperimente mit attenuierten *Salmonella* Vakzinstämmen standen somit fünf Konstrukte zur Verfügung, die für rekombinante AVSOD2 kodierten. pLAT84 und pLAT101 kodieren für konstitutiv exprimiertes FP68, während pLAT142 für P<sub>nirB</sub> reguliertes FP68 kodiert. pLAT102 beziehungsweise pLAT114 kodieren für periplasmatisch exprimierte AVSOD2. Die Eigenschaften der Expressionsvektoren sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt.

Vektor	Kopienzahl / Zelle	Subzelluläre Lokalisierung der AVSOD2	Promotor
pLAT84	50	Oberfläche	P <sub>TK</sub>
pLAT101	~500	Oberfläche	P <sub>TK</sub>
pLAT102	~500	Periplasma	P <sub>TK</sub>
pLAT114	50	Periplasma	P <sub>nirB</sub>
pLAT142	50	Oberfläche	P <sub>nirB</sub>

**Tabelle 5.1: Tabellarische Zusammenstellung der Eigenschaften der AVSOD2 Expressionsvektoren für Vakzinierungsexperimente mit attenuierten *Salmonella* Stämmen.**

Die Stabilität der Konstrukte *in vivo* wurde analog zu Kapitel 4 bestimmt. Gerbils wurden mit  $1 \times 10^9$  cfu *S. typhimurium* SL3261, transformiert mit pLAT84, pLAT101, pLAT102, pLAT114 oder pLAT142, immunisiert. Sieben Tage nach der Immunisierung wurden den Tieren Leber und Milz entnommen, homogenisiert und Aliquots des Homogenats auf LB-Platten mit oder ohne Ampicillin (100 mg/l) plattiert. Nach einer Inkubation üN bei 28°C wurde der Anteil ampicillinresistenter Kolonien ermittelt. Alle *medium copy* Plasmide wiesen eine hohe Stabilität nach sieben Tagen auf (99 % für pLAT84; 96 % für pLAT114 und 100 % für pLAT142), während pLAT101 und pLAT102 mit ColE1 Replikationsursprung nach sieben Tagen nicht mehr nachzuweisen waren. Die Kolonisierung der Gerbils war für SL3261/pLAT84, /pLAT114 und /pLAT142 ähnlich und war durch starke Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren einer Versuchsgruppe gekennzeichnet. Der hohe Mittelwert für SL3261/pLAT114 kommt durch ein ungewöhnlich stark kolonisiertes Tier (5100 cfu / Leber) zustande. Nicht nur die Plasmidstabilität, auch die Kolonisierung von Gerbils mit SL3261/pLAT101 und /pLAT102 war stark herabgesetzt.



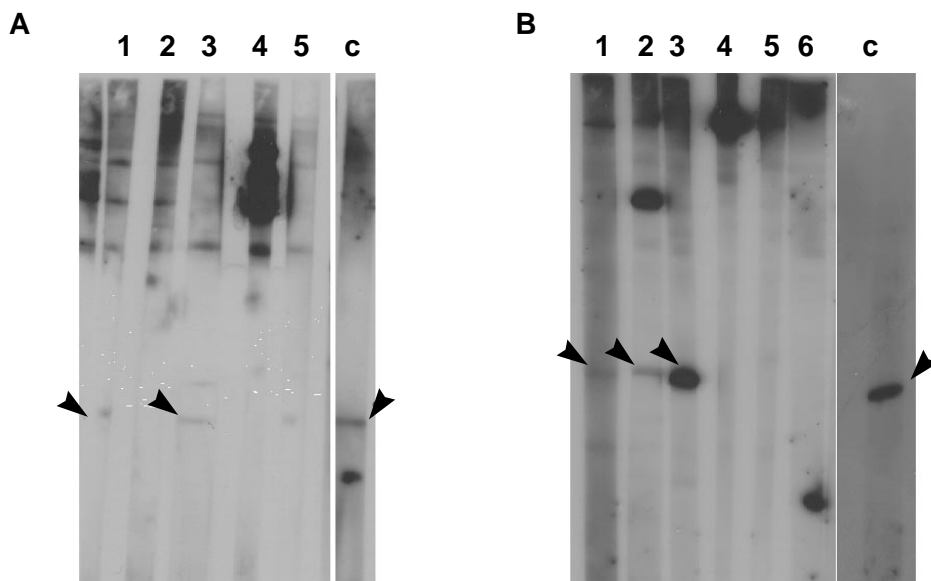


**Abbildung 5.14: Plasmidstabilität *in vivo* der AVSOD2 Expressionsvektoren pLAT84, pLAT101, pLAT102, pLAT114 und pLAT142.** Gerbils wurden mit  $1 \times 10^9$  cfu SL3261, transformiert mit den o.g. Vektoren, immunisiert. Nach sieben Tagen wurden die Salmonellen aus Leber und Milz der Tiere reisoliert und der Anteil der ampicillinresistenten Bakterien bestimmt. Die Anzahl der Tiere betrug  $n=3$  in jeder Versuchsgruppe.

### 5.2.9 Vakzinierung mit FP68 exprimierenden *S. typhimurium* Vakzinstämmen induziert eine humorale Immunantwort in Gerbils und BALB/c

Über die Immunogenität der *Salmonella* Vakzinstämmen, die AVSOD2 an der Zelloberfläche ausprägen, sollte ein Immunisierungsexperiment Aufschluß geben. Dazu wurden Gerbils mit *S. typhimurium* SL3216 oder G30 immunisiert, die mit den verschiedenen AVSOD2

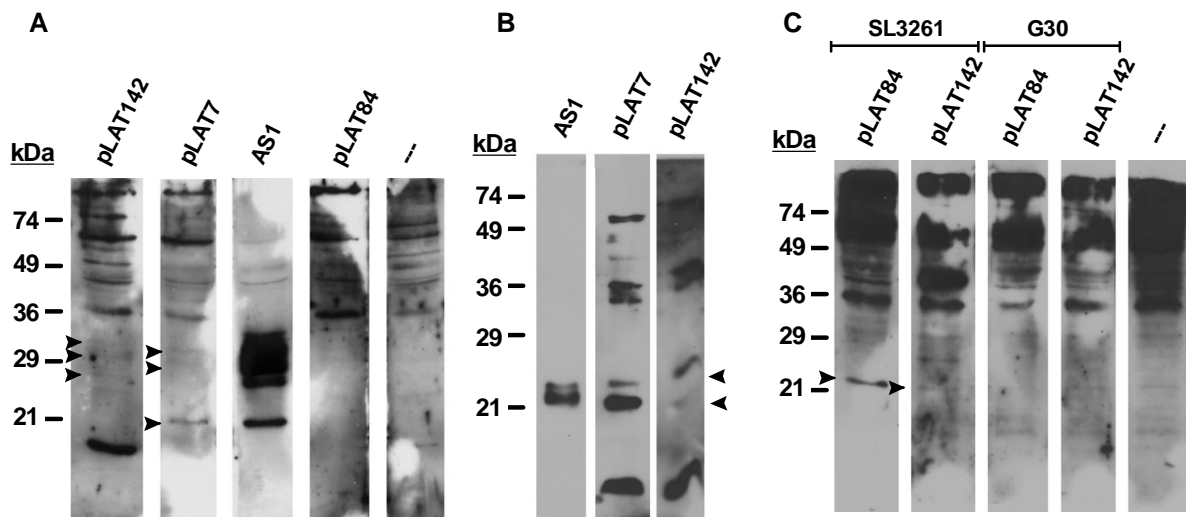
Expressionsvektoren pLAT84, pLAT101, pLAT102, pLAT114, und pLAT142 transformiert waren. Die Gerbils wurden mit  $1 \times 10^9$  cfu Salmonellen oral immunisiert, vier Wochen pl wurde eine Booster-Immunsierung nach dem selben Protokoll durchgeführt. Die Immunantwort wurde durch Western Blot mit Totalhomogenat von *A. viteae* und *O. volvulus* bestimmt, die Einzelseren der Tiere wurden in einer Verdünnung von 1:100 untersucht. Abbildung 5.15 zeigt, daß die Seren von drei Tieren mit SL3261/pLAT84 immunisierter Tiere fünf Wochen nach der ersten Immunisierung spezifisch Antikörper gegen ein Protein von etwa 20 kDa bildeten, bei dem es sich vermutlich um die AVSOD1 handelt. Seren von Wüstenrennmäusen, die mit dem Zwei-Phasen-Vakzinestamm SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert worden waren, zeigten ebenfalls eine stärkere Reaktion mit der AVSOD1 (Abbildung 5.15). Die Seren aller übrigen Tiere zeigten keine Reaktivität. Zwei der drei positiv reagierenden Seren von Tieren, die mit SL3261/pLAT84 immunisiert worden waren reagierten ebenfalls im *O. volvulus* Totalhomogenat spezifisch mit einem Protein, das der OVSOD1 entspricht.



**Abbildung 5.15 Immunoblot mit *Meriones* Immunseren.** Gerbils wurden oral mit  $1 \times 10^9$  cfu SL3261/pLAT84 immunisiert. Vier Wochen pl wurde eine Booster-Immunsierung durchgeführt und die Immunseren der Tiere fünf Wochen pl entnommen. Die Einzelseren wurden im Western Blot gegen Totalhomogenat von *O. volvulus* Weibchen (A) und *A. viteae* Weibchen (B) in einer Verdünnung von 1:100 getestet.

Anschließend wurden BALB/c Mäuse mit SL3261/pLAT84, /pLAT142 und SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert. Dieses Experiment sollte Aufschluß über potentielle Unterschiede in der Reaktivität der Immunseren von Mäusen geben, die mit FP68 exprimierenden oder zytoplasmatische AVSOD2 ausprägenden Salmonellen immunisiert

worden waren. Die Mäuse wurden mit  $5 \times 10^8$  cfu des jeweiligen *Salmonella* Stamms immunisiert und Booster-Immunsierungen vier und acht Wochen pi durchgeführt. Die Immunsereen wurden am Versuchsende 14 Wochen pi entnommen und in Pools im Western Blot mit *A. viteae* und *O. volvulus* Totalhomogenat untersucht. BALB/c Mäuse, die mit SL3261/pLAT84 immunisiert worden waren zeigten keine spezifische Reaktion im Western Blot mit Totalhomogenat von *A. viteae* (Abbildung 5.16A) oder *O. volvulus* (nicht gezeigt) im Gegensatz dazu bindet das Poolserum mit SL3261/pLAT84 immunisierter Meriones an eine Bande bei ~21 kDa (Abbildung 5.16C). Die scheinbare molare Masse der nachgewiesenen SODs war in diesen Experimenten durch den Größenstandard um ~ 2 kDa erhöht. Das Poolserum mit SL3261/pLAT142 immunisierter BALB/c reagierte im *O. volvulus* Totalhomogenat schwach mit zwei Proteinen, die der OVSOD1 und der OVSOD2 entsprachen (Abbildung 5.16B) und zeigen ebenfalls eine schwachen Reaktivität im *A. viteae* Totalhomogenat mit der AVSOD2 (Abbildung 5.16A). Seren von Gerbils, die mit G30/pLAT84 oder G30/pLAT142 immunisiert worden waren zeigten keine Reaktivität.

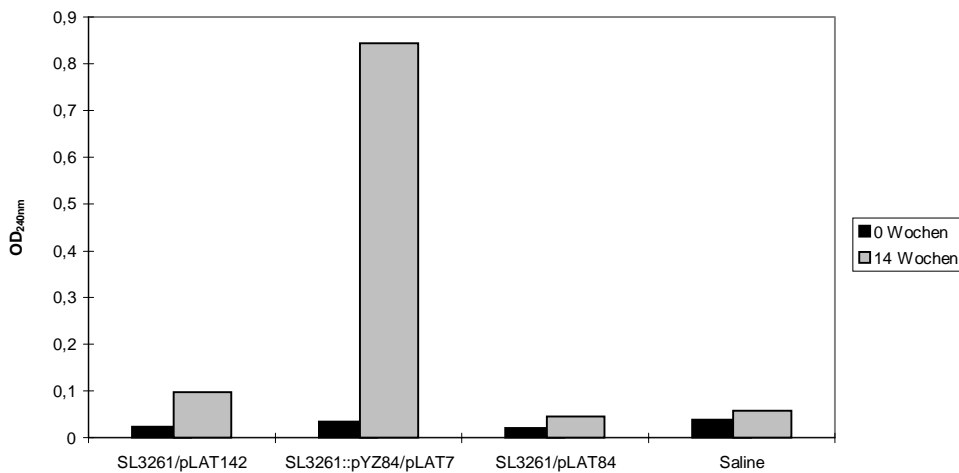


**Abbildung 5.16: Immunoblot-Analyse von Immunsereen oral immunisierter BALB/c und Wüstenrennmäuse.** (A+B) BALB/c oral mit  $1 \times 10^9$  cfu SL3261, SL3261/pLAT84, /pLAT142 oder SL3261::pLAT7 immunisiert. Die am Versuchsende (14 Wochen pi) gewonnenen Seren wurden als Pools von 3 bis 4 Einzelseren im Western Blot gegen *A. viteae* (A) oder *O. volvulus* (B) Totalhomogenat getestet. Die Pfeilspitzen markieren in (A) AVSOD2 (26 - 32 kDa) und AVSOD1 (~21 kDa) und (B) die OVSOD1 (~21 kDa) und OVSOD2 (~22 kDa). (C) Seren mit SL3261/pLAT84, /pLAT142, G30/pLAT84, /pLAT142 sowie SL3261 immunisierter Wüstenrennmäuse wurden nach Versuchsende (16 Wochen pi) als Pools zu je 5 Seren mit Totalhomogenat von *A. viteae* getestet. Die Pfeilspitzen markieren die AVSOD1 als einzig spezifische reaktive Bande. AS1: Kontrollserum gegen rekombinante AVSOD2.

Die Spezifität des Poolserums von BALB/c, die mit SL3261/pLAT142 immunisiert worden waren, unterscheidet sich von dem Poolserum von BALB/c, die mit SL3261::pYZ84/pLAT7

immunisiert worden waren (Abbildung 5.16A). Während letzteres stärker an die SOD1 von *O. volvulus* und *A. viteae* bindet, bindet das Poolserum der mit SL3261/pLAT142 immunisierter BALB/c stärker an die SOD2 von *O. volvulus* und *A. viteae*.

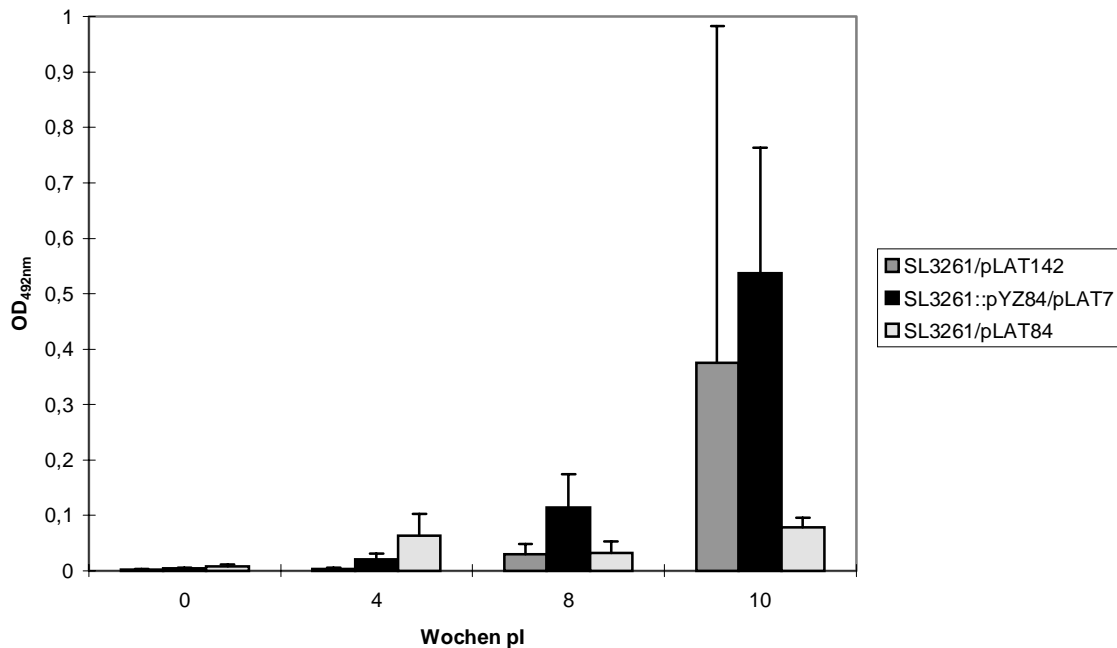
Anschließend wurde die Reaktivität der Poolseren von SL3261/pLAT142, /pLAT84, SL3261::pYZ84/pLAT7 im ELISA mit aufgereinigter rekombinanter AVSOD2 untersucht (Abbildung 5.17). Dieses Experiment zeigte, daß das Poolserum von Tieren, die mit SL3261/pLAT142 immunisiert worden waren, eine schwache Reaktivität gegen rAVSOD2 zeigte, während das Poolserum von mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisierter BALB/c um den Faktor 8,5 stärker reagierte.



**Abbildung 5.17. ELISA mit BALB/c Immunseren gegen rekombinante AVSOD2.** Die Immunseren der mit SL3261/pLAT84, /142, und SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisierten Tiere wurden am Versuchsende (14 Wochen pi) in Pools zu je drei oder 4 Seren auf ELISA-Platten in einer Verdünnung von 1:100 aufgebracht, die mit rekombinanter AVSOD2 präinkubiert worden waren.

Ein ELISA mit *S. typhimurium* LPS sollte Aufschluß über die relative Invasivität der zur Immunisierung verwendeten *Salmonella* Stämme geben. Die Reaktivität der Seren mit FP68 ausprägenden SL3261 und G30 immunisierter Wüstenrennmäuse ließen keinen Rückschluß auf etwaige Toxizität der Konstrukte zu (nicht gezeigt). Es zeigte sich lediglich, daß die Seren von Meriones, die mit den pCRScript Derivaten SL3261/pLAT101 und /pLAT102 immunisiert worden waren, nicht mit *S. typhimurium* LPS im ELISA reagierten. Die Seren der BALB/c Mäuse, die mit SL3261/pLAT142, /pLAT84 und SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert worden waren, wurden im ELISA auf die Reaktivität gegen *S. typhimurium* LPS untersucht (Abbildung 5.18). Die Seren der mit SL3261/pLAT142 und SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisierten Tiere banden nach zweimaliger Booster-

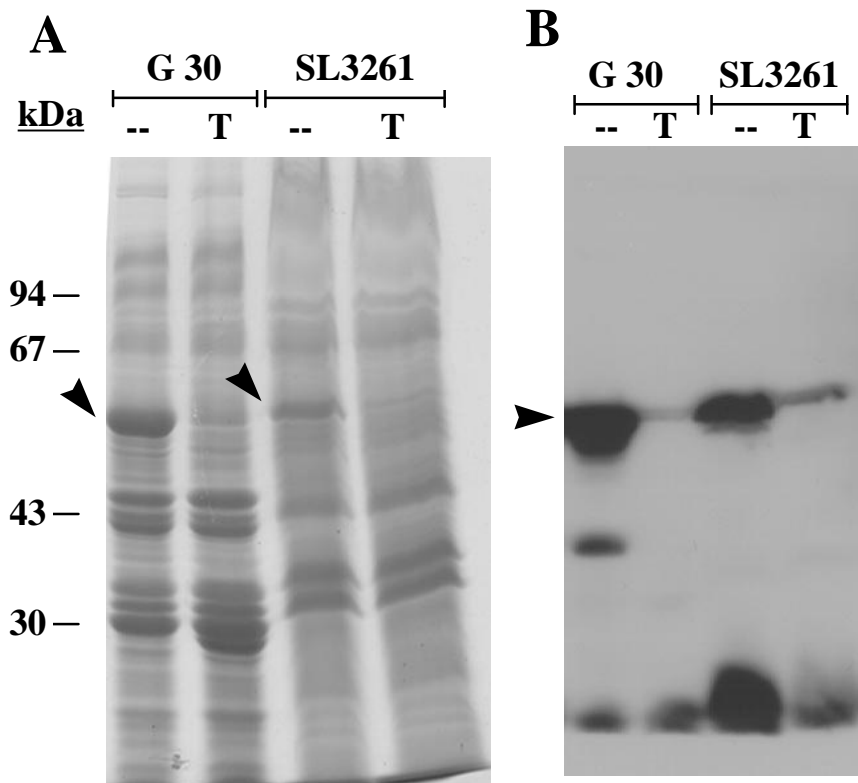
Immunisierung signifikant an *S. typhimurium* LPS, während die Seren mit SL3261/pLAT84 immunisierter Tiere eine insignifikante Reaktion zeigten.



**Abbildung 5.18. ELISA mit BALB/c Immunseren gegen *S. typhimurium* LPS.** Die Seren mit SL3261/pLAT142 (n=4), /pLAT84 (n=3) und SL3261::pYZ84 (n=3) immunisierter BALB/c wurden in einer Verdünnung von 1:100 auf ELISA-Platten aufgebracht, die mit *S. typhimurium* LPS (100 ng / Trog) präinkubiert worden waren. Booster-Immunisierungen wurden in Woche vier und acht durchgeführt.

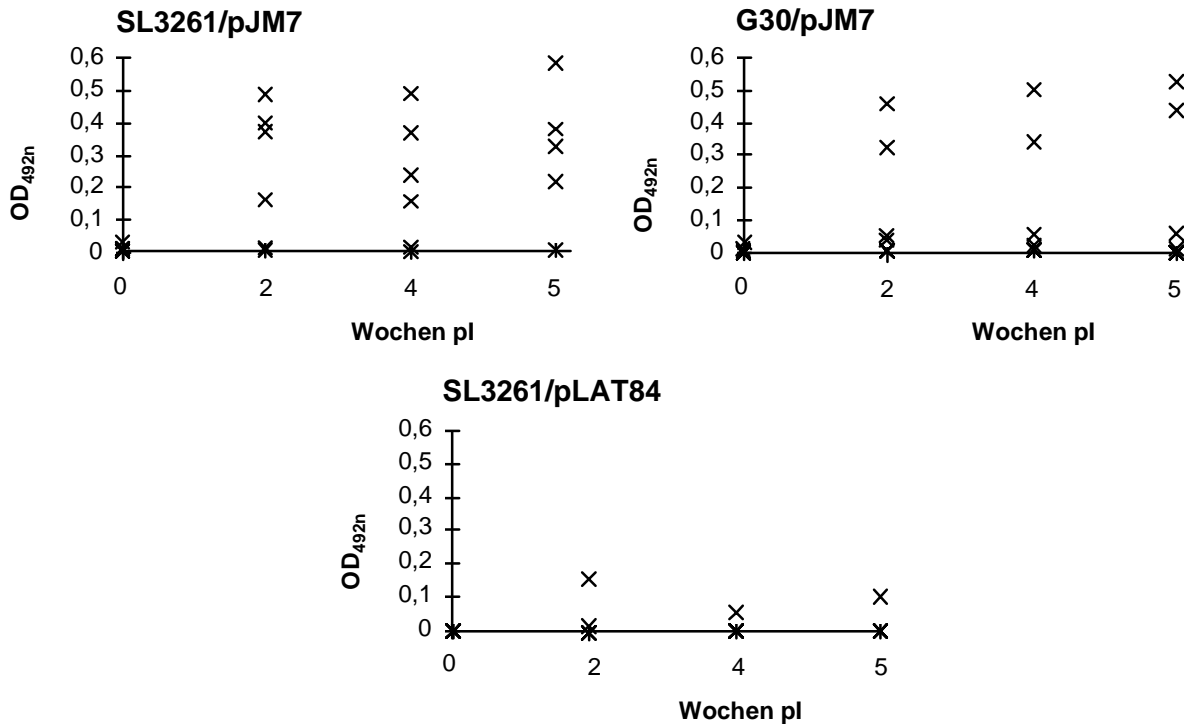
### 5.2.10 CTB induziert als Fusion mit AIDA-I eine spezifische humorale Immunantwort in Wüstenrennmäusen gegen Wildtyp CTB

In einem Kontrollexperiment wurden Gerbils mit den FP59 ausprägenden *S. typhimurium* Stämmen SL3261/pJM7 oder G30/pJM7 immunisiert. In beiden *Salmonella* Stämmen war das CTB-AIDA-I Fusionsprotein FP59 als dominantes Außenmembranprotein in Präparationen der Außenmembranen zu finden (Abbildung 5.19).



**Abbildung 5.19: Expression von FP59 in *S. typhimurium*.** Die Außenmembranen von G30/pJM7 und SL3261/pJM7 wurden nach Trypsinbehandlung ganzer Zellen (T) oder von unbehandelten Zellen präpariert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. (B) Western Blot mit dem CTB-spezifischen Antiserum AK55.

Die Analyse der Plasmidstabilität *in vivo* zeigte, daß pJM7 in stabil in SL3261 und G30 propagiert wurde. Gerbils wurden mit  $1 \times 10^9$  cfu SL3261/pJM7 oder G30/pJM7 immunisiert. Sieben Tage nach der Immunisierung wurden den Tieren Leber und Milz entnommen homogenisiert und das Homogenat auf selektiven und nicht selektiven LB-Platten plattiert. Ein Anteil von 68% aller reisolierten Salmonellen wiesen das Plasmid pJM7 auf. Im Anschluß wurden Gerbils mit jeweils  $1 \times 10^9$  cfu SL3261/pJM7 oder G30/pJM7 immunisiert und die humorale Immunantwort der Tiere gegen natives CTB im ELISA bestimmt. Die Seren wurden vor der Immunisierung, 2 und 4 Wochen nach der ersten Immunisierung und 1 Woche nach der Booster Immunisierung entnommen, die in Woche vier durchgeführt wurde. Abbildung 5.21 zeigt, daß nur ein Teil der mit G30/pJM7 immunisierten Tiere Antikörper gegen CTB gebildet hatte, während nach der Booster Immunisierung nur ein Tier in der mit SL3261/pJM7 immunisierten Versuchsgruppe nicht serokonvertiert war. Die Seren von Gerbils einer Kontrollgruppe, die mit SL3261/pLAT84 immunisiert worden war reagierten nicht mit nativem CTB.



**Abbildung 5.21: Humorale Immunantwort von Gerbils nach Immunisierung mit FP59 exprimierenden *Salmonella* Vakzinstämmen.** Gerbils wurden mit jeweils  $1 \times 10^9$  cfu *S. typhimurium* G30/pJM7 (n=5), SL3261/pJM7 (n=6) oder SL3261/pLAT84 (n=5) immunisiert. In Woche vier wurde eine Booster Immunisierung nach dem selben Schema durchgeführt. Serumproben wurden vor dem Experiment, nach zwei, vier und fünf Wochen gewonnen. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:100 aufgebracht. Die Konzentration von CTB betrug 50 ng/Trog.

### 5.3 Diskussion

In diesem Kapitel wurde die Präsentation heterologer Antigene auf der Zelloberfläche rekombinanter attenuierter *Salmonella* Vakzinstämmen durch Autodisplay untersucht. Die extrazelluläre SOD von *A. viteae* wurde als heterologer Passagier durch die Autotransporterdomäne von AIDA-I auf die Zelloberfläche von *E. coli* JK321 und UT5600 und der *S. typhimurium* Vakzinstämmen SL3261 und G30 exportiert. Die Oberflächenexposition der AVSOD2-Untereinheit der AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteine FP65 und FP67 wurde durch proteolytische Degradation des Passagiers mit exogen zugegebenem Trypsin und Immunfärbungen der Zelloberfläche von FP65 und FP67 ausprägenden Zellen bestätigt. Die Fusionsproteine FP65 und FP67 wurden in die Außenmembran integriert und in der Membranfraktion angereichert. In der zytoplasmatischen Fraktion waren vernachlässigbare Mengen Fusionsprotein zu finden. Die Expression von FP65 und FP67 ist in *E. coli* und *S. typhimurium* etwa um den Faktor fünf

bis zehn schwächer als die Expression der CTB-AIDA-I Fusion FP59 und verschiedener AIDA-I Fusionsproteine, die als aminoterminal Passagiere definierte Peptidepitope aufwiesen.

Vorangegangene Experimente von Klauser *et al.* (Klauser *et al.*, 1990) und Maurer (Maurer, 1998) zeigten, daß sich stabile Tertiärstrukturen des Passagiers im Periplasma, bedingt durch die Ausbildung von Disulfidbrücken, negativ auf die Translokationskompetenz des Passagiers auswirken. Die Deletion der periplasmatisch lokalisierten Oxidoreduktase *DsbA*, die die Ausbildung von Disulfidbrücken im Periplasma begünstigt (Bardwell *et al.*, 1991) verlangsamt die Kinetik der Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma in ausreichender Weise und erlaubt so den Export von ansonsten translokationsinkompatiblen Passagieren wie Wildtyp-CTB, *scFv*-Antikörpern und PhoA (Jose *et al.*, 1996; Maurer, 1998; Suzuki *et al.*, 1995). Die Effizienz der Translokation der AVSOD2 durch die Autotransporterdomäne von AIDA-I wird offenbar nicht vom *DsbA* Phänotyp bestimmt. Dies zeigten Experimente zur Expression der AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteine FP65 und FP67 in *E. coli* JK321 (*dsbA::kan*) und dessen Parentalstamm UT5600. FP67, dessen AVSOD2-Untereinheit beide Cysteinreste enthält, wurde mit der selben Effizienz auf der Oberfläche der *E. coli*-Stämme JK321 und UT5600 präsentiert wie FP65, dessen AVSOD2-Anteil durch eine Deletion der 14 carboxyterminalen Aminosäuren nur einen Cysteinrest aufweist. Offenbar verläuft die Bildung der intramolekularen Disulfidbrücke der AVSOD2 im Periplasma ausreichend langsam ab, so daß die AVSOD2 Untereinheit ungeachtet der beiden Cysteinreste während des Exportvorgangs keine stabilen Tertiärstrukturen im Periplasma ausbildet und somit als Passagier für den AIDA-I Autotransporter geeignet ist.

Die Spaltung des Linkeranteils der Autotransporterdomäne von AIDA-I durch die membranständige Protease OmpT führte zu einer spezifischen Abspaltung der CTB-Domäne von FP59 von der Zelloberfläche in *E. coli* UT2300/pJM7 (Maurer *et al.*, 1997). Die AVSOD2-Untereinheit von FP65 und FP67 wurde durch OmpT nicht vollständig von der Zelloberfläche von UT2300/pLAT9 oder /pLAT25 abgespalten. Vielmehr wird die AVSOD2 Untereinheit durch OmpT in ein etwa 10 kDa großes aminoterminales und ein an der Autotransporterdomäne verbleibendes etwa 9 kDa großes Fragment prozessiert. Die Prozessierungsstelle konnte nicht eindeutig in der Aminosäuresequenz lokalisiert werden, da die AVSOD2 im fraglichen Sequenzabschnitt keine der klassischen Prozessierungsstellen für OmpT zwischen gepaarten basischen Aminosäuren R/R, R/K, K/R, K/K (Sugimura und Nishihara, 1988) aufweist. Im fraglichen Bereich der Aminosäuresequenz AVSOD2 sind drei Lysinreste zu finden. Auf K<sup>106</sup> folgt ein Threoninrest, auf K<sup>116</sup> ein Histidin- sowie auf K<sup>125</sup> ein Alaninrest. Die Sequenzabfolge R/V als Prozessierungsstelle wurde von Maurer *et al.* (Maurer *et al.*, 1997) für FP59 in UT2300/pJM7 bestimmt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Prozessierungsstelle



der AVSOD2 gleichfalls zwischen einer basischen und einer unpolaren Aminosäure, also  $K^{125}/A^{126}$  zu suchen ist. Das aminoternale proteolytische Fragment von FP65 konnte nicht im Überstand von UT2300/pLAT9 nachgewiesen werden. Möglicherweise wird das Fragment vollständig durch Proteasen degradiert, die von lysierten Zellen freigesetzt werden.

In den *S. typhimurium* Vakzinstämmen SL3261 und G30 wurde die AVSOD2-AIDA-I Fusion stabil exprimiert und die AVSOD2-Untereinheit an der Zelloberfläche präsentiert. Trypsinierungsexperimente zeigten, daß die AVSOD2-Untereinheit von FP67 in SL3261 schlechter zugänglich war als in G30. Dieser Effekt wird vermutlich durch das LPS des Wildtyp Phänotyps von SL3261 hervorgerufen, der die Zugänglichkeit der AVSOD2-Domäne für exogene Proteasen herabsetzt.

Zur Stabilisierung *in vivo* des Expressionsvektors für das AVSOD2-AIDA-I Fusionsprotein sollte der *ivi*-Promotor  $P_{nirB}$  verwendet werden, mit dessen Hilfe Promotors verschiedene Antigene stabil in *Salmonella* Vakzinstämmen exprimiert wurden. Vakzinierungsexperimente mit diesen Konstrukten führten zur Induktion spezifischer Immunantworten gegen TetC (Chatfield *et al.*, 1992a), gp29 von *B. malayi* (Chacon *et al.*, 1996), einer Fusion aus TetC und Tcf (*tracheal colonization factor*) von *Bordetella pertussis* (Chen *et al.*, 1998) oder Fusionen des *hepatitis core antigens* mit Epitopen des Humanen Papillomavirus, Typ 16, (Londono *et al.*, 1996). FP68 wurde unter Kontrolle von  $P_{nirB}$  unter anaeroben Bedingungen mit der selben Effizienz exprimiert wie unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors  $P_{TK}$ . Die Expressionsvektoren für FP68, pLAT84 ( $P_{TK}$ ) und pLAT142 ( $P_{nirB}$ ) waren *in vivo* zu annähernd 100 % stabil. Im Gegensatz dazu sind die Expressionsvektoren pLAT101 und pLAT102, die für FP68 beziehungsweise periplasmatische AVSOD2 auf einem *high copy backbone* kodieren, in SL3261 *in vivo* instabil.

Die Immunisierung von Wüstenrennmäusen und BALB/c mit FP68 ausprägenden *S. typhimurium* Vakzinstämmen führte zum Teil zur Induktion einer schwachen humoralen Immunantwort gegen die CuZn SODs von *A. viteae* und *O. volvulus*. Eine Reaktivität von Immunseren konnten in mit SL3261/pLAT84 beziehungsweise SL3261/pLAT142 immunisierten *Meriones* sowie mit SL3261/pLAT142 immunisierten BALB/c nachgewiesen werden. Die übrigen *Salmonella* Stämme waren nicht in der Lage eine Serokonversion immunisierter Tiere herbeizuführen. Im Falle von SL3261/pLAT101 und /pLAT102 kann dies eindeutig auf die geringe Stabilität der Expressionsvektoren *in vivo* zurückgeführt werden. Des weiteren konnten beide Stämme keine Serokonversion gegen *S. typhimurium* LPS induzieren. Dies weist darauf hin, daß beide Vakzinstämmen in ihrer Fähigkeit zur Kolonisierung beeinträchtigt sind. Die hohe Kopienzahl von pLAT101 und pLAT102 und die damit verbundenen exprimierten hohen Antigenmengen stellt für die Zellen offenbar eine physiologische Belastung dar, die zum raschen Verlust der Expressionsvektoren *in vivo*

führten. Ähnliche Effekte wurden von Turner *et al.* (Turner *et al.*, 1993) beobachtet, die die Immunogenität von Ovalbumin (Ova) exprimierenden *S. typhimurium* Stämmen untersuchten. Mit einem pUC19 Derivat als Expressionsvektor für Ova transformierte Salmonellen waren im Gegensatz zu Salmonellen, die mit einem pBR322 Derivat transformiert waren, nicht in der Lage eine Ova spezifische Immunantwort zu induzieren. Ein pUC18 Derivat, das die Expression des protektiven Antigens Caf1 von *Y. pestis* bewirkte war ebenfalls *in vivo* instabil (Oyston *et al.*, 1995) und konnte *in vivo* nur durch Gabe von Antibiotika stabilisiert werden.

Die Menge des präsentierten Antigens ist vermutlich für die effiziente Induktion einer Immunantwort gegen die AVSOD2 entscheidend. Im Vergleich zum Zwei-Phasen-Vakzinstamm SL3261::84/pLAT7, der große Mengen ( ~ 5% des Gesamtzellproteins) an rekombinanter AVSOD2 exprimiert, synthetisieren die Vakzinstämme SL3281/pLAT84 und SL3261/pLAT142 signifikant weniger Antigen. Entsprechend ist die Reaktivität der Immunsereen von Tieren, die mit den FP68 exprimierenden Stämmen SL3261/pLAT84 und SL3261/pLAT142 immunisiert worden waren deutlich schwächer als die Reaktivität der Seren von mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisierten Tieren.

Verschiedene Studien, in denen die Antigenpräsentation durch rekombinante attenuierte *S. typhimurium* Stämme untersucht wurde, weisen ebenfalls darauf hin, daß die Menge des präsentierten heterologen Antigens den Grad der induzierten Immunantwort bestimmt. Karem *et al.* konstruierten einen durch das *asd* System stabilisierten Expressionsvektor für TetC (Karem *et al.*, 1995) und verglichen die Immunogenität des resultierenden *S. typhimurium* Vakzinstamms KR21 mit *S. typhimurium* BRD847 mit einem Stamm der, TetC unter  $P_{nirB}$  Kontrolle exprimiert (Chatfield *et al.*, 1992a). Das *asd* System beruht auf der Komplementierung einer chromosomalen Deletion des *asd* Gens, die zur Auxotrophie für Diaminopimelinsäure führt, mit einem *in trans* auf dem Expressionsvektor lokalisierten *asd* Gen (Galan *et al.*, 1990). KR21 exprimiert etwa zehnfach weniger rekombinantes TetC als BRD847 und induzierte eine signifikant schwächere humorale Immunantwort in BALB/c Mäusen während die durch beide Stämme induzierte mukosale Immunantwort in etwa gleich war. Ähnliches wurde in einen Vergleich von *S. typhimurium* Stämmen, die TetC unter Kontrolle der *ivi*-Promotoren  $P_{nirB}$  und  $P_{ntrA}$  exprimieren (Roberts *et al.*, 1998) beziehungsweise einen Vergleich der Präsentation von MalE in *S. typhimurium* Stämmen, die unterschiedliche Mengen MalE exprimierten (Fayolle *et al.*, 1994) beobachtet.

Generell scheint die Induktion einer spezifischen Immunantwort durch heterologe Antigene, die auf der Zelloberfläche attenuierter Vakzinstämme von *S. typhimurium* präsentiert werden, nicht sehr effizient zu sein. Die bisher angewendeten Strategien zielten darauf ab immundominante T- oder B-Zell Epitope in extrazelluläre Schleifen der Außenmembranproteine OmpA, PhoE oder LamB beziehungsweise von Strukturproteinen

von Flagellen oder Fimbrien zu inserieren (siehe 5.1.2.2). Die Größe der tolerierten Insertionen ist durch die Struktur der Außenmembranproteine auf Polypeptide von etwa 80 Aminosäuren beschränkt. *S. typhimurium* Stämme, die heterologe Peptide in extrazellulären Schlaufen von Außenmembranproteinen präsentierten, waren nur bedingt in der Lage eine spezifische Immunantwort gegen das heterologe Antigen zu stimulieren (Hayes *et al.*, 1991; Haddad *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 1995). Die Immunantwort gegen die oberflächenständig exprimierte Epitope ist in der Regel schwächer, als in vergleichbaren zytoplasmatischen oder periplasmatischen Expressionssystemen (Newton *et al.*, 1989; Haddad *et al.*, 1995). Diese Beobachtung korreliert mit der signifikant geringeren Expressionsrate der an der Zelloberfläche präsentierten Fusionen.

Im Gegensatz zur Insertion von Peptidepitopen in die Extrazellulärschlaufen von Außenmembranproteinen, erlaubt Autodisplay die stabile Oberflächenpräsentation vollständiger Genprodukte. Auf diese Weise ist zum ersten Mal die Möglichkeit gegeben strukturelle Epitope auf der Zelloberfläche von rekombinanten Vakzinstämmen darzustellen. Ein Problem dieses Systems stellt jedoch die unterschiedlich starke Expression der AIDA-I Fusionsproteine dar. Während CTB und verschiedene definierte Epitope prominente Außenmembranproteine darstellen, ist die Expression der AVSOD2-AIDA-I Fusionsproteine deutlich schwächer. Der Mechanismus, der zu diesen starken Unterschieden in der Expression der Passagiere führt, ist nicht bekannt. Möglicherweise könnte die Expression eines heterologen eukaryontischen Antigens durch die Anpassung an die Kodonpräferenz von Enterobakterien gesteigert werden.

Hess *et al.* konnten zeigen, daß die Sekretion heterologer *Listeria* Antigenen durch das  $\alpha$ -Hämolyysin System, im Gegensatz zu konventioneller zytoplasmatischer Expression in einem *S. typhimurium* Vakzinstamm, einen immunprotektiven Effekt gegen eine Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes* hatte (Hess *et al.*, 1997). Möglicherweise hat die Oberflächenpräsentation der AVSOD2 durch Autodisplay ebenfalls einen Effekt auf die Spezifität der induzierten humoralen Immunantwort. Die Immunsere von BALB/c Mäusen, die mit SL3261::pYZ84/pLAT7 immunisiert wurden, binden stärker an die SOD1, während die Seren von Mäusen, die mit FP68 exprimierenden Salmonellen immunisiert worden waren, präferentiell an SOD2 binden.

Auch gegen CTB, als Passagier an die AIDA-I Autotransporterdomäne fusioniert konnte eine humorale Immunantwort in Gerbils induziert werden. Sowohl SL3261/pJM7 als auch G30/pJM7 waren in der Lage, spezifische Antikörper gegen Wildtyp CTB zu induzieren. Dabei zeigte sich, daß nur zwei von fünf mit G30/pJM7 immunisierte Wüstenrennmäuse serokonvertierten, während fünf von sechs mit SL3261/pJM7 immunisierte Wüstenrennmäuse eine Serokonversion zeigten. Dies könnte ein Hinweis eine effizientere Antigenpräsentation von *aro* attenuierten Vakzinstämmen gegenüber Attenuierungen in

*gaIE*, also Veränderung des LPS Phänotyps, sein. Vergleichende Studien, die diesen Effekt untersuchen liegen bisher nicht vor. Eine vergleichende Studie des *S. typhi* *phoP/Q* Vakzinstamms Ty800 zeigte jedoch eine leicht verbesserte Fähigkeit zur Induktion einer Serokonversion in Probanden als Ty21a (*gaIE*) (Hohmann *et al.*, 1996). Interessanterweise konnte in drei BALB/c Mäusen, die mit SL3261/pJM7 immunisiert worden waren keine Serokonversion beobachtet werden. Es ist nicht auszuschließen, daß dies auf genetische Restriktion der BALB/c Mäuse zurückzuführen ist. Möglicherweise ist sind die MHC II Moleküle vom Haplotyp H2<sup>d</sup> nicht in der Lage die prozessierten CTB Epitope effizient zu binden. Eine genetische Restriktion im MHC II wirkte sich in verschiedenen Modellen neaktiv auf die Effizienz von Immunisierungen mit rekombinanten *Salmonella* Stämmen aus (Fayolle *et al.*, 1994; Chacon *et al.*, 1996). Die von Yan (Yan, 1992) beobachtete effiziente Stimulation des Immunsystems durch einen *S. typhimurium* Stamm *aroA* Stamm, der Wiltyp CTB unter Kontrolle des Zwei-Phasen-Systems exprimiert, lag möglicherweise an der Bindung freigesetzter CTB Pentamere an den natürlichen Rezeptor auf Enterozyten, das G<sub>M1</sub> Gangliosid. Dies wird als essentiell für die starke Immunogenität von CTB angesehen (Lebens und Holmgren, 1994; Kaper *et al.*, 1995). Eine Pentamerisierung von der CTB Untereinheit von FP59 auf der Zelloberfläche ist vermutlich nicht gegeben, da die für die Herstellung einer stabilen Tertiärstruktur essentiellen Cysteinreste substituiert sind.

Die hier dargestellten Experimente zeigen, daß *S. typhimurium* Vakzinstämmen, die heterologe Antigene durch Autodisplay auf der Zelloberfläche präsentieren, prinzipiell in der Lage sind eine humorale Immunantwort gegen das heterologe Antigen zu induzieren. Die durch FP68 exprimierende Salmonellen induzierte humorale Immunantwort war jedoch deutlich schwächer als die mit dem Zwei-Phasen Vakzin Stamm SL3261::pYZ84/pLAT7, der große Mengen rekombinanter AVSOD2 exprimiert. Durch eine Steigerung der Expressionsrate des heterologen Antigens müßte es demnach möglich sein durch Autodisplay eine stärkere humorale Immunantwort zu stimulieren zu können.

Die Effekte der Oberflächenpräsentation eines heterologen Antigens auf einen protektiven Immunschutz müßten mit einem bereits identifiziertem protektiven Antigen eines Pathogens untersucht werden, bei dem die Art und Weise der Präsentation durch Salmonellen für die Induktion einer adäquaten Immunantwort essentiell ist. Beispiele hierfür sind die SOD von *L. monocytogenes* (s.o., (Hess *et al.*, 1997)) oder Urease von *H. pylori*, die als lösliches zytoplasmatisches Antigen von *S. typhimurium* Vakzinstämmen präsentiert eine protektive Wirkung im Mausmodell zeigte (Gomez-Duarte *et al.*, 1998), während die Vakzinierung mit Urease-Einschlußkörper bildenden *Salmonella* Stämmen nur eine partielle Protektion vermittelte (O.G. Gomez-Duarte, B. Lucas, pers. Mitteilung).

## 5.4 Zusammenfassung

Die extrazelluläre SOD von *A. viteae* wurde durch Autodisplay stabil auf der Zelloberfläche von *E. coli* und *S. typhimurium* präsentiert. Genetische Fusionen der AVSOD2 cDNA mit der Autotransporterdomäne von AIDA-I resultierten in der Translokation der AVSOD2 Untereinheit des Fusionsproteins FP67 über die Zellhülle. Die Translokation der AVSOD2 Untereinheit war unabhängig vom *dsbA* Phänotyp. Der Passagier wurde durch die Behandlung mit exogen zugegebenen Proteasen von der Zelloberfläche abgespalten und konnte durch das spezifische Antiserum AS1 auf der Zelloberfläche durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Für Vakzinierungsexperimente wurde ein *in vivo* induzierbares Expressionssystem für FP67 entwickelt, das die spezifische Expression von FP67 in *Salmonella* Vakzinstämmen nach der Infektion der Zielzellen *in vivo* erlaubt. Expressionsvektoren, die für FP67 kodierten waren *in vivo* stabil, die entsprechenden Vakzinstämmen induzierten jedoch, vermutlich aufgrund der geringen präsentierten Antigenmenge, nur eine schwache humorale Immunantwort in vakzinierten Gerbils und BALB/c Mäusen gegen die AVSOD2. Vakzinierungsexperimente mit Salmonellen, die eine CTB-AIDA-Fusion exprimierten, resultierten in der Stimulation einer humoralen Immunantwort gegen CTB in Gerbils.

## **6 Export enzymatisch aktiver $\beta$ -Laktamase auf die Zelloberfläche von *E. coli* durch Autodisplay**

### **6.1 Einleitung**

Proteinsekretion und stabile Oberflächenpräsentation von Proteinen durch Gram-negative Bakterien sind für verschiedenartige biotechnologische Fragestellungen attraktiv. Diese Fragestellungen beinhalten (a) die Herstellung rekombinanter Lebendvakzinstämme, (b) die Konstruktion bakterieller Ganzzell-Adsorbents zur Immobilisierung toxischer oder zu recycelnder Substanzen, (c) den Export von Proteindomänen zur Erforschung von Rezeptor-Ligand-Interaktionen (d) die Oberflächenpräsentation von randomisierten Peptidbibliotheken und (e) den Export biologisch aktiver Proteine für biotechnologische oder biomedizinische Anwendungen. Die spezialisierten Exportsysteme Gram-negativer Bakterien, die in jüngster Zeit charakterisiert wurden, erlauben die Sekretion heterologer Proteine in den Kulturüberstand rekombinanter Expressionsstämme oder deren stabile Präsentation auf der Zelloberfläche (siehe Einleitung Kapitel 5). So wurden verschiedene heterologe Antigene durch das *E. coli*  $\alpha$ -Hämolyinsystem von *Salmonella*-Vakzinstämmen in das umgebende Medium sekretiert (Tzschaschel *et al.*, 1996b; Hess *et al.*, 1997; Gentshev *et al.*, 1997). Auch das Typ-III Sekretionssystem von *Y. enterocolitica* ist in der Lage, die Translokation rekombinanter Proteine in das umgebende Medium zu bewirken (Sory *et al.*, 1995; Schesser *et al.*, 1996).

Die Präsentation heterologer Proteine auf der Zelloberfläche Gram-negativer Bakterien wurde mit verschiedenen Systemen erreicht. In die extrazellulären Schleifen der Außenmembranproteine OmpA, PhoE und LamB sowie in nicht essentielle Bereiche von FliC und FimH, den Strukturkomponenten von Flagellen beziehungsweise Fimbrien, wurden heterologe Polypeptide bis zu 80 Aminosäuren eingesetzt und an der Zelloberfläche präsentiert (siehe Kapitel 5.1.2.2). Dies wurde in der Hauptsache im Zusammenhang mit rekombinanten *Salmonella*-Lebendimpfstoffen und der Präsentation randomisierter Peptidbibliotheken untersucht (Lu *et al.*, 1995). Die Insertion größerer Aminosäureabschnitte in die extrazellulären Schleifen von Außenmembranproteinen wirken sich offenbar negativ auf die Ausbildung des  $\beta$ -Fasses aus und führt zu einer inkorrekten subzellulären Lokalisation der Fusionsproteine (Agterberg *et al.*, 1990; Ruppert *et al.*, 1994).

Pullulanase von *K. oxytoca* wird durch Typ II Sekretion sezerniert und bleibt temporär mit der Außenmembran assoziiert. Dies erlaubt den Export von Fusionspartnern, die somit

ebenfalls vorübergehend mit der Außenmembran assoziiert vorliegen (Kornacker und Pugsley, 1990). Eine weitere Strategie zur Oberflächenpräsentation, ist die Fusion von Passagierproteinen mit dem Aminoterminus des Peptidoglykanassozierten Lipoproteins (PAL) von *E. coli*. Eine Fusion von PAL mit einem *single chain* Antikörper (scFv) wurde auf der Oberfläche von *E. coli* nachgewiesen. Die im Periplasma lokalisierte Fusion war nach einer Behandlung der Wirtszellen mit EDTA für exogen zugegebenes Antigen zugänglich und erlaubte fluoreszenzaktivierte Zellseparation (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) der Zellen (Fuchs *et al.*, 1991).

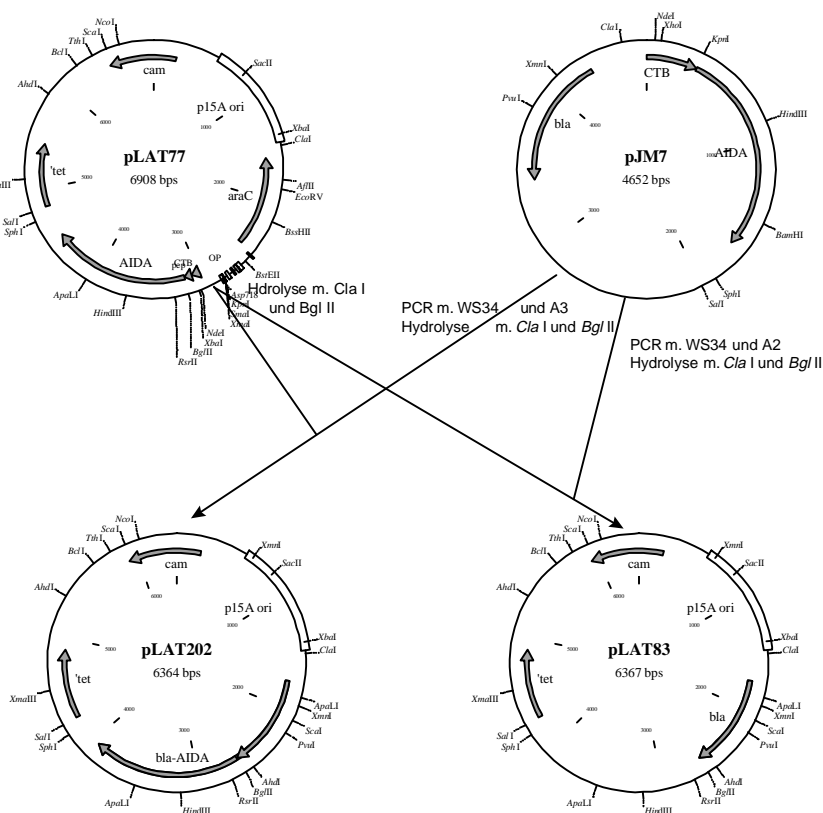
Francisco *et al.* entwickelten 1992 ein System zur Oberflächenpräsentation von Passagieren, indem sie ein Hybridmolekül aus den aminoterminalen 9 Aminosäuren des Braun'schen Lipoproteins (Lpp) mit einem fünf  $\beta$ -Faltblätter umfassenden Fragment von OmpA (Aminosäuren 46 bis 159) sowie einer carboxyterminal des OmpA-Abschnitts lokalisierten  $\beta$ -Laktamase als Passagier herstellten (Francisco *et al.*, 1992). Die  $\beta$ -Laktamase Untereinheit des Fusionsproteins wurde stabil auf der Oberfläche von *E. coli* exprimiert und wies enzymatische Aktivität auf. Der selben Arbeitsgruppe gelang es die *Cex* Exoglucanase von *Cellulomonas fimi* und einen scFV-Antikörper als Triple-Fusion mit dem Lpp-OmpA-System zu exportieren (Francisco *et al.*, 1993; Francisco *et al.*, 1993). Kürzlich konnten Jung *et al.* (Jung *et al.*, 1998) Levansucrase von *Zymomonas mobilis* auf der Oberfläche von *E. coli* als Fusion mit dem *ice nucleation protein* Lnp von *Pseudomonas syringae* darstellen. Die Zellen prägten sowohl die Eigenschaften von Lnp als auch Levansucrase-Aktivität aus.

Die Autotransporter der IgA1 Protease von *N. gonorrhoeae* (Klauser *et al.*, 1990; Klauser *et al.*, 1992) VirG von *S. flexneri* (Shimada *et al.*, 1994), SSP von *S. marcescens* (Suzuki *et al.*, 1995) und AIDA-I von *E. coli* (Maurer *et al.*, 1997) wurden für den Export heterologer Passagiere verwendet (siehe Kapitel 5.1.2.2). Bisher konnte jedoch von keiner der durch Autotransporter oberflächenständig dargestellten Passagierdomänen biologische Aktivität gezeigt werden.

## 6.2 Ergebnisse

### 6.2.1 Konstruktion eines Autodisplay-Vektors für $\beta$ -Laktamase

Zur Konstruktion eines Autodisplay-Vektors für  $\beta$ -Laktamase (Bla) wurde aus dem Plasmid-Vektor pJM7 ein PCR-Fragment mit den Oligonukleotidprimern A3 und WS34 generiert. Der Primer A3 bindet an das 3' Ende des *bla*-Gens. Das Stopkodon ist gegen eine *Bgl* II Schnittstelle ausgetauscht, so daß das PCR-Fragment nach Hydrolyse mit *Cla* I und *Bgl* II in den entsprechend vorbereiteten Vektor pLAT77 inseriert werden konnte.

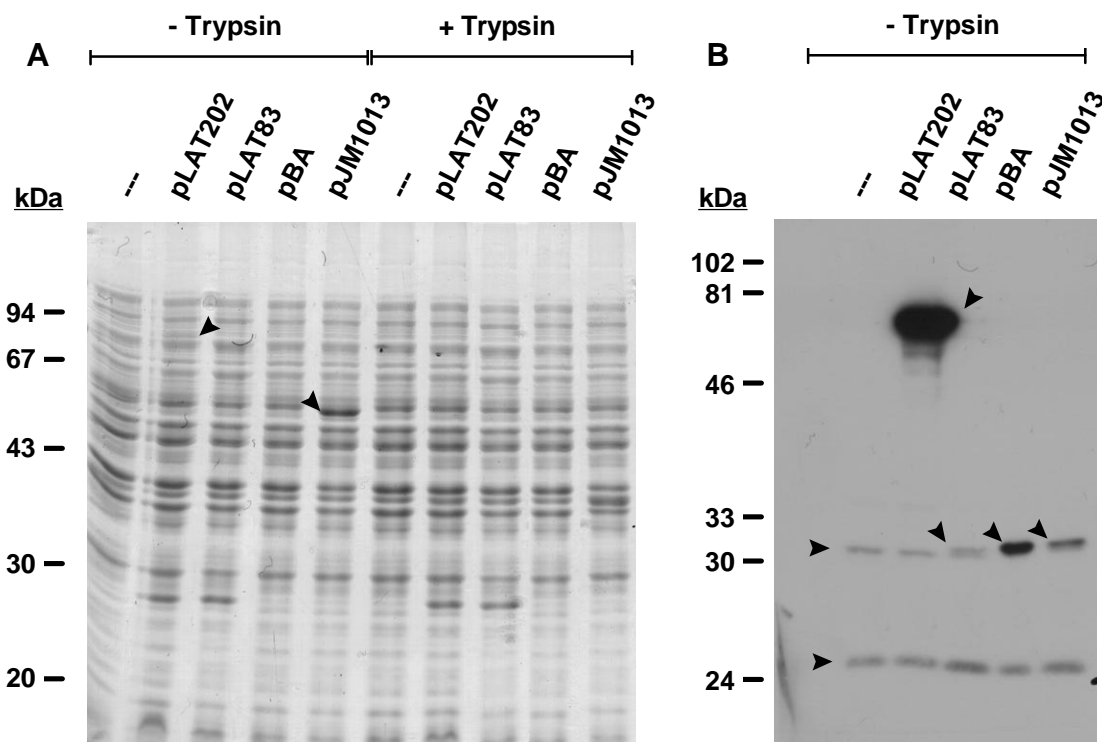


**Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der genetischen Fusion von *bla* und der Autotransporterdomäne von AIDA-I.** Das *bla* Gen wurde durch PCR aus pJM7 mit den Primern WS34 und A3, beziehungsweise WS34 und A2 amplifiziert und in den Vektor pLAT77 inseriert. Die resultierenden Plasmide pLAT202 und pLAT83 kodieren für ein Bla-AIDA-I Fusionsprotein beziehungsweise Wildtyp Bla.

pLAT77 ist ein Derivat von pACYC184 (Rose, 1988) und kodiert für ein AIDA-I-Fusionsprotein mit einem Nef-Epitop unter Kontrolle einer Kombination des  $P_{BAD}$ -Promotors und *araC*, dem Repressor des Arabinose-Opreons (Guzman *et al.*, 1995). Durch Restriktion mit *Cla* I und *Bgl* II wurden *araC*, die zugehörigen Operatorsequenzen und die für das Nef-

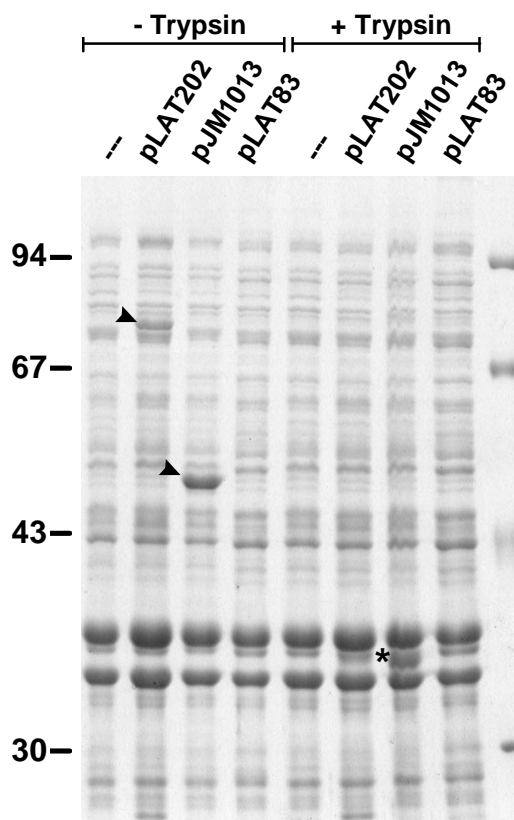


Epitop kodierenden Sequenzen entfernt. Unter Beibehaltung des Leserahmens kann so das durch Cla I/Bgl II hydrolysierte A3/WS34 PCR-Fragment mit dem für die Autotransporterdomäne von AIDA-I kodierenden Sequenzabschnitt fusioniert werden. Das resultierende Plasmid pLAT202 kodiert demnach ein Bla-AIDA-I Fusionsprotein dessen Expression durch den nativen Bla-Promotor  $P_{Bla}$  reguliert wird. Das errechnete Molekülmasse des reifen Bla-AIDA-Fusionsproteins FP77 beträgt 77,4 kDa. Zur Kontrolle wurde nach der selben Strategie das Plasmid pLAT83 hergestellt, das Wildtyp Bla kodiert. Analog zur Konstruktion von pLAT202 wurde ein PCR Fragment mit den Oligonukleotidprimern A2 und WS34 hergestellt. Der Primer A2 ist mit A3 nahezu identisch enthält jedoch zusätzlich das Stopkodon der Bla. Somit ist in pLAT83 zwischen dem *bla*-Gen und dem für die Autotransporterdomäne kodierenden Sequenzabschnitt ein Translationsstop eingefügt. Zur Überprüfung der Expression von FP77 wurde *E. coli* JK321 mit pLAT202 transformiert und ein Ganzzellsatz durch SDS-PAGE und Western Blot untersucht.



**Abbildung 6.2: Expression von FP77 in *E. coli* JK321.** Ganzzellsate von JK321, JK321/pLAT202, /pLAT83, /pBA und /pJM1013 wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (A) und Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen Bla untersucht. Die Pfeilspitzen markieren: (A) FP77 (Orientierung nach links unten), FP50 (nach rechts unten). (B) FP77 (nach links unten), Wildtyp Bla (nach rechts unten) und potentielle Penizillin-Bindeproteine (waagrecht).

Zu Kontrollzwecken wurden folgende Stämme eingesetzt: (i) JK321 exprimiert keine Bla; (ii) JK321/pLAT83 exprimiert Wildtyp Bla vom selben Plasmid-Hintergrund (p15A Replikationsursprung); (iii) JK321/pBA exprimiert Wildtyp Bla und (iv) JK321/pJM1013, exprimiert Wildtyp-Bla und ist zu dem FP50 kodierenden Plasmid pJM22 (Maurer *et al.*, 1997) verwandt. FP50 ist eine 50 kDa große Fusion eines Epitops mit der Autotransporterdomäne von AIDA-I deren Expression durch den starken konstitutiven  $P_{TK}$  Promotor reguliert wird (Maurer, 1998). FP77 migriert in SDS-PAGE bei  $\sim 77$  kDa und ist durch Coomassie Brilliant Blue im Ganzzelllysate anfärbbar (Abbildung 6.2A). Die Bla-Untereinheit von FP77 konnte durch die Behandlung mit Trypsin von der Oberfläche physiologisch intakter JK321/pLAT202 Zellen abgespalten werden. Ein monoklonaler Bla-spezifischer Antikörper reagierte mit FP77 und zwei weiteren Proteinen von etwa 25 und 31 kDa im Totalhomogenat von JK321/pLAT202 (Abbildung 6.2B). Beide Proteine sind ebenfalls im Totalhomogenat von JK321 nachzuweisen und stellen vermutlich Penizillin-Bindeproteine dar. In den Totalhomogenaten von JK321/pLAT83, /pBA und /pJM1013 wird durch den Antikörper zusätzlich Wildtyp Bla nachgewiesen. Wildtyp Bla migriert als ein nur unwesentlich größer erscheinendes Protein als das kreuzreaktive  $\sim 31$  kDa Protein. Nach Trypsinierung ganzer Zellen ist FP77 auch im Western Blot nicht mehr im Totalhomogenat von JK321/pLAT202 nachzuweisen (nicht gezeigt). FP77 wird demnach stabil in JK321/pLAT202 exprimiert und ist durch exogen zugegebenes Trypsin abspaltbar.

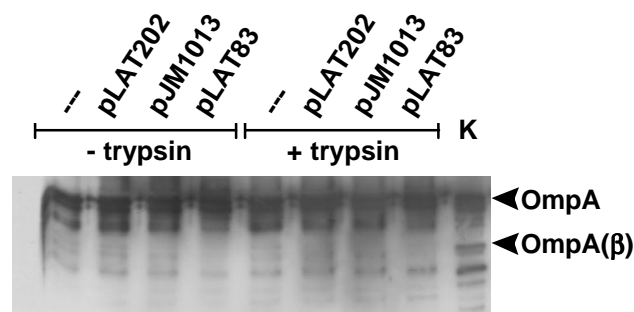


**Abbildung 6.3: Membranlokalisation von FP77.** Außenmembranen von JK321, JK321/pLAT202, /pJM1013 und /pLAT83 wurden durch die Sarkosylmethode präpariert und durch SDS-PAGE und Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue untersucht. Zellen wurden vor dem Aufschluß mit Trypsin behandelt (+ Trypsin) oder unbehandelt belassen. Die Pfeilspitzen markieren FP77 und FP50, der Stern markiert das proteaseresistente bei 37 kDa migrierende  $\beta$ -Faß von AIDA-I.

Die Integration von F77 in die Zellhülle von JK321/pLAT202 wurde durch eine Außenmembranpräparation überprüft. Abbildung 6.3 zeigt, daß FP77 in der Außenmembranfraktion angereichert wird. Die Behandlung physiologisch intakter Zellen mit Trypsin führte zur partiellen Degradation von FP77 und FP50. Das proteaseresistente  $\beta$ -Faß der Autotransporterdomäne beider Fusionsproteine blieb stabil in der Außenmembran verankert.

## 6.2.2 Die Außenmembran von FP77 exprimierenden Zellen ist intakt

Die Integrität der Außenmembran von FP77 exprimierenden Zellen wurde durch ein Kontrollexperiment mit dem *E. coli* Hauptaußenmembranprotein OmpA als Marker überprüft. OmpA ist durch ein  $\beta$ -Faß aus acht Faltblättern in der Außenmembran integriert (Vogel und Jähnig, 1986) und besitzt eine periplasmatische Domäne, die vermutlich über nicht kovalente Wechselwirkungen mit dem Peptidoglykan assoziiert ist. In Zellen, die einen hohen Grad an Membranunordnung ausprägen, ist diese periplasmatische Domäne sensitiv gegen Trypsinverdau ganzer Zellen (Klauser *et al.*, 1990; Georgiou *et al.*, 1996). Das in die Außenmembran integrierte  $\beta$ -Faß von OmpA ist hingegen trypsinresistent und migriert bei 28 kDa.



**Abbildung 6.4: Versuch der Spaltung der periplasmatische Domäne von OmpA durch Trypsinierung physiologisch intakter FP77 exprimierender Zellen.** Physiologisch intakte Zellen von JK321, JK321/pLAT202, /pLAT83 und pJM1013 wurden mit Trypsin behandelt und Außenmembranen durch die Sarkosylmethode präpariert. Die Außenmembranen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit einem für OmpA spezifischen Kaninchenserum (AK57) untersucht. Das proteaseresistente 28 kDa große OmpA Fragment wurde durch den Verdau aufgereinigter Außenmembranen mit Trypsin erzeugt. K = Kontrollverdau von Aufgereinigten Membranen mit Trypsin; OmpA(  $\beta$  ) = trypsinresistentes  $\beta$ -Faß von OmpA

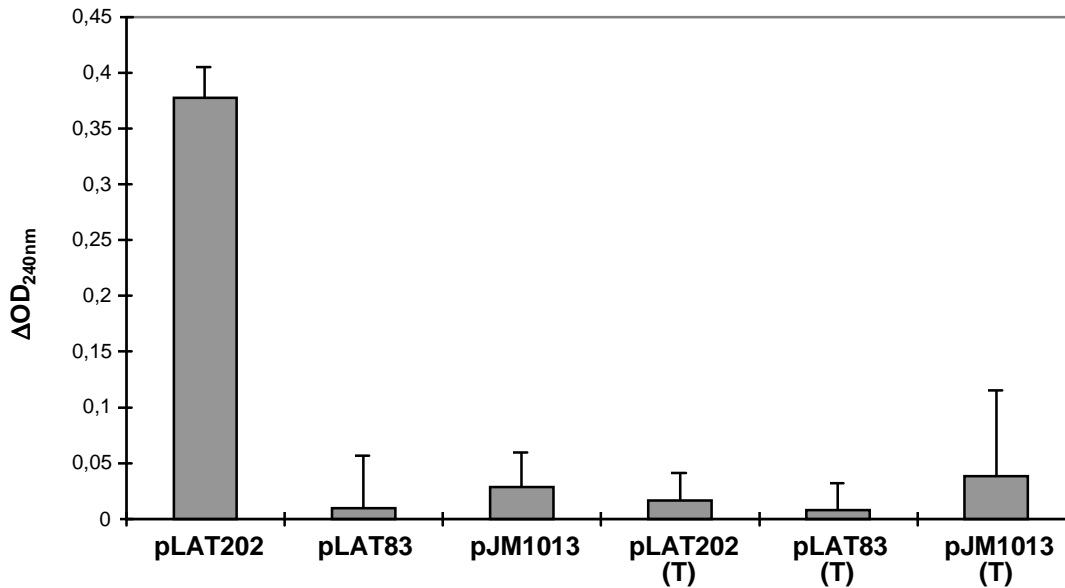
Physiologisch intakte JK321 Zellen, die FP77 oder FP50 exprimierten wurden mit Trypsin behandelt, die Außenmembranen präpariert und auf Degradation von OmpA überprüft. In keinem der getesteten Stämme konnte eine Spaltung von OmpA unter den angelegten experimentellen Bedingungen beobachtet werden (Abbildung 6.4). Diese Bedingungen

führten jedoch die vollständige Degradation der Passagiere von AIDA-I Fusionsproteinen herbei (Abbildung 6.2). Dieses Resultat belegt, daß JK321 Zellen, die AIDA-I Fusionsproteine exprimieren über eine intakte Außenmembran verfügen. Diese intakte Außenmembran ist dazu in der Lage ist ihre natürliche Funktion als physiologische Barriere zwischen Periplasma und dem extrazellulären Medium zu erfüllen.

### 6.2.3 Die oberflächenständige Bla ist enzymatisch aktiv

FP77 exprimierende JK321/pLAT202 Zellen prägten eine Resistenz gegen Ampicillin aus, das dem Kultivierungsmedium zugefügt worden war (100 mg / ml). Dies war der erste Hinweis auf eine funktionelle Bla-AIDA-I Fusion. Offenbar beeinflusst die Fixierung des Carboxyterminus der Bla mit der AIDA-I Autotransporterdomäne nicht die korrekte, für enzymatische Aktivität notwendige Faltung der Bla. Um zwischen periplasmatischer und oberflächenlokalisierter Bla Aktivität zu unterscheiden zu können, wurde ein *in vivo* Experiment zur Spaltung des Substrats Penizillin G durch physiologisch intakte FP77 exprimierende Zellen durchgeführt. Penizillin G weist ein Absorptionsmaximum bei 240 nm auf. Auf dieser Grundlage ist es möglich den Penizillin G Gehalt einer Lösung zu bestimmen und so die Benzylpenicillinase-Aktivität FP77 exprimierender Zellen zu ermitteln. Als Kontrollen wurden die Stämme JK321, JK321/pLAT83 und JK321/pJM1013 verwendet. JK321/pJM1013 prägt zusätzlich zur periplasmatisch lokalisierten Bla große Mengen FP50 auf der Oberfläche aus und erlaubt somit Rückschlüsse auf den Einfluß von AIDA-I Fusionsproteinen auf die Membranintegrität.

Die Bla-Aktivität physiologisch intakter JK321 Zellen, die mit pLAT202, pLAT83 oder pJM1013 transformiert worden waren, wurde durch die Rate der Hydrolyse von Penizillin G verglichen. Physiologisch intakte, FP77 exprimierende JK321/pLAT202 Zellen besitzen im Vergleich zu den Kontrollstämmen JK321/pLAT83 und JK321/pJM1013 eine um den Faktor 40 beziehungsweise 13 höhere  $\beta$ -Laktamase Aktivität (Abbildung 6.5). Wurden die Zellen vor der Bestimmung der Bla-Aktivität mit Trypsin behandelt und so die Bla-Untereinheit von FP77 exprimierenden Zellen entfernt, reduzierte sich die gemessene Ganzzell-Bla-Aktivität von JK321/pLAT202 um 95 % auf Hintergrundwerte, während die Bla-Aktivität von JK321/pLAT83 und JK321/pJM1013 auf Hintergrundniveau unverändert blieb.



**Abbildung 6.5: Bestimmung der Bla-Aktivität physiologisch intakter JK321/pLAT202 Zellen.** Die Bakterien wurden in PBS resuspendiert und, mit einer Penizillin G Lösung inkubiert. Nach 10 min wurden die Zellen durch eine kurze Zentrifugation entfernt und die  $OD_{240nm}$  des Überstands bestimmt. Die Werte sind als relative  $\Delta OD_{240nm}$  Werte mit JK321 als Standard dargestellt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus  $\geq 5$  unabhängigen Messungen in Triplikaten.

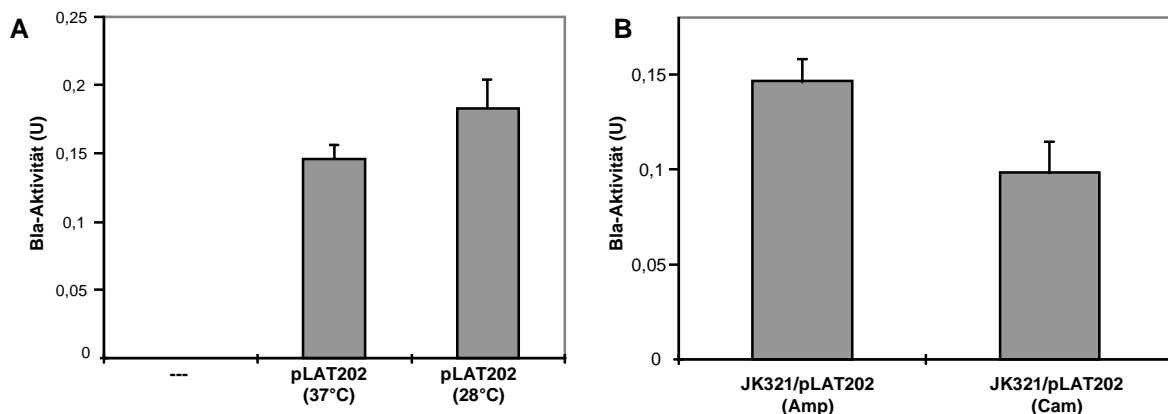
Die spezifische Aktivität von  $\beta$ -Laktamasen wird als Benzylpenizillin-Einheit angegeben. Eine Benzylpenizillin-Einheit ist als die Menge einer Substanz definiert, die 1  $\mu$ mol Benzylpenizillin (Penizillin G) hydrolysiert. Auf dieser Basis wurde die spezifische Aktivität von 1,0  $OD_{575nm}$  ( $\sim 2,5 \times 10^9$  cfu) JK321/pLAT202 Zellen berechnet (Tabelle 6.1). Die spezifische Benzylpenizillinase Aktivität von 1,0  $OD_{575nm}$  JK321/pLAT202 Zellen beträgt 142 mU. Daraus folgt die spezifische Aktivität einer FP77 exprimierenden Zelle von  $6 \times 10^{11}$  U.

Stamm	Penizillinase Aktivität (mU)	Aktivität nach Behandlung mit Trypsin (mU)	Reduktion der Aktivität nach Behandlung mit Trypsin
JK321/pLAT202	148 ( $\pm 10$ )	6 ( $\pm 30$ )	95 %
JK321/pLAT83	4 ( $\pm 18$ )	3 ( $\pm 1$ )	---
JK321/pJM1013	11 ( $\pm 12$ )	14 ( $\pm 14$ )	---

**Tabelle 6.1. Ganzzellaktivität von JK321 Zellen, die oberflächenständige oder periplasmatisch lokalisierte Bla ausprägen.** Eine Benzylpenizillinase-Einheit ist definiert als die Menge einer Substanz, die 1  $\mu$ mol Penizillin G pro min hydrolysiert.

## 6.2.4 Kultivierungstemperatur und Substrat beeinflussen die Aktivität der oberflächenständigen Bla

Um den Einfluß der Kultivierungstemperatur auf die Bla-Aktivität FP77 exprimierender Zellen zu bestimmen, wurde JK321/pLAT202 über Nacht bei 28 °C oder 37 °C auf LB<sub>Amp</sub>-Platten gezüchtet und die Bla-Aktivität physiologisch intakter Zellen bestimmt. Bei 28 °C kultivierte Zellen besaßen mit 182 mU pro OD<sub>575nm</sub> eine um den Faktor 1,25 höhere Ganzzell-Bla-Aktivität als bei 37 °C kultivierte Zellen (142 mU; Abbildung 6.6A). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre eine unterschiedliche Regulation der Expression von FP77 bei 28 °C oder 37 °C. Aus diesem Grund wurde die Menge an FP77 im Tothomogenat von JK321/pLAT202 Zellen, die bei 28 °C oder 37 °C kultiviert worden waren, durch Western Blot mit dem Bla-spezifischen monoklonalen Antikörper untersucht. Dieses Experiment zeigte keinen unterschied in der Expression von FP77 in Zellen, die bei 28 °C oder 37 °C kultiviert worden waren (nicht gezeigt).



**Abbildung 6.6. Einfluß von Kultivierungstemperatur und Substrat auf die Ganzzell-Bla-Aktivität von JK321/pLAT202.** (A) JK321/pLAT202 wurde über Nacht bei 28 °C oder 37 °C auf LB<sub>Amp</sub>-Platten gezüchtet, in PBS resuspendiert und die Ganzzell-Bla-Aktivität bestimmt. (B) JK321/pLAT202 wurde über Nacht auf LB-Platten, supplementiert mit 100 mg/l Ampicillin (Amp) oder 30 mg/ml Chloramphenicol (Cam), gezüchtet, in PBS resuspendiert und die Ganzzell-Bla-Aktivität bestimmt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens 5 unabhängigen Messungen in Triplikaten.

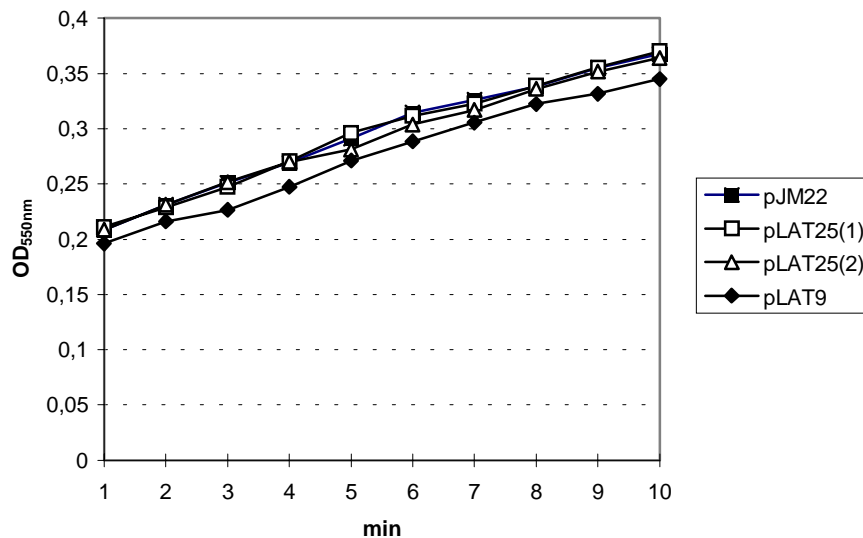
Der Einfluß von Substrat im Kultivierungsmedium auf die Aktivität der oberflächenständigen Bla wurde durch ein Experiment untersucht, in dem die Ganzzell-Bla-Aktivität von JK321/pLAT202 Zellen untersucht wurde, die auf LB-Platten mit Ampicillin oder Chloramphenicol zur Selektion auf pLAT202 gezüchtet wurden. Dieses Experiment zeigte, daß sich die Ganzzell-Bla-Aktivität von physiologisch intakten FP77 exprimierenden Zellen um etwa 30 % reduzierte, wenn die Zellen auf chloramphenicolhaltigem Medium angezogen worden waren. Wiederum wurde die Menge an exprimiertem FP77 im Totalhomogenat der

unterschiedlich gezüchteten JK321/pLAT202 Zellen bestimmt, um auszuschließen, daß Genregulation für diesen Effekt war verantwortlich. Auch in diesem Fall konnte ausgeschlossen werden, daß sich die Aktivität der unterschiedlich gezüchteten Zellen aufgrund unterschiedlicher Mengen FP77 auf der Oberfläche unterschied, da sich die Intensität der im Western Blot mit dem Bla-spezifischem Antikörper FP77-Banden nicht unterschied (nicht gezeigt). Die Ganzzell-Bla-Aktivität blieb nach fünfmaliger Passage von JK321/pLAT202 Zellen über chloramphenicolhaltiges Medium auf dem Niveau einmalig passagierter Zellen stabil (nicht gezeigt). Durch einmaliges Passagieren auf ampicillinhaltigem Medium konnte die Ganzzell-Bla-Aktivität von JK321/pLAT202 wieder auf  $\sim 140$  mU pro  $1,0 \text{ OD}_{575\text{nm}}$  gesteigert werden (nicht gezeigt).

### 6.2.5 Zytochrom C Reduktionstest zur Aktivitätsbestimmung der oberflächenständigen AVSOD2 in *E. coli* UT5600/pLAT25

Durch einen Zytochrom C (Cyt<sub>c</sub>) Reduktionstest sollte die Ganzzell-SOD-Aktivität FP67 ausprägender Zellen bestimmt werden. Dieser Test basiert auf der Reduktion von Cyt<sub>c</sub> durch das Xanthin / Xanthin-Oxidase-System. Xanthin Oxidase oxidiert Xanthin unter Bildung von Superoxid, das in Lösung befindliches Cyt<sub>c</sub> zu reduziert (Mccord und Fridovich, 1969). Reduziertes Cyt<sub>c</sub> hat gegenüber nicht reduziertem Cyt<sub>c</sub> ein verändertes Absorptionsspektrum dessen Maximum bei einer Wellenlänge von 550 nm liegt. Durch Messung der  $\text{OD}_{550\text{nm}}$  einer Lösung kann so die Zunahme an reduziertem Cyt<sub>c</sub> bestimmt werden. Liegt nun in der Lösung SOD Aktivität vor, die Superoxid inaktiviert, nimmt die Rate der Cyt<sub>c</sub> Reduktion folglich ab. Zur Bestimmung der Ganzzell-SOD-Aktivität von *E. coli* UT5600/pLAT25 wurden die Zellen über Nacht auf LB-Medium angezüchtet, dem jeweils 0,02 mM Kupfersulfat und Zinkchlorid beigemischt waren um die im Aktiven Zentrum von CuZn SODs lokalisierten Spurenelemente in ausreichender Konzentration anzubieten. Zur Kontrolle wurden im selben Experiment UT5600/pJM22 ein FP50 exprimierender Stamm, sowie UT5600/pLAT9 der die AVSOD-AIDA-I Fusion FP65 exprimiert. Die AVSOD2 Untereinheit dieser Fusion ist in carboxyterminalen 14 Aminosäuren deletiert und kann darum keine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden (siehe Kapitel 5.1). Für das Experiment wurde eine Cyt<sub>c</sub> Stammlösung mit Xanthin versetzt und  $0,2 \text{ OD}_{575\text{nm}}$  Bakteriensuspension zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  einer Xanthin-Oxidase Lösung gestartet. Ohne Zugabe von Xanthin Oxidase blieb die  $\text{OD}_{550\text{nm}}$  konstant, es fand keine Reduktion von Cyt<sub>c</sub> durch Bakterien allein statt. Nach Zugabe der Xanthin Oxidase nahm die  $\text{OD}_{550\text{nm}}$  bei allen im Experiment untersuchten Stämmen in gleicher Weise zu (Abbildung 6.7). Es konnte demnach kein Hinweis erbracht werden, daß die auf der Oberfläche von *E. coli* UT5600/pLAT25 lokalisierte AVSOD2

enzymatisch aktiv ist. Das Experiment wurde mit physiologisch intakten Zellen verschiedener FP67 ausprägenden *E. coli* und *S. typhimurium* Stämme sowie mit aufgereinigten Außenmembranen dieser Stämme durchgeführt (nicht gezeigt).



**Abbildung 6.7: Cytc Reduktionstest zur Bestimmung oberflächenlokalisierter SOD-Aktivität in *E. coli* UT5600/pLAT25.** *E. coli* UT5600/pLAT25, /pLAT9 und pJM22 wurden in TBS resuspendiert und 0,2 OD<sub>575nm</sub> zum einem Cytc Reduktionstest verwendet. Als Maß für die Reduktion von Cytc wurde die Veränderung der OD<sub>550nm</sub> herangezogen. Dieser Graph stellt eine repräsentative Messung dar (Messwerte in Triplikaten).

### 6.3 Diskussion

In diesem Kapitel wurde der Export eines funktionalen Enzyms auf die Oberfläche von *E. coli* durch Autodisplay beschrieben. Dies ist der erste Hinweis auf den Export eines funktionellen Enzyms durch Autodisplay und zeigt das Potential von Autodisplay für die Präsentation bioaktiver Moleküle auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien. Bla wurde als Untereinheit eines Fusionsproteins mit der Autotransporterdomäne von AIDA-I auf die Zelloberfläche exportiert und stabil exprimiert. Dies wurde durch die Zugänglichkeit der Bla-Untereinheit von FP77 für Trypsin und durch die effiziente Spaltung von Penizillin G durch physiologisch intakte FP77 exprimierende Zellen gezeigt.

Die Präsentation von Biomolekülen auf der Oberfläche von Bakterien und Bakteriophagen gewinnt durch attraktive Anwendungen in Biotechnologie, Biomedizin und der Entwicklung von Impfstoffen an Bedeutung (Georgiou *et al.*, 1997). Die Oberflächenpräsentation



randomisierter Peptidbibliotheken als Fusionspartner mit Hüllproteinen filamentöser Bakteriophagen (*phage display*) ist eine etablierte Technik zur Identifikation von Leitstrukturen, die Interaktionen von Ligand und Rezeptor oder Enzym und Substrat modellieren beziehungsweise inhibieren (Cesareni, 1992; McGregor, 1996). Meist führt die Durchmusterung dieser Bibliotheken zur Isolierung von Peptiden die linearen Epitopen größerer Proteindomänen entsprechen beziehungsweise zur Identifikation von Peptidanaloga die *in vivo* an Proteinstrukturen binden. Zur Modellierung dreidimensionaler Strukturen wurden Peptidbibliotheken entwickelt, die die randomisierten Peptide zwischen zwei Cysteinresten ausprägen, wodurch eine in ihrer räumlichen Struktur fixierte Schlaufe entsteht (Lener *et al.*, 1995; McConnell *et al.*, 1994). Durch *phage display* wurden Epitope monoklonaler Antikörper charakterisiert, die mit der Primärsequenz des Proteins übereinstimmten, gegen den der entsprechende Antikörper gerichtet war (Jellis *et al.*, 1993). Ebenso konnten Peptidliganden von monoklonalen Antikörpern identifiziert werden, die spezifisch für Kohlenhydratstrukturen (Valadon *et al.*, 1996) oder strukturelle Epitope sind (Jensenjarolim *et al.*, 1998; Kay *et al.*, 1993). Diese Peptidliganden werden auch als sogenannte Mimotope bezeichnet. Des Weiteren wurden Liganden für intrazelluläre Signaltransduktionsdomänen (Rickles *et al.*, 1994), Rezeptorantagonisten (Doorbar und Winter, 1994) Tumorsuppressor-Protein p53 bindende Peptide (Daniels und Lane, 1994) und immunogene B-Zell Epitope (Motti *et al.*, 1994) aus *phage display* Bibliotheken isoliert. Neben randomisierten Peptidbibliotheken werden Bibliotheken rekombinanter Antikörperfragmente (scFv) zur Isolierung von Antikörpern mit potentiell pharmakologischer Bedeutung verwendet (Burton und Barbas, 1994; Winter *et al.*, 1994; Hoogenboom, 1997). Die Identifikation mit dem Substrat interagierender Phagen, die hochaffin bindende scFv-Fragmente oder Peptide auf ihrer Oberfläche tragen, stellt einen zentralen Schritt in der *phage display* Technologie dar. In jüngster Zeit wurden für diese Fragestellung effiziente Methoden der Durchmusterung von Phagenbibliotheken etabliert (McGregor, 1996; Hoogenboom *et al.*, 1998), die auch automatisiert mit einem hohen Durchsatz an Proben durchgeführt werden können (*high throughput screening*). Eine weitere effiziente Strategie zur Isolierung interagierender Phagen ist die Technik des selektiv infektiösen Phagen (SIP) (Spada *et al.*, 1997). Die SIP Technologie beruht auf einem aminoterminal deletierten Phagenadhäsins, dessen für die Adhäsion benötigte Domäne gegen eine kombinatorische scFV-Bibliothek oder Peptidbibliothek ausgetauscht ist. Diese Phagen werden in Flüssigphase mit einer Fusion der zu untersuchenden Proteindomäne und dem Aminoterminal des Phagenadhäsins inkubiert. Bei einer erfolgten Rezeptor-Ligand Interaktion wird das Phagenadhäsins komplementiert und erlaubt selektiv nur diesen Phagen die Infektion einer Wirtszelle.

Bakterielle Systeme zur Oberflächenpräsentation besitzen gegenüber der *phage display* Technologie einige Vorzüge wie die Kopplung von Genotyp und Phänotyp in einer Zelle, die Möglichkeit der Anzucht der Bakterien unter konstanten selektiven Bedingungen, die hohe Kopienzahl der Passagierdomänen auf der Zelloberfläche (Maurer *et al.*, 1997; Georgiou *et al.*, 1996) sowie die einfache Reamplifikation selektierter Bakterien aus einer Population die eine randomisierte Peptidbibliothek auf der Oberfläche ausprägt (Lu *et al.*, 1995). Eine Reihe heterologer Passagierproteine wurde bislang durch Autotransporter auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien exprimiert. Darunter waren CTB, dessen Export eingehend charakterisiert wurde (Klauser *et al.*, 1990; Klauser *et al.*, 1992; Jose *et al.*, 1996; Maurer *et al.*, 1997), Pseudoazurin von *Alcaligenes faecalis* (Shimada *et al.*, 1994) MalE und PhoA (Suzuki *et al.*, 1995), scFV-Antikörperfragmente (Maurer, 1998) und verschiedene definierte Epitope (Maurer *et al.*, 1997), eigene Daten, nicht gezeigt). Diese Passagiere wurden zwar stabil auf der Oberfläche von *E. coli*, *S. typhimurium* und *S. flexneri* präsentiert, Experimente zum Nachweis einer auf der Oberfläche lokalisierten enzymatischen Aktivität konnten bislang für keinen der Passagiere erbracht werden. Maurer (Maurer, 1998) konnte für eine von vier scFv-AIDA-I-Fusionen eine schwache Antigenbindung zeigen. Für die Fusion der AVSOD2 mit der AIDA-I Autotransporterdomäne konnte weder im CytC Reduktionstest noch durch den Test auf Aktivität durch native PAGE nach Beauchamp und Fridovich (Beauchamp und Fridovich, 1984) enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, während die Bla-AIDA-I Fusion auf der Zelloberfläche von JK321 eindeutig enzymatisch aktiv war.

Ein Vergleich der Aktivität der oberflächenexponierter Enzyme mit aufgereinigtem nicht fusioniertem Enzym ist aus verschiedenen Gründen nur bedingt möglich. Zum einen ist es nicht möglich, die genaue Kopienzahl der oberflächenexponierten Fusionsproteine zu bestimmen, die für die Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität unerlässlich ist. Alle diesbezüglichen Verfahren weisen hohe Fehlerraten auf, die zu einer ungenauen Quantifizierung führen würden. Eine Aufreinigung des Fusionsproteins und anschließende Aktivitätsmessung im Vergleich mit dem nicht fusioniertem Enzym birgt ebenfalls Fehlermöglichkeiten. Während der Aufreinigung sind hohe Verluste des aufzureinigenden Proteins zu erwarten, so daß die keine Korrelation zur ursprünglich eingesetzten Zellzahl inexakt wäre. Eine Quantifizierung des Proteins durch konventionelle Färbeverfahren ist wegen des unterschiedliche Färbeverhaltens von Proteinen nicht exakt möglich, des weiteren kann die Aktivität eines enzymatisch aktiven AIDA-I Fusionsproteins durch die Veränderung des Kontextes nach der Aufreinigung modifiziert werden. Eine grobe Abschätzung der Aktivität der oberflächenpräsentierten Bla in JK321/pLAT202 wurde dennoch durch ein Western Blot Experiment durchgeführt. Dazu wurde die Intensität des Signals von FP77 in einem Totalhomogenat von JK321/pLAT202 mit dem Signal der

Wildtyp Bla einer Bla-Lösung gleicher enzymatischer Aktivität verglichen. Dieses Experiment zeigte, daß im Ganzzellsat von JK321/pLAT202 die etwa 10 fache Menge an Bla vorhanden war. Diese vorläufige Abschätzung deutet darauf hin, daß die oberflächenständige Bla etwa um den Faktor 10 weniger aktiv ist als käufliches aufgereinigtes Enzym unter den selben experimentellen Bedingungen.

Die hohe Anzahl biologisch inaktiver Passagierdomänen deutet darauf hin, daß bezüglich des Exports biologisch aktiver Proteindomänen durch Autotransporter gewisse Restriktionen bestehen. Die Grundvoraussetzung für eine enzymatisch aktive Fusion ist allerdings ein freier Carboxyterminus des Fusionspartners. Die Analyse der in der Proteinstrukturdatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/)) abgelegten Strukturdaten der  $\beta$ -Laktamase von *E. coli* zeigte, daß der carboxyterminale Tryptophanrest an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert und dessen  $\alpha$ -Kohlenstoffatom potentiell für die Ausbildung einer Peptidbindung zugänglich ist. Für die AVSOD2 liegen keine Röntgenstrukturdaten vor. Untersuchungen von Strukturmodellen kristallisierter CuZn SODs weisen aber ebenfalls auf einen freien Carboxyterminus von CuZn SODs hin. Gründe für eine nicht nachweisbare Enzymaktivität der AVSOD2 mögen in der Charakteristik des Enzyms liegen. CuZn SODs liegen *in vivo* als Homodimere vor (Bannister *et al.*, 1987; Getzoff *et al.*, 1989) und besitzen als Monomer nur etwa 10 % der enzymatischen Aktivität eines Dimers. Ist die Dimerisierung auf der Zelloberfläche durch sterische Limitierungen nicht möglich würde die Aktivität der AVSOD2-AIDA-I Fusion stark absinken. Des weiteren benötigen CuZn SODs ein jeweils ein zweiwertiges Kupfer und Zink Ion im aktiven Zentrum. Möglicherweise ist die Integration der Kofaktoren in die Polypeptidkette auf der extrazellulären Seite der Zellen erschwert. Diese Limitierungen können zu einem starken Absinken der Aktivität unter die Nachweisgrenze der durchgeführten Experimente führen. Ähnliche Limitierungen dürften für PhoA und Pseudoazurin bestehen, die ebenfalls eine Dimerisierung beziehungsweise Kofaktoren zur Herstellung der biologischen Funktion benötigen.

Antikörper stellen ebenfalls komplexe Fusionspartner dar, da die Effizienz und Spezifität der Antigenbindung von der räumlichen Anordnung der CDRs abhängt. Wird die korrekte Faltung der Antikörper auf der Oberfläche energetisch ungünstig, ist der Verlust der Antigenbindungseigenschaften zu erwarten. Die Problematik einer inkorrekten Faltung von scFv-Antikörpern, die aus Hybridomzelllinien gewonnen wurden und in *phage display* Systemen zur Expression gebracht werden und ihre spezifische Aktivität verlieren zeigt, daß Antikörpermoleküle die Veränderung des molekularen Kontext nicht immer tolerieren (W. Wels, pers. Mitteilung). Bisher wurde die Fragestellung ob der Export funktioneller scFV-Antikörper generell inkompatibel mit Autodisplay ist nicht untersucht. Diese

Fragestellung müsste durch die Untersuchung einer kombinatorischen scFV-Antikörperbibliothek überprüft werden, die mit dem AIDA-I Autotransporter fusioniert ist. Folgende Eigenschaften des Fusionsproteins könnten die Bla-Aktivität von FP77 negativ beeinflussen: (a) Die Fixierung des Carboxyterminus der Bla führt zu einer enzymatisch weniger aktiven Tertiärstruktur des Enzyms, (b) Die Fixierung des Carboxyterminus verhindert die freie Diffusion des Enzyms und setzt so den Substratumsatz herab (c) der Mechanismus des Exports der Bla auf Zelloberfläche durch Autodisplay (s.o.).

Maurer (Maurer, 1998) diskutierte die Möglichkeit einer alternativen energetisch begünstigten Faltung des Passagiers, die durch dessen inversen Export über die Außenmembran möglich wird. Das Modell für den Mechanismus des Autodisplays (siehe Kapitel 5 und Pohlner *et al.*, 1987) sieht vor, daß das Vorläuferprotein ko- oder posttranslational durch den GSP in das Periplasma exportiert wird, wo sich die carboxyterminale Autotransporterdomäne als  $\beta$ -Faß in die Außenmembran einlagert. Dieses  $\beta$ -Faß bildet vermutlich eine Pore aus, durch die der Passagier vom Fusionspunkt mit der Linker-Domäne her, also mit dem Carboxyterminus voran, auf die Oberfläche der Zelle transloziert wird. Dies kann eine verfrühte stabile Faltung carboxyterminaler Aminosäureabschnitte des Passagiers verursachen. Die Ausbildung einer aberranten stabilen Tertiärstruktur am Carboxyterminus würde somit den für die biologische Aktivität erforderlichen Faltungszustand verhindern. Maurer (Maurer, 1998) untersuchte das den Einfluß des Linker-Anteils der Autotransporterdomäne auf die Effizienz des Exports von CTB als Passagier. Der Linker-Anteil wird als der Aminosäureabschnitt zwischen der natürlichen Prozessierungsstelle, an der das AIDA -I Adhäsion durch milde Hitzebehandlung prozessiert wird, (Suhr *et al.*, 1996) und des Beginns des  $\beta$ -Fasses definiert (Maurer *et al.*, 1997). Diese Experimente zeigten, daß die Länge des Linker-Anteils von 163 Aminosäuren um etwa 70 Aminosäuren verkürzt werden konnte ohne die Expression der CTB-AIDA-I Fusionen zu vermindern, ließen aber keine Aussage über das Faltungsverhalten des Linker-Anteils zu. Möglicherweise ist für die Ausbildung der Haarnadelschleife im Linker-Anteil, die für den Export notwendig ist, eine definierte Tertiärstruktur erforderlich. Nach erfolgtem Export nimmt der Linker dann möglicherweise eine starre Tertiärstruktur ein, die dem Verschluss der wäßrigen Pore im Zentrum des  $\beta$ -Fasses dient. Dies könnte zur Einschränkung der Freiheitsgrade des Carboxyterminus des Fusionspartners führen und so zu einem Aktivitätsverlust führen. Des weiteren beobachtete Maurer (Maurer, 1998) die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken, die oberflächenexponierte scFv-Moleküle miteinander quervernetzten. In geringem Ausmaß konnte dies auch für AVSOD2-AIDA-I Fusionen beobachtet werden. Möglicherweise wirkt sich dieser Effekt zusätzlich negativ auf die Aktivität cysteinhaltiger Passagierdomänen aus.

Die Bla von *E. coli* scheint für Autodisplay kompatible Eigenschaften zu haben und wurde ebenfalls durch das Pullulanase-System (Kornacker und Pugsley, 1990) und als Lpp-OmpA Fusion (Francisco *et al.*, 1992; Georgiou *et al.*, 1996) auf der Oberfläche von *E. coli* dargestellt. Das Pullulanase System benötigt jedoch die gleichzeitige Expression der 14 akzessorischen Proteine für den Typ-II Sekretionsweg. Des weiteren erfordert der Export der Bla-Pullulanase Fusion einen etwa 85 kDa großen Anteil der Pullulanase und bleibt nur temporär mit der Zelloberfläche assoziiert. Zusätzlich zu Bla wurden die Cex Exoglucanase von *C. fimi* (Francisco *et al.*, 1993a) sowie ein scFv-Antikörper (Chen *et al.*, 1996; Francisco *et al.*, 1993b) als Passagierdomänen von Lpp-OmpA Fusionen funktionell auf der Zelloberfläche dargestellt. In diesen Fusionen liegt der Passagier aminoterminal an die OmpA-Untereinheit gebunden vor. Da die unvollständige OmpA-Domäne aus fünf  $\beta$ -Faltblättern kein intaktes  $\beta$ -Faß ausbilden kann werden die ersten neun Aminosäuren von Lpp zur Einlagerung in die Außenmembran benötigt. Als Mechanismus der Einlagerung beziehungsweise des Exports des Passagiers auf die extrazelluläre Seite der Außenmembran werden spontane Translokationsereignisse genannt (Georgiou *et al.*, 1996). Offenbar bestimmt die Tertiärstruktur des Passagiers dessen Export im Lpp-OmpA-System, denn PhoA war im Gegensatz zu Bla, dem scFV-Antikörper und der Exoglucanase nicht translokationskompatibel (Stathopoulos *et al.*, 1996). Die spontanen Translokationsereignisse, die zur Exposition des Passagiers auf der Oberfläche durch das Lpp-OmpA-System stehen offenbar im Zusammenhang mit einer starken Unordnung der Außenmembran (Georgiou *et al.*, 1996). Georgiou *et al.* konstruierten verschiedene Lpp-OmpA-Fusionen, die sich in der Länge des OmpA-Anteils unterschieden und exprimierten diese in *E. coli*. Das Periplasma von Zellen, die diese Konstrukte exprimierten, war für Proteine wie Trypsin und einen für Peptidoglykan spezifischen Antikörper zugänglich. Unter physiologischen Bedingungen vermögen weder Trypsin noch ein Antikörper aufgrund ihrer Größe in das Periplasma zu gelangen. Des weiteren zeigten diese Zellen eine erhöhte Neigung zur Lyse in Anwesenheit von SDS oder EDTA beziehungsweise bei Kultivierungstemperaturen oberhalb 28°C. Obwohl die Triplefusionen exprimierenden Zellen im Vergleich zu Zellen, die periplasmatische Bla exprimierten, eine zum Teil deutlich erhöhte Ganzzell Penicillinase Aktivität zeigten, war durch die beobachtete Membranunordnung eine Unterscheidung zwischen periplasmatischer und oberflächenlokalisierter Bla-Aktivität nicht möglich. Im Gegensatz dazu ist die Außenmembran von FP77 exprimierenden *E. coli* JK321 eindeutig intakt. Die Behandlung physiologisch intakter JK321/pLAT202 Zellen mit Trypsin führte zur vollständigen Degradation der Bla-Untereinheit von FP77, nicht aber zur Degradation der periplasmatischen Domäne von OmpA. Des weiteren wurde die Ganzzell-Penicillinase-Aktivität der Zellen durch die Trypsinbehandlung auf Hintergrundwerte reduziert. Die

Expression der oberflächenständigen Bla in JK321/pLAT202 und der Wiltyp Bla in JK321/pLAT83 unterscheidet sich stark. Offensichtlich wird ein Fusionspartner von Autotransportern auf der Zelloberfläche vor einer Degradation durch zelluläre Proteasen geschützt. Der gleiche Effekt wurde bei translokationsinkompatiblen Fusionsproteinen von CTB mit unvollständigen  $\beta$ -Fässern im Vergleich zu r vollständigen Fusion und einer translokationsinkompatiblen PhoA-VirG Fusion beobachtet (Maurer, 1998; Suzuki *et al.*, 1995).

Des weiteren ist Autodisplay zur Herstellung kombinantorischer Peptidbibliotheken geeignet. Einzelne Zellen, die ein spezifisches Peptid exprimieren, können aus großen Populationen spezifisch über monoklonale Antikörper durch Selektion an Festphasen und FACS angereichert werden (Lattemann, C.T., Tiedemann J., Bumann, D. und Meyer T.F. nicht veröffentlichte Daten). Limitationen des Systems bestehen bezüglich stabiler Tertiärstrukturen des Passagiers im Periplasma. Die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken des Passagiers im Periplasma verhindert die Translokation über die Außenmembran. Dies kann jedoch durch Deletion der periplasmatischen DsbA Oxidoreduktase korrigiert werden (Suzuki *et al.*, 1995; Jose *et al.*, 1996). Weitere Limitationen bestehen möglicherweise in der Komplexität des Passagiers beziehungsweise in den benötigten Freiheitsgrade des Passagiers am Carboxyterminus (s.o.). Für die weitere Evaluierung von Autodisplay für biotechnologische Zwecke ist es erforderlich den Export weiterer enzymatisch aktiver Passagiere zu untersuchen um die Mechanismen des Exports besser verstehen zu können.

## **6.4 Zusammenfassung**

Enzymatisch aktive  $\beta$ -Laktamase von *E. coli* wurde durch Autodisplay, vermittelt durch die Autotransporterdomäne von AIDA-I, stabil auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert. *E. coli* JK321 Zellen, die das Bla-AIDA-I Fusionsprotein FP77 exprimierten waren resistent gegen Ampicillin und wiesen eine hohe Ganzzell-Benzylpenizillinase Aktivität auf. Die Entfernung der Bla-Untereinheit von der Oberfläche FP77 exprimierender Zellen durch Trypsin resultierte in der Reduktion der Ganzzell-Benzylpenizillinase Aktivität auf Hintergrundwerte. Des weiteren resultierte die Behandlung physiologisch intakter Zellen mit Trypsin nicht in der Spaltung der periplasmatischen Domäne des Außenmembranproteins OmpA. Dies belegt, daß die Außenmembran FP77 exprimierender Zellen intakt und die gemessene enzymatische Aktivität eindeutig auf der Zelloberfläche lokalisiert ist. Dies ist der erste Hinweis auf den Export eines funktionellen Enzyms durch Autodisplay und zeigt das Potential von Autodisplay für die Präsentation bioaktiver Moleküle auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien. Die Aktivität der Bla wurde konnte durch Wachstum der Zellen in

Anwesenheit von Substrat und durch die Kultivierungstemperatur der Zellen bei 28 °C signifikant gesteigert werden.

**Dieses Kapitel wird unter folgendem Titel veröffentlicht:**

Lattemann, C.T., Maurer, J. und Meyer T.F. Autodisplay: Functional display of active  $\beta$ -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. Manuskript in Vorbereitung.

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Bakterienstämme, Plasmidvektoren und Zellen

#### 7.1.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	[F( $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) $\Delta$ ( <i>lacZYAargF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_K, m_{K+}$ ), <i>supE44</i> , $\lambda$ <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (GIBCO BRL)]
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ::pYZ88	[(Yan <i>et al.</i> , 1997)]
<i>E. coli</i> HB101	[F <sup>-</sup> , <i>lacY1</i> , <i>recA13</i> , <i>hsdS20</i> ( $r_B, m_B$ ) <i>supE44</i> , I <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>leuB</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyI-5</i> , <i>mtl-1</i> , (Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)]
<i>E. coli</i> JK321	[ <i>dsbA</i> :: <i>kan</i> , (Jose <i>et al.</i> , 1996)]
<i>E. coli</i> UT2300	F <sup>-</sup> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>azi-6</i> , <i>lacY1</i> , <i>proC14</i> , <i>tsx-67</i> , <i>entA403</i> , <i>trpE38</i> , <i>rfbD1</i> , <i>rpsL109</i> , <i>xyI-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thi-1</i> (Elish <i>et al.</i> , 1988)]
<i>E. coli</i> UT5600	[UT2300 D( <i>ompT-fepC</i> )266 (Elish <i>et al.</i> , 1988)]
<i>H. pylori</i> 26695	[(Eaton <i>et al.</i> 1989)]
<i>S. typhimurium</i> G30	[ <i>galE</i> (Osborn <i>et al.</i> , 1964)]
<i>S. typhimurium</i> SL3261	[ <i>aroA</i> , (Hoiseth und Stocker, 1981)]
<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ84	[(Yan und Meyer, 1996)]
<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ88	[(Yan <i>et al.</i> , 1997)]
<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ112	[Z.X. Yan, nicht veröffentlicht]
<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ113	[Z.X. Yan, nicht veröffentlicht]

#### 7.1.2 Kultivierung von *E. coli* und *S. typhimurium*

*E. coli* und *S. typhimurium* wurden, soweit nicht anders angegeben, auf LB-Platten und in LB Flüssigmedium kultiviert. Dem Medium wurden zur Selektion bei Bedarf Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen beigemischt. Zur Kultivierung von *E. coli* und *S. typhimurium* unter anaeroben Bedingungen wurden die Stämme auf LB-Platten ausgestrichen und in einem Anaerobiertopf inkubiert, in dem das System Anaerocult (Beckton Dickinson) für die Entfernung des Luftsauerstoffs und die Herstellung der optimalen Kultivierungsbedingungen sorgte.

#### 7.1.3 Kultivierung von *H. pylori*

*H. pylori* wurde auf Serumplatten in einem Anaerobiertopf, der eine Atmosphäre von 85 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub> enthielt, bei 37 °C inkubiert.



### 7.1.4 Plasmidvektoren

pACYC184	(Rose, 1988)
pBluescript® KS II(-)	Stratagene
pBAD18	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pCR-Script™ Direct SK(+)	Invitrogen
pRSETa,b,c	Invitrogen
pYZ97	(Yan und Meyer, 1994)
pYZT7a,b,c	Hybrid aus pRSETa,b,c und pYZ97 (Z.X. Yan, nicht veröffentlicht)

### 7.1.5 Zelllinie

Dü142	Maus Hybridomzelllinie, deren mono klonale Antikörper spezifisch das Epitop PEYFK des Nef Proteins von HIV bindet. Kultur in RPMI 1640 supplementiert mit 10 % FCS
-------	--

## 7.2 Versuchstiere

### 7.2.1 *Meriones unguiculatus*

Die Tiere einer Auszucht- (TIT) und zweier Inzuchtlinien (TDF;BF) wurden bei 24°C und 55% relativer Luftfeuchtigkeit konventionell auf Streu gehalten (Eisenbeiss *et al.*, 1991). Als Nahrung wurde Ratten- und Mäusehaltungsdiät H1003 und Leitungswasser verabreicht. Die Lichtverhältnisse wurden dem jahreszeitlichen Wechsel der Tageslänge angepaßt.

### 7.2.2 BALB/c

Die Tiere wurden im Alter von sechs Wochen von der Firma Harlan und Winkelmann bezogen und wie unter 7.2.1 beschrieben gehalten.

### 7.2.3 *Ornithodoros moubata*

Die Zecken werden in Plastikpetrischalen auf Filterpapier Ø 90 mm (Schleicher und Schuell) bei 28°C und 85% relativer Luftfeuchtigkeit bei Dunkelheit gehalten. Für die Zucht wird eine Petrischale mit 15 bis 20 adulten Zecken besetzt, wobei der Anteil von Männchen etwa 30% betrug. Die Fütterung erfolgt im Abstand von 3 bis 4 Monaten an narkotisierten (300 µl pro 100 g Körpergewicht Rompun® : Ketanest® 1:3 (v/v)) naiven *M. unguiculatus*. Auf dem rasierten Bauch wurde ein Plexiglasring befestigt, in den die Zecken gegeben wurden. Auf diese Weise wurden die Zecken vor und nach der Blutmahlzeit an der Abwanderung gehindert. Die Nymphen wurden in einer Dichte von maximal zweihundert Tieren pro Petrischale gehalten und im Abstand von 4 bis 6 Wochen gefüttert.

## 7.3 Parasitologische Arbeitsmethoden

### 7.3.1 Der Zyklus

Die Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae* Krepkogorskaja 1933 wurde in Anlehnung an Worms et. al. (Worms et al., 1961) im natürlichen Endwirt, der mongolischen Wüstenrennmaus *Meriones unguiculatus* und der afrikanischen Lederzecke *Ornithodoros moubata* Murray 1877 als Vektor, im Labor gehalten. Die Infektion der Tiere mit *A. viteae* erfolgte durch eine Injektion von 50 bis 100 infektiösen L3 mittels einer Glaskapillare in eine Vorderextremität.

### 7.3.2 Infestation von *O. moubata*

Zur Infestation der Zecken wurden stets Mäuse mit einer Mikrofilariendichte zwischen 100 und 150 Mf/ $\mu$ l Blut verwendet. Die Infestation erfolgte analog der Fütterung, die Zecken wurden jedoch nach 20 bis 30 min abgesammelt, um die Aufnahme einer letalen Mikrofilariendosis mit dem Wirtsblut zu verhindern. Zur Infestation wurde stets das fünfte Nymphenstadium verwendet.

### 7.3.3 Bestimmung des Mikrofilariantiters im Blut patenter *M. unguiculatus*

Mittels einer heparinisierten Glaskapillare wurden einer mit Diethylether narkotisierten Maus 100  $\mu$ l Blut über den retroorbitalen Venenplexus entnommen (Tilgner und Metzke, 1964) und in eine Leukozytenmischpipette aufgezogen, in der das Blut 1:10 mit einer Mf Färbelösung (Eissigsig:10% Fuchsin in Ethanol:H<sub>2</sub>O 3:4:93) versetzt wurde. Die Probe wurde 15 min in einer Schüttelvorrichtung (Rotor-Mix; Brand) geschüttelt und ein Aliquot in einer Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal ausgezählt.

Isolierung von Mikrofilarien von *A. viteae* aus Blut von patenten *M. unguiculatus*

Über den retroorbitalen Venenplexus einer narkotisierten Maus wurden etwa 0,5 ml Blut entnommen und mit 5  $\mu$ l einer Heparinlösung (37500 U / ml) zur Vermeidung vorzeitiger Koagulation versetzt. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l einer Phythämagglutininlösung pro Tropfen Blut wurde das Blut zu Koagulation auf Glasfaserrundfilter ( $\varnothing$  27 mm, Schleicher und Schuell) aufgetropft und für 20 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde der Filter mit dem Blutkuchen nach unten auf eine abgeschnittene mit 12 ml RPMI-Medium randvoll gefüllte 60 ml Einwegspritze gelegt. Durch die ihre Motilität wandern die Mikrofilarien aus dem Blutkuchen aus und sedimentieren in einer über einen dünnen Plastikschlauch gekoppelten zweiten Spritze. Die so gewonnenen Mf wurden bei 5000 x g in einem Hb-4-Rotor (Sorvall) für 10 min bei 4°C sedimentiert, zweimal mit Saline gewaschen um Bestandteile des Wirtsbluts zu entfernen. Die Probe wurde in Saline bei -70 °C aufbewahrt. Aus 500  $\mu$ l Blut einer hochpatenten Maus (1400 Mf/ $\mu$ l Blut) konnte auf diese Weise bis zu 500 000 Mf isoliert werden.

### 7.3.4 Isolierung von adulten *A. viteae* aus *M. unguiculatus* (Mossinger and Barthold, 1987)

Die mit Äther betäubte Maus wurde ausgeblutet, rasiert und gehäutet. Die Adulten von *A. viteae* sind hauptsächlich in den Faszien der Muskulatur, dem Unterhautbindegewebe und Körperhöhlen zu finden *unguiculatus* (Mossinger und Barthold, 1987). Sie sind bei einer

Länge von etwa 10 cm makroskopisch gut sichtbar und wurden mit Hilfe einer stumpfen Pinzette aus dem Unterhautbindegewebe isoliert. Das Muskelgewebe wurde vorsichtig mit dem Präparierbesteck zerteilt und abgesucht. Die isolierten Adultwürmer wurden, getrennt nach Geschlecht, in Zellkulturplatten, deren Tröge mit RPMI 1640 Medium gefüllt waren, überführt. Adhäriertes Wirtsgewebe wurde durch zweimaliges Waschen in RPMI entfernt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Adultwürmer bei -70 °C aufbewahrt.

### 7.3.5 Isolierung von mL3 von *A. viteae* aus infestierten *O. moubata*

Zur Isolierung von mL3 von *A. viteae* aus infestierten *O. moubata* wurde eine Zecke in ein mit RPMI gefülltes Blockschälchen überführt und dort mit zwei spitzen Pinzetten zerteilt. Die metazyklischen Larven wanderten innerhalb von 2 Stunden bei Raumtemperatur aktiv aus dem Gewebe der Zecke aus. Sie wurden mit einer Mikropipette abgesammelt und um Bruchstücke der Zecken zu entfernen, durch dreimaliges Überführen in Blockschälchen mit RPMI 1640 gewaschen.

### 7.3.6 Isolierung postinfektöser Larvenstadien von *A. viteae ex vivo* aus *M. unguiculatus* (Eisenbeiss *et al.*, 1991)

Mit *A. viteae* infizierte *M. unguiculatus* wurden in terminaler Narkose über den retroorbitalen Venenplexus ausgeblutet, rasiert, gehäutet und nach dem Protokoll von Eisenbeiß *et al.* (Eisenbeiss *et al.*, 1991) präpariert. Die verschiedenen Körperteile der Tiere wurden in mit RPMI 1640 Medium gefüllte Bechergläser überführt. Die aktiv aus dem Wirtsgewebe auswandernden postinfektösen Larven wurden mit einer Mikropipette abgesammelt und durch dreimaliges Überführen in RPMI 1640 enthaltende Blockschälchen von adäriertem Wirtsgewebe befreit.

### 7.3.7 Gewinnung des Kulturüberstands *in vitro* kultivierter adulter *A. viteae*

*Ex vivo* isolierte Adultwürmer wurden in Zellkulturplatten mit 24 Trögen in RPMI 1640 bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. Das Medium wurde nach jeweils 12 h geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Die Unversehrtheit der Adultwürmer wurde optisch im Binokular überprüft.

## 7.4 Immunisierungen

### 7.4.1 Bestimmung der *in vitro* Stabilität von Expressionsvektoren

10 ml LB<sub>Amp</sub> wurde mit 10 Kolonien eines Expressionsstamms inokuliert und üN bei 28 °C schüttelnd inkubiert. 10 ml LB Medium wurde mit 10 µl dieser üN Kultur inokuliert und 12 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung des Anteils plasmidtragender Bakterien wurden Aliquots einer Verdünnungsreihe auf selektiven und nicht selektiven LB-Platten bestimmt. Dieser Vorgang wurde bis zur vierten Passage wiederholt.

## 7.4.2 Orale Immunisierung mit *Salmonella* Vakzinstämmen

Die *Salmonella* Vakzinstämmen wurden  $\bar{u}N$  (15 - 16 h) in 50 ml LB<sub>Amp</sub> unter leichtem schütteln (100 rpm) bei 28 °C angezogen. Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation für 5000 rpm in einer Heraeus Biofuge sedimentiert, in steriler Saline resuspendiert und die Konzentration der Bakteriensuspension auf  $5 \times 10^9$  cfu eingestellt. Gerbils wurden oral mit 100 oder 200  $\mu$ l, BALB/c mit 100  $\mu$ l dieser Suspension immunisiert.

## 7.4.3 Bestimmung der *in vivo* Stabilität von Expressionsvektoren

Gerbils wurden oral mit  $5 \times 10^8$  oder  $1 \times 10^9$  cfu des entsprechenden Vakzinstamms immunisiert. 7, 14 oder 21 d pi wurden die Tiere terminal anästhesiert, ausgeblutet und Leber und Milz entnommen. Die Organe wurden in ddH<sub>2</sub>O in einem Glashomogenisator homogenisiert (Leber in 5 ml, Milz in 0,5 ml) und Aliquots auf Platten mit oder ohne Antibiotikaselektion plattiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte nach einer Inkubation  $\bar{u}N$  bei 28 °C.

## 7.4.4 Immunisierung von BALB/c mit rekombinanter aufgereinigter AVSOD2

Aufgereinigte AVSOD2 wurde im Verhältnis 1:1 mit auf 45 °C erwärmter MPL + TDM Adjuvant Emulsion vermischt (Sigma) und einer BALB/c Maus intraperitoneal in einem Volumen von 200  $\mu$ l appliziert. 4 Wochen pi wurde eine Booster Immunisierung durchgeführt und das spezifische polyklonale Antiserum AS1 6 Wochen pi geerntet.

# 7.5 Molekulargenetische Arbeitsmethoden

## 7.5.1 Isolierung von genomischer DNA aus *A. viteae*

Chromosomale DNA von *A. viteae* wurde stets aus Mikrofilarien isoliert, da diese durch o.g. Verfahren leicht in großer Menge zu gewinnen sind, ohne den Endwirt zu töten. Die sedimentierten Mikrofilarien wurden mit 100  $\mu$ l Extraktionspuffer (50 mM TRIS-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 50 mM DTT pH 7,5) versetzt. Die Mf-Suspension wurde jeweils dreimal in -70°C kaltem Ethanol eingefroren und bei 60°C im Wasserbad aufgetaut, um die Kutikula für den anschließenden Proteinase-K-Verdau leichter zugänglich zu machen. Der Proteinase-K-Verdau erfolgte in einem Volumen von 1 ml Extraktionspuffer (0,05% (w/v) SDS) mit 200  $\mu$ g/ml Proteinase K bei 60°C. Nach einer Stunde wurde die Proteinase K Konzentration auf insgesamt 300  $\mu$ g/ml erhöht und der Verdau für eine weitere Stunde bei 60°C fortgesetzt. Der Ansatz wurde dreimal mit dem gleichen Volumen Phenol (äquilibriert mit TE (pH 8,0) extrahiert. Anschließend wurde die Phasentrennung durch fünfminütige Zentrifugation bei 9000 x g bei Raumtemperatur in einem HB-4-Rotor (Sorvall) herbeigeführt. Der wäßrige Überstand wurde zur Entfernung des Phenols zweimal mit einer Mischung aus Chloroform:Isoamylalkohol von 24:1 (v/v) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde in ein 15 ml Corex-Röhrchen transferiert, mit 0,2 Vol. 10 M NH<sub>4</sub>Ac versetzt und mit 2 Volumina eiskaltem Ethanol überschichtet. Das Röhrchen wurde vorsichtig geschwenkt, worauf sich an der Phasengrenze ein weißes fädiges DNA-Präzipitat bildete, das mit einer zu einem Haken ausgezogener Pasteurpipette in 100  $\mu$ l TE transferiert wurde. Die chromosomale DNA wurde 30 min bei 60°C gelöst und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Aus 100 000 Mf konnten 30  $\mu$ g DNA gewonnen werden.

### 7.5.2 Schnellpräparation von Plasmid DNA durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979)

Die gewünschte Bakterienkolonie üN bei 37°C unter Selektion des entsprechenden Antibiotikums auf einer LB-Platten angezogen. Eine Impföse der geernteten Bakterien wurde in Puffer P1 resuspendiert und nach Zugabe 200 µl Lösung P2 durch mehrmaliges vorsichtiges Invertieren des Reaktionsgefäßes lysiert. Nach der Zugabe von 150 µl Lösung P3 wurden Proteine, Zellhüllen und genomische DNA durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (15 min, g max) abgetrennt. Der wäßrige Überstand wurde mit 0,7 Volumina Isopropanol versetzt und die Plasmid-DNA sofort Durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge (15 min, g max) sedimentiert. Das DNA-Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, zwei min bei RT getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 7.5.3 Isolierung genomischer DNA von *H. pylori*

Die Bakterien von 5 Serumplatten wurden mit einem Wattestäbchen geerntet und in 3,5 ml Lösung B1 resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl einer Lysozym Stammlösung und 500 µl einer Proteinase K Stammlösung zugegeben und die Suspension bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde 4 ml Lösung B2 zugegeben und der Reaktionsansatz für 30 min bei 50 °C inkubiert. Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 5000 rpm in einer Hermle ZK 380 für 10 min abgetrennt und das Lysat auf eine mit Lösung QBT äquilibrierte Genomic Tip 100 Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 7,5 ml Lösung QC gewaschen. Die genomische DNA wurde mit 5 ml auf 50 °C vorgewärmte Lösung QF von der Säule eluiert und nach Zugabe von 0,7 Volumina Isopropanol und einer Zentrifugation von 8000 rpm in einem HB-4 Rotor für 20 min sedimentiert. Die sedimentierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, in TE aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

### 7.5.4 Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli*

50 ml einer Übernachtskultur des plasmidtragenden Bakterienstammes wurde Durch eine Zentrifugation in einem GSA-Rotor (Sorvall) bei 5000 rpm für 15 min bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 3 ml Puffer P1 resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, zur Lyse der Zellen mit 3 ml auf 30°C vorgewärmten Puffer P2 versetzt und vorsichtig gemischt. Nach einem weiteren Inkubationsschritt von 2 min bei Raumtemperatur wurde 3 ml eiskalter Puffer P3 zugegeben, wiederum vorsichtig gemischt, das Präzipitat 15 min auf Eis belassen und bei 13000 rpm und 4°C für 30 min in einem SS-34-Rotor (Sorvall) sedimentiert. Der wäßrige Überstand wurde auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte Silicagel-Säule Qiagen Tip 100 gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 10 ml Puffer QC wurde die an die Matrix gebundene Plasmid-DNA mit 4 ml Puffer QF eluiert, mit 0,7 ml Isopropanol versetzt und 30 min bei 13000 rpm und 4°C in einem HB-4-Rotor (Sorvall) sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid DNA wurde in sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 7.5.5 Isolierung von RNA aus *A. viteae*

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit sterilen, silikonisierten Gefäßen und Einwegpipettenspitzen aus Plastik durchgeführt. Bei allen Arbeitsschritten wurden Handschuhe getragen um das Einbringen exogener RNAsen zu vermeiden. Als Grundlage für diese Arbeitsvorschrift diente das von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987) erarbeitete Verfahren der sauren Phenolextraktion, das jedoch in einigen

Punkten modifiziert wurde. Probleme bei der Isolierung der RNA aus *A. viteae* bereitete zum einen die äußerst stabile Kutikula der Filarien, sowie die Tatsache, daß beim Aufschluß vor allem der sehr stoffwechselaktiven weiblichen Adultwürmern RNAsen eine rasche Degradation der RNA herbeiführten. Der Aufschluß der Würmer - in der Regel wurden 3 bis 4 Weibchen oder 300 000 bis 500 000 Mikrofilarien verwendet - erfolgte in 500 µl einer Extraktionslösung, „Lösung D“ (Chomczynski und Sacchi 1987), aus 4M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat (pH7,5), 0,5% (w/v) Sarcosyl und 100 mM β-Mercaptoethanol, in der die Würmer mehrmals in -70°C kaltem Ethanol eingefroren und bei 65°C im Wasserbad aufgetaut wurden. Durch die chaotrope Wirkung des eindringenden Guanidiniumthiocyanats werden sämtliche Proteine denaturiert d.h. ebenfalls alle RNAsen inaktiviert. Beim Aufschluß der Adultwürmer mußte zusätzlich mit einem Glaspistill gearbeitet werden. Als Präzipitationshilfe für die nachfolgenden Isopropanolfällungen der RNA und als Substrat für RNAsen wurden 2,5 µg 5 S ribosomale RNA von *E. coli* (Boehringer, Mannheim) zugegeben. Anschließend wurde das Wurmhomogenat 5 min bei 65°C inkubiert, vorsichtig mit 500 µl wassergesättigtem Phenol überschichtet und 30 sec kräftig von Hand geschüttelt. Nacheinander wurden nun 50 µl 2 M NaAc, pH 4,0 und 100 µl Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 (v/v) zugegeben, wobei nach jeder Zugabe einer Lösung nochmals kräftig geschüttelt wurde. Zur Phasentrennung wurde das Reaktionsgefäß 15 min auf Eis gestellt und anschließend 20 min bei 4°C und 10 000 x g in einem Hb-4-Rotor (Sorvall) abzentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, zur Präzipitation der RNA mit 0.8 Volumina Isopropanol versetzt und 2 h bei -20°C belassen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 10 000 x g in einem HB-4-Rotor (Sorvall) bei 4°C für 20 min wurde die sedimentierte RNA in 200 µl Lösung D aufgenommen, 200 µl Isopropanol zugegeben, wiederum für 2 h bei -20°C präzipitiert und noch einmal unter den selben Bedingungen abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, in der „speed vac“ getrocknet um dann entweder in 20 µl 0,5% w/v SDS oder ddH<sub>2</sub>O für 10 min bei 70°C gelöst zu werden.

### 7.5.6 Isolierung von RNA aus *E. coli* (Chirgwin *et al.*, 1979)

Zur RNA-Isolierung von *E. coli* wurden Bakterien einer Übernachtskultur in LB-Amp<sup>100</sup> bei 1500 g in einem HB-4-Rotor (Sorvall) sedimentiert und in 400 µl eiskaltem TES-Puffer (10 mM TRIS-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0) in einem sterilen Reaktionsgefäß resuspendiert und mit 400 µl 95°C heißem TES (1% SDS (w/v)) unter heftigem Schütteln lysiert. Nun wurden 600 µl heißes Phenol (pH 5,0; 65°C) zugegeben, 1 min heftig geschüttelt und anschließend für fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Zur Phasentrennung wurde das Gefäß für 5 min auf Eis gestellt und anschließend bei 9000 x g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen und erneut mit 600 µl heißem Phenol extrahiert. Anschließend wurde die wäßrige Phase mit 2,4 ml GTC-Lösung (100 mM TRIS-HCl, 4 M Guanidiniumthiocyanat, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, 1% (v/v) Nonidet P-40, pH 7,5) versetzt, zum Scheren der DNA mehrere Male durch eine Kanüle gepreßt (25G), danach auf ein CsCl-Kissen (10 mM TRIS-HCl 1mM EDTA, 6 M CsCl, 1% (w/v) Laurylsarcosin, pH 7,5) aufgebracht und 20 h bei XY g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde kurz mit 200 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen, in 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in gefälltem Zustand nach Zugabe von 10 µl 3 M NaAc (pH 4,9) und 250 µl Ethanol bei -70°C aufbewahrt.

### 7.5.7 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von RNA wurden 100 ng bis 1 µg RNA in einem Volumen von 11 µl ddH<sub>2</sub>O mit 100 pmol oligo-dT-Primer versetzt und zur Denaturierung von Sekundärstrukturen für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach einem Abkühlungsschritt auf Eis von 1 min wurden 8 µl zuvor bereitgestelltes Reaktionsgemisch zugegeben und gemischt.

Für den Reaktionsansatz mit M-MLV reverse Transkriptase bestand das Reaktionsgemisch aus 4 µl 5x Reaktionspuffer (GIBCO-BRL), 1 µl 10 mM dNTPs, 2 µl 250 mM DTT; 1 µl (20 Einheiten) RNase-Inhibitor (GIBCO-BRL). Für Reaktion mit AMV reverser Transkriptase wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer (USB), 1 µl 10 mM dNTPs 1µl (20 Einheiten) RNase-Inhibitor (GIBCO-BRL) und 2 µl ddH<sub>2</sub>O zugegeben. Anschließend wurde 1 µl Enzym (M-MLV-RT 200 Einheiten; AMV-RT 12,5 Einheiten) zum Reaktionsansatz hinzupipettiert und dieser für 60 min bei 37°C (M-MLV-RT) oder 42°C (AMV-RT) inkubiert. Die Reaktion wurde durch 3 minütiges Erhitzen auf 95°C beendet, wobei gleichzeitig RNA von der cDNA getrennt wurden. Die auf diese Weise erhaltene einzelsträngige cDNA wurde direkt für PCR eingesetzt.

### **7.5.8 Fällung von DNA mit Ethanol und Isopropanol**

Zur Fällung von DNA wurde der Reaktionsansatz mit 1/10 Volumen NaAc (3 M, pH 4,9) versetzt und entweder mit 2, 5 Volumina Ethanol oder 0,7 Volumina Isopropanol versetzt, durchmischt und 20 min bei 14000 x g sedimentiert. Falls nötig wurde die Effizienz der Sedimentation durch eine Ausdehnung der Zentrifugation auf 60 min gesteigert.

### **7.5.9 Analytische Elektrophorese von DNA (TBE-Gelsystem)**

Zur analytischen Auftrennung von DNA über horizontale Agarosegelelektrophorese wurden das TBE Puffersystem verwendet. Die eingewogene Agarose wurde mit TBE Puffer versetzt um eine Endkonzentration der Agarose von 0,8 bis 2,0 % (w/v) zu erreichen. Die Suspension wurde in einem Mikrowellenherd aufgeköcht und die auf 45 °C abgekühlte Agaroselösung anschließend in einen abgeklebten Schlitten des Gelkammersystems (Biorad) gegossen. Nach dem Aushärten der Agaroselösung wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit TBE Puffer überschichtet. Die an die Gelkammer angelegte Spannung betrug 5 Volt/cm Gellänge. Die aufgetrennte DNA wurde durch in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) 15 min angefärbt, 10 min in Wasser entfärbt und anschließend unter einem Transilluminator mit ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte über eine Videokamera mit angeschlossener digitaler Bildverarbeitung (Polaroid).

### **7.5.10 Präparative Elektrophorese von DNA (TAE-Gelsystem)**

Für die präparativen elektrophoretischen von DNA zur anschließenden Fragmentisolierung wurde ein TAE-Gelsystem verwendet. Die Vorgehensweise ist analog zum TBE-Gelsystem, lediglich wurde zur Anfärbung der DNA eine 0,1 % (w/v) Methylenblaulösung verwendet. Nach zweiminütiger Inkubation mit der Methylenblaulösung wurde das gefärbte Gel für zweimal zehn min in Wasser entfärbt.

### **7.5.11 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen mit GeneClean (BIO101)**

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde TAE-Puffer zur Elektrophorese verwendet. Das Agarosegelstück, das das zu isolierende DNA-Fragment enthielt, wurde gewogen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 3 Volumina NaI-Lösung (BIO101) und Erhitzen auf 50°C aufgelöst. Zu dieser Lösung wurden 1 µl Glasmilch pro µg DNA, mindestens jedoch 5 µl Glasmilch (BIO101) zugegeben und für 30 min auf Eis belassen. Die an die Glasmilch gebundene DNA Glasmilch wurde

dreimal mit 400 µl eiskaltem (-20°C) NewWash (BIO101) gewaschen. Die DNA wurde nach Zugabe von 20 bis 50 µl ddH<sub>2</sub>O bei 50°C für 5 min von der Glasmilch eluiert.

### 7.5.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

PCR wurde als in der Regel mit Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Appligene; GIBCO) durchgeführt. Für RT-PCRs mit anschließender Klonierung der PCR-Produkte wurde Vent<sup>®</sup>-Polymerase (NewEnglandBiolabs) wegen der 3'-5' Exonukleaseaktivität und der dadurch bedingten geringeren Fehlerrate vorgezogen. Die Amplifikationen wurden mit dem System GeneAmp 2400 von Perkin Elmer durchgeführt und erfolgten mit 1 U Polymerase pro 50 µl Reaktionsansatz in den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen. Der Reaktionsansatz enthielt ferner 50 pmol (+)- und (-)-Strang-Primer, sowie 50 µM dNTPs. Auf eine initiale Denaturierung von 60 s folgten in der Regel 30 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt von 10 sec bei 94°C, einem Schritt zur Primerbindung für 10 sec und einem Elongationsschritt bei 72 °C von jeweils 60 sec pro zu amplifizierenden 1000 bp. Die Bindungstemperatur wurde nach einer vereinfachten Formel berechnet, die pro komplementärem A oder T jeweils 2 °C und pro komplementärem G oder C jeweils 4 °C vorsieht.  $T_M = 2*(A/T) + 4*(G/C)$ .

### 7.5.13 Verfahren zur Erstellung amplifizierter Gesamt-cDNA von *A. viteae*

Die Amplifikation des spliced-leader-tragenden cDNA-Pools wurde mit Hilfe eines aus der Sequenz des SL1 von Nematoden abgeleiteten Oligonukleotid HA14 und einem biotinylierten oligo-dT-Primer (HA-9) durchgeführt. Zunächst wurde die cDNA nach einem zweiminütigen Denaturierungsschritt bei 94°C über 15 Zyklen amplifiziert. Die Denaturierung betrug 10 sec bei 94 °C, die Primerbindung betrug 1 min bei 58 °C und die Polymerisierung erfolgte für 3 min bei 72 °C. Zur Entfernung chromosomaler DNA und Fehlprodukten der PCR wurde ein Aufreinigungsschritt mit Steptavidin-Dynabeads-M280 (Dyna) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit 1 mg in B+W-Puffer (5 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 1 M NaCl) gewaschenen Streptavidin-Dynabeads M-280 (Dyna) in 50 µl 2x B+W-Puffer versetzt und 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Während dieser Inkubationszeit konnten sowohl alle freien biotinylierten Oligonukleotide, als auch alle PCR-Produkte an die Dynabeads binden. Die an die Dynabeads gekoppelten Oligonukleotide und PCR-Produkte wurden in durch einen Magneten sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde anschließend zweimal mit B+W-Puffer gewaschen. Zur Separation der (+) Stränge von den oligo dT tragenden (-) Strängen der amplifizierten cDNAs wurden zum sedimentierten PCR-Produkt 10 µl 0,1 N NaOH zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur denaturiert. Die (-) Stränge blieben durch den biotinylierten oligo dT Primer HA-9 an den Dynabeads gekoppelt. Die (+) Stränge der amplifizierten cDNA befanden sich im Überstand, wurden mit einer silikonisierten Pipettenspitze in ein ebenfalls silikonisiertes 0,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und mit 4 µl 0,25 M HCl und 1 µl 1 M TRIS-HCl (pH 8,0) neutralisiert. Aus dem einzelsträngigen cDNA-Primäramplifikat (insgesamt 15 µl) wurden 0,5 µl einer erneuten Amplifikation über 25 Zyklen unterzogen. Die Parameter waren: Denaturierung für 10 sec bei 94 °C, Primerbindung für 10 sec bei 58 °C und Elongation für 1 min bei 72°C.

### 7.5.14 Klonierung von PCR-Produkten

Spezifische Amplifikationsprodukte aus PCR wurden direkt mit GeneClean aufgereinigt. Zu 50 µl PCR-Ansatz wurden 150 µl NaI-Lösung, 5 µl Glasmilch (BIO101) zugegeben und wie unter oben verfahren. Von der Glasmilch eluierte PCR-Fragmente wurde entweder ohne



weitere Vorbehandlung in den Vektor pCR-Script SK+ (Stratagene) inseriert oder mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und in entsprechend vorbereitete Vektoren inseriert.

### 7.5.15 Southern Blot

Für die Analyse von Restriktionsverdau chromosomaler DNA wurden pro Gelspur 8 µg ( $\approx 8 \times 10^{-17}$  mol Genom) DNA eingesetzt, während für die Analyse von Plasmiden 50 bis 100 ng verwendet wurden. Die Proben wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Zur späteren Größenbestimmung der Fragmente wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und unter ultraviolettem Licht mit angelegtem Lineal photographiert. Zur partiellen Hydrolyse der DNA-Fragmente wurde das Gel zweimal für jeweils 10 min in 0,25 M HCl unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend auf eine zuvor mit demineralisiertem hydratisierte Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembran (Amersham) aufgelegt. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte durch Vakuum mit 0,4 M NaOH als Transfermedium. Die Transferzeit betrug in der Regel 2 h. Nach dem Transfer wurde die Membran zweimal für jeweils 5 min in 5x SSC gewaschen und entweder sofort für eine Hybridisierung eingesetzt oder feucht bei -20°C aufbewahrt.

### 7.5.16 Screening durch Kolonieblot

Für das Screening von rekombinanten Klonen wurden die Transformationsansätze in entsprechender Verdünnung auf große LB-Amp<sup>100</sup>-Platten ausplattiert und üN mindestens 18 h bei 37°C inkubiert. Vor dem Auflegen der Membran wurden die Platten 2 h in den Kühlschrank gestellt. Ein Hybond N<sup>+</sup>-Rundfilter (Amersham) wurde auf die Platte aufgebracht, dort 1 min belassen und zur späteren Orientierung von Membran und Platte an drei Stellen mit einer glühenden Kanüle eingestochen. Nach dem Abziehen wurde die Membran auf einem Kleenex getrocknet und danach 7 min auf ein mit Denaturierungslösung getränktes 3MM Filterpapier (Whatman) gelegt. Während dieses Schrittes erfolgte gleichzeitig der Aufschluß der Zellen, Denaturierung der Plasmid-DNA sowie die Kopplung der DNA an die Membran. Anschließend wurde die Membran zweimal für jeweils 3 min auf einem mit Neutralisierungslösung getränktem Whatman neutralisiert. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran auf ein Kleenex gelegt um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Nach dem letzten Neutralisierungsschritt wurden die Kolonien mit einem feuchten Kleenex von der Membran gewischt. Anschließend wurden die Membranen zweimal für jeweils 10 min bei Raumtemperatur und zweimal für 20 min in 2x SSC bei 65°C.

### 7.5.17 Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran

Die Prähybridisierung zur Absättigung der Membran erfolgte in Hybridisierungspuffer (5x SSC, 0,1% (w/v) *hybridisation buffer component* (Amersham), 0,5% (w/v) *blocking agent* (Amersham), 0,02% (w/v) SDS) für mindestens 90 min bei 42°C in einem Wasserbad. Die Membran wurde dazu in eine Tasche aus Plastikfolie eingeschweißt. Nach der für die Prähybridisierung erforderlichen Zeit wurde der Hybridisierungspuffer durch eine Lösung mit Hybridisierungspuffer ersetzt, dem das gewünschte markierte Oligonukleotid in einer Konzentration von 10 ng/ml beigemischt war. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht ebenfalls in einem Wasserbad. Die Hybridisierungslösung wurde nach der Hybridisierung aus der Tasche entfernt und konnte bei -20°C aufbewahrt werden. Für erneute Hybridisierungen mußte lediglich 10% frische markierte Sonde zugegeben werden. Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen wurde die Membran nach dem Entfernen des Hybridisierungspuffers zweimal mit Waschlösung I (5x SSC, 0,5% (w/v) SDS) 5 min bei 42°C, sowie zweimal 15 min mit Waschlösung II (1x SSC, 0,5% (w/v) SDS) bei 45°C stringent gewaschen..

### 7.5.18 Detektion der gebundenen Sonde

Für den nichtradioaktiven Nachweis von DNA-Sequenzen wurden die eingesetzten Oligonukleotide am 3'-Ende mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Für einen Markierungsansatz wurden 100 pmol Oligonukleotid mit 10 µl FITC -dUTP (Amersham), 16 µl „Cacodylate 10x buffer“ (Amersham) und 16 µl (1 Einheit/µl) Terminale Transferase in einem Volumen von 160 µl bei 37°C für 60 min inkubiert. Die Markierung wurde durch einen Dot Blot Test mit jeweils 50 und 150 pg Sonde auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Membran (Amersham) und Detektion mit dem ECL-Verfahren überprüft (s.u.). Der Nachweis der gebundenen Sonde erfolgte über ein αFITC-Meerrettichperoxidase-Konjugat (αFITCxPox). Als Substrat diente eine 1:1 Mischung aus einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und einer Luminol-Lösung (Amersham), dessen Umsatz durch Peroxidase ein luminogenes Produkt bildet, das durch Auflegen eines Röntgenfilms nachgewiesen werden kann.

Vor der Inkubation mit dem Antikörperkonjugat wurde die Membran zweimal für 10 min in TBS-I gewaschen und für 30 min M-TBS-I blockiert. Die Inkubation der Membran mit dem αFITCxPox Konjugat erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 in M<sup>-</sup>-TBS-I für 90 min. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-II (400 mM NaCl, 100 mM TRIS-HCl pH 7,4) und einmal TBS-I für jeweils 10 min entfernt. Zur Detektion wurde 0,125 ml/cm<sup>2</sup> Membran Substratgemisch für die Peroxidase auf die Membran gebracht, das ganze 1 min vorinkubiert und durch eine Frischhaltefolie abgedeckt. Anschließend wurde im Dunkeln ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und 2 h exponiert.

### 7.5.19 Elution der gebundenen Sonde

An die Membran gebundene Sonde wurde durch einen Elutionsschritt von 90 min bei 70°C in 0,1x SSC, 0,5% (w/v) SDS von der Membran eluiert. Nach der Elution wurde die Membran zweimal für jeweils 15 min mit 5x SSC gewaschen und anschließend feucht bei -20°C aufbewahrt.

### 7.5.20 Restriktionsverdau von chromosomaler und Plasmid-DNA

Chromosomale DNA wurde ün mit 4 Einheiten des gewünschten Restriktionsenzym pro µg DNA im vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer und optimaler Temperatur restringiert. Plasmid-DNA wurden eine Stunde mit 1-2 Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNA hydrolysiert. Nach dem Verdau wurden hitzeinaktivierbare Restriktionsendonukleasen für 20 min bei 85°C ansonsten durch zweimalige Phenolextraktion inaktiviert.

### 7.5.21 Zentrifugationsentsalzung (ZE) von DNA-Proben (Sambrook *et al.*, 1989)

Diese Technik wurde verwendet um bei aufeinanderfolgenden enzymatischen Modifikationen die Puffer ohne langwierige Fällungsschritte entfernen zu können. Dazu wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einer gühenden Kanüle am Boden durchstoßen. In das Reaktionsgefäß wurden 50 µl vorbehandelte silikonisierte Glasperlen (in 0,05% NaAzid, zur Konservierung) gegeben, auf die 600 µl einer Sephadex-G50-Suspension geschichtet wurde. Diese Minisäule wurde auf ein zweites 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Das ganze wurde 2 min bei 7000 rpm in einer Hermle-Zentrifuge abzentrifugiert und zweimal mit jeweils 100 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Minisäule wurde nun auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Vor dem Auftragen wurde die DNA-Probe mit 1/10 Vol. GEBS versetzt, welches

als Chromatographie-Marker diene. Das Bromphenolblau und Salze wurden während der nachfolgenden Zentrifugation in der Säulenmatrix zurückgehalten, die DNA wurde in dem unteren Reaktionsgefäß aufgefangen und konnte direkt für weitere Experimente eingesetzt werden.

### 7.5.22 Phenolextraktion

Zur Abtrennung von Proteinen wurde zu einer DNA-Lösung 1/5 Volumen einer 2M TRIS Lösung und 1 Volumen wassergesättigtes Phenol zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde kräftig durchmischt (Vortex) und anschließend eine Phasentrennung durch Zentrifugation herbeigeführt. Die wäßrige Phase wurde nochmals mit Phenol extrahiert und im Anschluß wurde die in der Lösung enthaltene DNA mit Durch eine Ethanolfällung präzipitiert.

### 7.5.23 Dephosphorylierung des linearisierten Vektors

Bei Klonierungen in denen aufgrund der Klonierungsstrategie nur mit einer Restriktionsendonuklease gearbeitet werden konnte, wurde die 5'-Phosphatgruppe des linearisierten Vektors entfernt um dessen Religation zu verhindern. Die Dephosphorylierung des Vektors wurde parallel mit der Restriktion des Plasmids durch Zugabe des von 2 Einheiten *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) in dem für das jeweilige Restriktionsenzym vorgeschriebenen Reaktionspuffer durchgeführt

### 7.5.24 Ligation

Alle Ligationen wurden mit 1U T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) ün bei 16°C unter vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt. In der Regel wurde das Verhältnis des Vektors zum zu inserierenden DNA Fragment auf 1:5 bis 1:10 eingestellt. Ligationen in den Vektor pCRScript SK+ (Stratagene) wurden nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt

### 7.5.25 Transformation von E. coli

#### 7.5.25.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Ein Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstamms wurde 1:250 verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>575nm</sub> von maximal 0,5 schüttelnd herangezogen. Nach einer von 15 min auf Eis, wurden die Bakterien bei 5000 rpm in einem GSA-Rotor (Sorvall) für 10 min bei 4°C sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 0,5 l eiskaltem 4°C ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, erneut sedimentiert und in 0,25 l eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml sterilem 10% Glycerol in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, wiederum abzentrifugiert und nun in 2 ml 10% Glycerol in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 50 µl Portionen auf 0,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

#### 7.5.25.2 Transformation durch Elektroporation

Die Transformation kompetenter Zellen erfolgte durch Elektroporation mit einem BIORAD Gene Pulser. Die bei -70°C aufbewahrten kompetenten Zellen wurden auf aufgetaut, mit 1 µl Ligationsansatz versetzt und gut durchmischt. Anschließend wurden die Zellen in eine

vorgekühlte Elektroporationsküvette übertragen. Für die Elektroporation wurde ein elektrisches Feld mit der Feldstärke von 12,5 kV/cm während eines Pulses von 4 bis 5 ms angelegt. Einstellung des Geräts: Widerstand = 200  $\Omega$ ; Kapazität = 25  $\mu$ F; Spannung = 2,5 kV) Nach dem Puls wurde möglichst schnell 1 ml SOC-Medium zu den Zellen gegeben, die Bakterien 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert um die Resistenz auszuprägen und anschließend auf Selektivmedium ausplattiert. Für die Transformation von Salmonella Stämmen wurde ein Widerstand von 400  $\Omega$  eingestellt.

### 7.5.25.3 Herstellung kompetenter Zellen nach der $RbCl_2$ -Methode (modifiziert nach Hanahan (Hanahan, 1983))

Eine Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes wurde 1:100 verdünnt und bis zu einer OD<sub>575nm</sub> von 0,5 schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis gestellt, für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C in einem GSA-Rotor (Sorvall) sedimentiert und in 8 ml RF1 resuspendiert. Nach 30 min auf Eis wurden die Zellen erneut sedimentiert, in 2 ml RF2 resuspendiert und für 15 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Zellen aliquotiert und bei -70 °C aufbewahrt.

### 7.5.25.4 Transformation durch Hitzeschock

Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, bis zu 1/10 des Gesamtvolumens Ligationsmix zugegeben und für 30 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock für 60 sec bei 42 °C unterzogen und für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Zur Ausprägung der Resistenz wurden die Zellen mit 1 ml SOC Medium versetzt und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

## 7.6 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

### 7.6.1 Herstellung von Wurmhomogenaten und -extrakten

Totalhomogenate von *A. viteae* und *O. volvulus* wurden durch Kochen der Würmer für 20 min in Probenpuffer hergestellt. Extraktion von löslichen Komponenten von *A. viteae* wurde durch einen sequentiellen Ultraschallaufschluß in TBS-I und TBS-II mit 0,1 % Triton X100 (TBS-Tx) erreicht. Das Volumen des Aufschlusses betrug in der Regel 2 ml, die Proben wurden im Anschluß vor der elektrophoretischen Analyse durch Microcon 10 Mikrokonzentratoren aufkonzentriert.

### 7.6.2 Enzymatische Abspaltung von Kohlenhydraten

Zur enzymatischen Abspaltung von Kohlenhydraten wurde mittels Endo F / Peptid N Glykosidase F von *F. meningosepticum* (Oxford Glycosystems) durchgeführt. Dazu wurde TBS-Tx Extrakt von *A. viteae* Weibchen mit 2 U Endo F / Peptid N Glykosidase F versetzt und im vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer bei 37 °C inkubiert.

### 7.6.3 Herstellung von Ganzellysaten von *E. coli* und *S. typhimurium*

Zur Herstellung von Ganzellysaten wurden üN auf Platte gezüchtete Bakterien in PBS suspendiert, die OD<sub>575nm</sub> auf 10,0 pro ml Suspension eingestellt. Die Suspension wurde 1:1 mit Probenpuffer versetzt und für 12 min gekocht. Anschließend wurden die Mureinsacculi durch eine kurze Zentrifugation sedimentiert und der Überstand für die Analyse durch SDS-PAGE verwendet.

### 7.6.4 Zellfraktionierung von *E. coli* und *S. typhimurium* (Filip *et al.*, 1973)

Die Bakterien wurden üN auf Platte angezogen. Die Bakterien wurden geerntet, in PBS resuspendiert und die OD<sub>575nm</sub> der Suspension auf 10,0 pro ml eingestellt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch zweimaliges Passagieren durch eine French Pressure Cell (...) bei 960 psi. Im Anschluß wurde die unlösliche Membranfraktion durch eine Zentrifugation bei 14000 x g in einer Hermle ZK 380 Zentrifuge bei 4 °C von der löslichen, im wesentlichen Zytoplasma und Periplasma enthaltenden, Fraktion abgetrennt. Eine weitere Fraktionierung der Membranen wurde durch die Zugabe von N-Laurylsarkosinat (1 % (v/v) Endkonzentration) zur Zellhüllfraktion und anschließende erneute Zentrifugation erreicht. Durch diesen Schritt konnte die Innenmembran von Außenmembran weitgehend getrennt werden. Bei dieser Methode war zu beobachten, daß periplasmatische Proteine häufig mit den Membranfraktionen sedimentierten.

### 7.6.5 Abspaltung exponierter Proteindomänen von der Zelloberfläche Gram-negativer Bakterien

Bakterien wurden üN auf Platte gezüchtet, in PBS resuspendiert und die OD<sub>575nm</sub> auf 10,0 pro ml eingestellt. Die Suspension wurde mit einer 100fach Stammlösung Trypsin versetzt (5 mg / ml) und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine kurze Zentrifugation (2 min Tischzentrifuge 5000 rpm) und zweimaliges Waschen in PBS beendet. Die Zellen konnten direkt für SDS-PAGE und Western Blot Analysen beziehungsweise zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität herangezogen werden.

### 7.6.6 Bestimmung der Ganzzell Benzylpenizillinase-Aktivität von *E. coli*

Die gewünschten Bakterienstämme wurden üN auf LB-Platten gezüchtet. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und auf eine OD<sub>575nm</sub> von 10,0 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 20 µl mit 50 µl einer Penizillin G Lösung (10 g / l in PBS) für 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Zentrifugation (1 min, V<sub>max</sub> Tischzentrifuge) gestoppt und die Veränderung des Penizillin G Gehalts durch spektrophotometrische Messung bei 240 nm ermittelt.

### 7.6.7 Bestimmung der Ganzzell SOD-Aktivität von *E. coli*

Die zu untersuchenden Stämme wurden üN bei 37 °C auf LB-Platten mit 0,02 M ZnCl<sub>2</sub> und 0,02 M CuSO<sub>4</sub> gezüchtet. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und in der Reaktionslösung auf eine OD<sub>550nm</sub> von 0,2 eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Xanthin-Oxidase Lösung gestartet und die Rate der Zytochrom C Reduktion im Spektrophotometer bei 550 nm bestimmt. Die Reaktion wurde so eingestellt, daß die Rate

der Zytochrom C Reduktion durch Xanthin Oxidase einer Zunahme von 0,025 OD bei 550 nm entsprach.

### 7.6.8 SOD-Zymogramm

Die Stämme wurden wie oben auf Platte gezüchtet und in PBS resuspendiert. Die OD<sub>575nm</sub> der Suspension wurde auf 20,0 eingestellt. Im Anschluß wurden die Proben in der French Pressure Cell lysiert und 20 µl der Suspension auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Dunkeln in einer für 20 min in Lösung A inkubiert, zweimal kurz in Wasser geschwenkt und anschließend 20 min im Dunkeln in Lösung B inkubiert. Nach zweimaligen kurzem Waschen wurde das Gel zur Nachweisreaktion unter eine helle Schreibtischlampe gelegt. Durch die Belichtung und das in der Reaktionslösung befindliche TEMED wurde Riboflavin unter Bildung eines Superoxid Radikals photochemisch reduziert, das wiederum das im Gel befindlichen NBT zum unlöslichen Formazan reduzierte. An Stellen im Gel an denen SODs lokalisiert waren wurde das Superoxid Radikal neutralisiert. Somit blieben diese Stellen ungefärbt und SOD Aktivität konnte als Negativfärbung nachgewiesen werden.

### 7.6.9 Präparation rekombinanter Proteine aus Einschlußkörpern

Die Expression rekombinanter Proteine wurde im Zwei-Phasen-System erreicht. Dazu wurde der Expressionsstamm DH5  $\alpha$ ::pYZ88 mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert und  $\Delta$ N bei 37 °C schüttelnd in LB<sub>Amp</sub> gezüchtet. Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm in einem GSA-Rotor (Sorvall) geerntet, mit 50 ml Lysepuffer versetzt und für 30 min unter starkem Schütteln (250 rpm) in einem Schikanekolben bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension sedimentiert (5000 rpm, GSA-Rotor), der Überstand verworfen und das bakterienhaltige Pellet erneut in 3 ml Lysepuffer aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung für 20 min auf Eis. Die unlöslichen, Einschlußkörper enthaltende Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation von 20 min bei 13000 rpm in einem HB-4 Rotor (Sorvall) von der löslichen Fraktion abgetrennt und in 10 ml NTE Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml 3M Harnstoff in NTE gelöst, um verunreinigende Proteine abzutrennen. Die Suspension wurde nochmals zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Einschlußkörper enthaltende Pellet in 2 ml 7M Harnstoff in NTE aufgenommen. Die lösliche Fraktion enthielt das rekombinante Protein. Zur weiteren Aufreinigung der 7M Harnstofffraktion wurde eine präparative PAGE durchgeführt und das rekombinante Protein aus der Gelmatrix eluiert. Dazu wurde das Gelstück, das das rekombinante Protein enthielt nach der Anfärbung durch Coomassie Brilliant Blue in 50 mM TRIS-HCl neutralisiert und das rekombinante Protein  $\Delta$ N bei RT in 10 ml 50 mM TRIS-HCl, pH8,0 0,1% SDS eluiert. Das Eluat wurde durch Zentrifugation 10 Konzentratoren eingeeengt. Das rekombinante Protein konnte direkt für ELISA oder Immunisierung eingesetzt werden.

### 7.6.10 Immunfluoreszenzfärbung von Bakterien

Über Nacht angezüchtete Bakterien wurden in PBS resuspendiert, auf ein Deckglas aufgebracht und mit einer 3,7 % Paraformaldehydlösung für 10 min fixiert. Das Deckglas wurde mit PBS gewaschen und mit 10 % FCS in PBS abgesättigt. Die Antikörperinkubation erfolgte in 10 % FCS in PBS für 2 h bei RT. Ungebundene Antikörper wurden durch jeweils 3 Waschschrte für 5 min entfernt. Gebundene Antikörper wurden durch ein Antikörperkonjugat an das ein Fluorophor gekoppelt war nachgewiesen und das Präparat nach dreimaligem Waschen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

### 7.6.11 Immunfärbung physiologisch intakter Zellen

Bakterien wurden in Platte gezüchtet, in PBS resuspendiert und mit 10 % FCS in PBS abgesättigt. Die Inkubation mit dem spezifischen Antiserum AS1 erfolgte für 1 h in einer Verdünnung von 1:100 in 10 % FCS in PBS. Die gebundenen Antikörper wurden durch ein mausspezifisches Texas Red Konjugat nachgewiesen. Nach drei Waschschritten wurden die gefärbten Zellen im Durchflußzytometer untersucht.

### 7.6.12 Trichloracetatfällung von Proteinen

Zur Konzentrierung von Proteinen einer wäßrigen Lösung wurde Trichloressigsäure (100 %) zu einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugegeben und der Reaktionsansatz für 10 min auf Eis belassen. Das Präzipitat wurde für 10 min in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm sedimentiert und anschließend dreimal mit Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Präzipitat in Probenpuffer für SDS-PAGE aufgenommen.

### 7.6.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für SDS-PAGE wurden BIORAD Minigele (6 cm Trennstrecke) oder das BRL Gelsystem (15 cm Trennstrecke) verwendet. Über einen Trenngel, dessen Polyacrylamidkonzentration zwischen 8 und 15% betrug, wurde ein Sammelgel mit einer Polyacrylamidkonzentration von 5% gegossen. Zur Herstellung der Gele wurde eine Acrylamidstammlösung mit 30 % Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese, Roth) verwendet. Die Polymerisierung der Gele wurde durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (Endkonzentration 0,05 %) und TEMED (Endkonzentration 0,1%) erreicht. Die Proben wurden in PAGE-Probenpuffer aufgenommen, für 12 min gekocht und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA (Minigel) beziehungsweise 30 mA (BRL-System).

### 7.6.14 Native PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen unter möglichst nativen Bedingungen wurde ein Gelsystem gewählt, das weder SDS noch 2-ME enthielt und nur aus einem Trenngel bestand. Die Gel- und Elektrophoresepuffer wurden entsprechend der SDS-PAGE ohne SDS hergestellt, das Trenngel bestand aus 5 % Polyacrylamid. Die Proben wurden in Probenpuffer für native PAGE aufgenommen und direkt in die Taschen des Trenngels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 V für 4 - 5 h.

### 7.6.15 SDS-PAGE im Tricingelsystem (Schägger and von Jagow, 1987)

Durch dieses dreischichtige Gelsystem können Polypeptide von 1 kDa bis hin zu 100 kDa aufgetrennt werden. Das System unterscheidet sich von konventioneller PAGE durch den Einsatz von Tricin (im Gegensatz zu Glycin) als Laufion und der Tatsache, daß es sich um eine kontinuierliche Elektrophorese handelt, sich also die Puffer von Trenn- und Sammelgel nicht unterscheiden. Die Proben werden über dem eigentlichen Trenngel (16,5% T; 6% C) ist ein sogenanntes *spacer* Gel lokalisiert (10 % T, 3 %C), das eine Vortrennung bewirkt. Die Polyacrylamidkonzentration des Sammelgels beträgt 4 %T; 3 %C wobei T die Gesamte Acrylamidkonzentration darstellt und C ein Maß für den Anteil von Bisacrylamid an T darstellt. Die Elektrophorese wurde in Minigelen durchgeführt, die angelegte Spannung betrug 30 V bis die Proben in das Trenngel eingewandert waren, danach 70 V.

*Zusammensetzung von Trenngel, „Spacergel“ und Sammelgel*

	Trenngele					
	Sammelgel	Spacergel	10% T / 3% C	16.5% T / 3% C	16.5% T 6% C	16.5% T / 6% C mit 6 M Harnst.
49,5% T / 3 % C	1 ml	6.1 ml	6.1 ml	10 ml	---	---
49.5 % T / 6% C					10 ml	10 ml
Gelpuffer	3.1 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
H2O ad	12.5 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

**7.6.16 Färbung von Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue**

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10 bis 20 min in eine Coomassie Färbelösung gelegt. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen, das Gel kurz mit Wasser gewaschen und so lange bis die Proteinbanden sichtbar wurden in Entfärbelösung entfärbt.

**7.6.17 Silberfärbung von Proteingelen (Blum *et al.*, 1987)**

Das Polyacrylamidgel wurde für 2h fixiert. Nach dreimaligem Waschen in Ethanol für jeweils 20 min wurde das Gel für 1 min in Vorbehandler inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal kurz gewässert (20 sec) und 20 min imprägniert. Nach zweimaligem kurzen Waschen (20 sec) wurden die Proteine im Entwickler sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Fixierer gestoppt.

**7.6.18 Western Blot**

Nach erfolgter Elektrophorese wurden das Gel kurz in Transferpuffer geschwenkt und auf eine zuvor für 10 sec mit Methanol aktivierte Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Immobilon-P, Millipore) gelegt, die auf zwei mit Transferpuffer getränkten 3MM Filterpapieren und einem dünnen Filterpapier plaziert war. Auf das Gel kam wiederum ein dünnes und zwei 3MM Filterpapiere zu liegen, die ebenfalls in Transferpuffer getränkt worden waren. Dieser Stapel wurde in eine Semi-dry Transfer Apparatur (BIORAD) gelegt und er Transfer mit 1 - 2 mA pro cm<sup>2</sup> des Filterpapiers für 1 - 2 h durchgeführt.

Der Nachweis der transferierten Proteine erfolgte durch Inkubation mit spezifischen Antiseren und monoklonalen Antikörpern (mAKs). Vor der Antikörperinkubation wurde die Membran mit für 30 min 10 % M-TBS abgesättigt. Die Antikörperinkubation erfolgte mit der für die Antikörper optimalen Konzentration in 10 % M-TBS (Antiseren von Gerbils) oder 5 % M-TBS (übrige Seren und mAKs). Die ungebundenen Antikörper wurden durch drei Waschstapen von jeweils 10 min mit T-TBS entfernt. Bei Gerbil Antiseren war eine weitere Inkubation mit einem für Gerbil Immunglobulin spezifischen Hasenserum (1:500) in 5 % M-TBS nötig. Die Gebundenen Antikörper wurden durch spezifische Antikörperkonjugate nachgewiesen, an die Pox oder alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt waren. Mit Pox Konjugaten nachgewiesene Proteine wurden analog zum Southern Blot mit ECL entwickelt, während die Membran zum Nachweis mit AP mit einer BCIP und NBT enthaltenden Entwicklungslösung entwickelt wurde. Spezifisch gebundenes Antikörperkonjugat wurde durch ausgefallenes Formazan auf dem Filter sichtbar. Alternativ wurden die Antikörperinkubationen in Blockpuffer mit 10 % Milchpulver und die Waschstapen mit Blockpuffer durchgeführt.



### 7.6.19 Immuno-Kolonieblot zum Nachweis rekombinanter Proteine

Zum Nachweis rekombinanter Proteine durch Immuno-Kolonieblot wurden üN gewachsene Kolonien Analog zum DNA Kolonieblot auf Nitrozellulosefilter transferiert. Denaturierung und Neutralisierung erfolgte analog zum DNA Kolonieblot. Im Anschluß wurden die Membranen in Block-Puffer gewaschen und Koloniereste mit einem Kleenex von der Membran entfernt. Der Nachweis rekombinanter Proteine mittels spezifischer Antikörper erfolgte analog zum Western Blot in Blockpuffer mit 10 % Milchpulver

### 7.6.20 Absättigen von Antiseren

Zur Absättigung von Antiseren gegen *E. coli* wurden Seren in 10 % M-TBS-I vorverdünnt. Zu dieser Lösung wurde das selbe Volumen einer Bakteriensuspension (10,0 OD<sub>575nm</sub> in TBS) gegeben, die zuvor 5 min gekocht worden war. Das Gemisch wurde 4h bei RT rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer, denaturierte Proteine und daran gebundene Antikörper durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge entfernt.

### 7.6.21 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Antigen wurde in *coating buffer* in die Tröge einer ELISA-Platte pipettiert und dort zur Bindung an die Plastikmatrix üN bei 4°C belassen. Die Tröge wurden für 30 min durch 1 % M-TBS abgesättigt. Anschließend wurden die verdünnten Antiseren in die Tröge gefüllt und konnten entweder üN oder für 4 h an das Antigen binden. Das weitere Vorgehen bis zur Entwicklung erfolgte analog zum Western Blot in 1 % M-TBS. Der Nachweis gebundener Antikörper durch die Pox-Reaktion erfolgte nach dem letzten Waschschrift durch die Zugabe einer Orthophenyldiaminlösung und einer Inkubation für 30 min bei 37 °C.

### 7.6.22 Kultur von Hybridomen

Die Zellen wurden im Wasserbad (RT) aufgetaut, in eine Zellkulturflasche mit 10 ml Kulturmedium (RPMI1640 + 15 % FCS) überführt und üN bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 48 h wurden die Zellen sedimentiert (500 rpm, Hermle ZK 380), auf 3 Zellkulturflaschen mit jeweils 15 ml Medium verteilt und 3 d inkubiert. Zur Gewinnung der monoklonalen Antikörper wurden die Zellen sedimentiert, in RPMI1640 ohne FCS aufgenommen und für 1 - 2 d kultiviert, bis eine Ansäuerung des Mediums zu beobachten war. Daraufhin wurden die Zellen sedimentiert und der Antikörper enthaltende Überstand geerntet.

## 7.7 Lösungen, Enzyme, Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

### 7.7.1 Medien für mikrobiologisches Arbeiten

LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1%; (w/v) NaCl

LB-Platten:	LB-Medium plus 0,2% (w/v) Bacto-Agar
SOB-Medium:	2% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub>
SOC- Medium:	SOB-Medium plus 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Glucose
Serumplatten:	36, g / l GC Agar autoklavieren, auf 45 °C abkühlen lassen, 10 ml Vitaminmix, Vancomycin 10 mg / l, Nystatin, 0,793 mg / l, Trimethoprim 5 mg / l

### 7.7.2 Medium für die Zellkultur

RPMI1640	synthetisches Zellkulturmedium mit L-Glutamin
FCS	Fötales Kälberserum als Zusatz zu RPMI1640 (10 % v/v)

### 7.7.3 Antibiotika und Zusätze

Ampicillin	100 mg/l LB-Medium
Chloramphenicol:	30 mg/l in LB-Medium
Gentamicin	100 mg/ml in RPMI1640
Kanamycin	50 mg/ml in LB-Medium
Nystatin:	0,793 mg / l in Serumplatten
Trimethoprim:	5 mg / l in Serumplatten
Vancomycin:	10 mg / ml in Serumplatten
Vitaminmix:	0,01 g Vitamin B12, 1 g Apennin, 0,03 g Guanin, 10 g L-Glutamin, 0,1g Cocarboxylase, 0,03 g Thiamin, 25,9 g L-Cystein, 1,1 g L-Cystin, 0,15 g L-Arginin, 0,5 g Uracil, 0,02 g Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , 0,25 g Diphosphopyridinnukleotid, 0,013 g p-Aminobenzoesäure, 100 g Dextrose, ad 1l destilliertes Wasser und sterilfiltriert

### 7.7.4 Lösungen für Agarosegelelektrophoresen

TBE-Puffer (10x):	0.89 M TRIS-Base, 0,89 M Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
TAE-Puffer (50x):	2 M TRIS-Acetat, 50 mM ECTA, pH 8,5
GEBS:	20% (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05% (w/v) Bromphenolblau 0,5% (w/v) N-Laurylsarcosin

### 7.7.5 Lösungen für SDS-PAGE

Probenpuffer (2x):	nicht reduzierend: 40 % (v/v) Glycerin, 6 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau reduzierend: wie oben plus 5 % (v/v) 2-ME
Acrylamidlösung:	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Sammelgelpuffer:	120 mM TRIS-HCl, 0,1 % (w/v) SDS, pH 6,8
Trenngelpuffer:	375mM TRIS-HCl, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,8
Elektrophoresepuffer:	25 mM TRIS, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

### 7.7.6 Lösungen für native PAGE

Probenpuffer (2x):	40 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Trenngelpuffer:	375mM TRIS-HCl, pH 8,8
Elektrophoresepuffer:	25 mM TRIS, 200 mM Glycin,

### 7.7.7 Lösungen für Tricingele

Kathoden puffer:	0,1 M TRIS; 0.1M Tricin pH 8,25, 0,1% SDS
Anodenpuffer:	0,2 M TRIS mit HCl auf pH 8,9 einstellen
Gelpuffer (10x):	3M TRIS, 0.3% SDS mit HCl auf pH 8.45 einstellen
Acrylamid Lösung 49,5% T 3 % C:	48 % Acrylamid, 1.5 % Bisacrylamid
Acrylamid Lösung 49,5% T/ 6 % C:	46.5 % Acrylamid, 3 % Bisacrylamid

### 7.7.8 Western Blot

Transferpuffer:	25 mM TRIS-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3
-----------------	---

### 7.7.9 Lösungen für die Silberfärbung

Fixierer:	50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) HAc, 0,5 ml / l Formaldehyd
Waschlösung:	50 % (v/v) Ethanol
Imprägnierer:	0,13 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Solberlösung:	2 g / l $\text{AgNO}_3$ , 0,75 ml / l Formaldehyd
Entwickler:	60 g / l $\text{NaCO}_3$ , 2,5 mg / l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,5 ml / l Formaldehyd
Stopplösung:	50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) HAc

### 7.7.10 Lösungen für die Coomassie Färbung

Fixierer:	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) HAc,
Färbelösung:	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) HAc, 0,1 % (w/v) Coomassie R250

### 7.7.11 Isolierung chromosomaler DNA von *A. viteae*

TE-Puffer:	20mM TRIS-HCl pH 8,0; 1mM EDTA
Extraktionspuffer:	50 mM TRIS-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 50 mM DTT pH 7,5

### 7.7.12 Plasmid-Schnellisolierung

Lösung P1:	50 mM TRIS-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA
Lösung P2:	200 mM Na OH; 1% (w/v) SDS
Lösung P3:	2,5 M KAc pH 4,8

### 7.7.13 Plasmid-Präparation und genomische bakterielle DNA (Qiagen)

Lösung B1:	50 mM EDTA, 50 mM TRIS-HCl, 0,5 % (v/v) Tween 20, 0,5 % (v/v) Triton X-100, pH 8,0
Lösung B2:	3 M Guanidinium-HCl, 20 % (v/v) Tween 20, pH 5,5
Lösung P1:	50 mM TRIS-HCl; 10 mM EDTA, 100 µg ml RNase A, pH 8,0
Lösung P2:	200 mM Na OH; 1% (w/v) SDS

Lösung P3:	3 M KAc pH 4,8
Lösung QBT:	50 mM MOPS/NaOH, 750 mM NaCl, 15 % (v/v) Ethanol, 0,15 % (v/v) Triton X-100, pH 7,0
Lösung QC:	50 mM MOPS/NaOH, 1 M NaCl, 15 % (v/v) Ethanol, pH 7,0
Lösung QF:	50 mM MOPS/NaOH, 1,25 M NaCl, 15 % (v/v) Ethanol, pH 8,5
RNAse A:	10 mg / ml in 10 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 15 mM NaCl, 15 min bei 100 °C, abkühlen auf RT, aufbewahren bei -20 °C.
Lysozym:	100 mg / ml in TBS (aliquotiert bei -20 °C)
Proteinase K	20 mg / ml in TBS (aliquotiert bei -20 °C)

#### 7.7.14 RNA-Isolierung (saure Phenolextraktion)

Lösung D:	4M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH7,5, 0,5% (w/v)Sarcosyl und 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
Phenol (wassergesättigt):	enthält 0,1 % Hydroxychinolin

#### 7.7.15 RNA-Isolierung aus *E. coli*

TES-Puffer:	10 mM TRIS-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0
GTC-Lösung:	100 mM TRIS-HCl, 4 M Guanidiniumthiocyanat, 2% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, 1% (v/v) Nonidet P-40, pH 7,5
CsCl-Lösung:	10 mM TRIS-HCl 1mM EDTA, 6 M CsCl, 1% (w/v) Laurylsarcosin, pH 7,5

#### 7.7.16 Kolonieblot, Immuno-Kolonieblot:

Denaturierung:	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
Neutralisierung:	1,5 ml NaCl, 0,5 M TRIS-HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA

#### 7.7.17 Southern Blot

SSC (20x):	3 M NaCl, 0,3M Natriumcitrat
Hybridisierung:	5x SSC, 0,1% (w/v) „hybridisation buffer c omponent“ (Amersham), 0,5% (w/v) „blocking agent“ (Amersham), 0,02% (w/v) SDS
Waschlösung I:	5x SSC, 0,5% (w/v) SDS
Waschlösung II:	1x SSC, 0,5% (w/v) SDS
Elution d. Sonde:	0,1x SSC, 0,5% (w/v) SDS

#### 7.7.18 Detektion von gebunden Antikörpern in Southern Blot, Western Blot und ELISA

Blockpuffer:	650mM NaCl, 0,5% Tween 20
TBS-I:	150 mM NaCl; 100 mM TRIS-HCl, pH 7,4
TBS-II:	400 mM NaCl, 100 mM TRIS-HCl pH 7,4)
M-TBS-I:	TBS-I plus Magermilchpulver „Glücksklee“
T-TBS-I	TBS-I plus 0,05 % Tween 20
OPD-Lösung:	(0,01 mg/ml OPD in 0,1 M NaAc, 12 mM Zitronensäure pH5, und 0,01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
NBT:	1 mg / ml in 0,1 M TRIS-HCl, pH9,6, bei -20 °C aufbewahren

BCIP: 5 mg / ml in Dimethylformamid, bei -20 °C aufbewahren

### 7.7.19 SOD-Zymogramm

Lösung A: 2,45 mM NBT in TBS

Lösung B: 0,028 mM Riboflavin, 28 mM TEMED in TBS

### 7.7.20 Oligonukleotide

Ein Teil Oligonukleotide wurde auf einem MilliGen 7500 DNA Synthesizer nach der Phosphoramiditmethode chemisch synthetisiert. Die Bedienung des Synthesizers wurde freundlicherweise von Frau B. Pichler-Brand und Herrn Dr. E. Fischer (Max-Planck-Institut für Biologie Tübingen, Abteilung Infektionsbiologie) durchgeführt. Die übrigen Oligonukleotide stammten von Pharmacia Biotech.

### 7.7.21 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Oligo	Spezifität	Sequenz
A2 (-)	Bla	5'-GATCAGATCTAGATTACCAATGCTTAATCAGTG-3'
A3 (-)	Bla	5'-GATCAGATCTAGACCAATGCTTAATCAGTGA-3'
EF16 (+)	pBA	5'-TGTA AACGACGGCCAGTATCACGAGGCCCTTTCGT-3'
HA-5 (-)	actin1a	5'-CTTCTCCATGTCATCCCAARTT-3'
HA-9 (-)	dT	5'-Biotin TCCCCCGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
HA-14 (+)	SL	5'-TCCCCCGGGTTTAATTACCCAAGTTTGAG-3'
HA-15 (-)	dT	5'-TCCCCCGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
HA-17 (-)	SOD	5'-GGGCTGCAGACCAGCATTACCGGTTTCA-3'
HA-18 (+)	actin1a	5'-AATTGGGATGACATGGAGAAG-3'
HA-19 (-)	actin1a	5'-CGCGC/TGCAGCCAGGATGGAACCACCAATCC-3'
JM1 (-)	AIDA-I	5'-GGAAGATCTGCCTCAGAAATGAGGGCC-3'
LAT20 (+)	SOD	5'-CATCCATATGCACACGGAACACCTCAAATGTACATTGCA CGTGAAAGC-3'
LAT21 (-)	SOD	5'-CATCAGATCTAGAGGTACCAGCATTACCGGTTTT-3'
LAT22 (-)	SOD	5'-CATCAGATCTGGTACCAATTGAATCAGCAATGCC-3'
MAT1 (+)	AVSOD1	5'-GCGCCCCGGGCATATGAGTACGAATGCGATAGCAGTGT-3'
MAT2 (+)	AVSOD2	5'-CCCCCGGGTTTAATTACCCAAGTTTGAG-3'
WS34 (-)	AIDA-I	5'-CCTTTCACCACCAGACGG-3'

### 7.7.22 Enzyme

AMV-reverse Transkriptase: USB  
 β-Laktamase: Sigma, Deisenhofen  
 Klenow-Fragment: Boehringer, Mannheim  
 Endo F / Peptid N Glykosidase F: Oxford Glycosystems, UK  
 M-MMLV-rev. Transkriptase: GIBCO/BRL, Neu-Isenburg  
 Restriktionsenzyme: Boehringer, Mannheim; New England Biolabs, USA;  
 Pharmacia, GIBCO/BRL, Stratagene, USA.  
 RNase-Inhibitor: GIBCO/BRL Neu-Isenburg  
 T4-DNA-Ligase: Boehringer, Mannheim  
 Taq-Polymerase: GIBCO/BRL; Neu-Isenburg Appligene, F; AGS Heidelberg  
 SAP: USB

Vent<sup>®</sup>-Polymerase:

New England Biolabs

### 7.7.23 Chemikalien

Agarose:	SeaKem, Rockland, USA
Ampicillin:	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau:	Serva, Heidelberg
Cholera Toxin B:	Sigma, Deisenhofen
DTT:	Sigma, Deisenhofen,
Ethidiumbromid:	Sigma, Deisenhofen
Glucose:	BRL, Neu-Isenburg
Heparin:	Sigma, Deisenhofen:
IPTG:	Serva, Heidelberg
Ketanest:	Parke-Davis, Freiburg
2-Mercaptoethanol:	Serva, Heidelberg
MPL + TDM Adjuvant:	Sigma Deisenhofen
Penizillin	Sigma, Deisenhofen
Phenol:	Fluka, Ulm
Phythämagglutinin:	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640:	GIBCO/BRL, Neu-Isenburg
Silikonlösung:	Serva, Heidelberg
Xanthin	Sigma
X-Gal:	Serva, Heidelberg
Zytochrom C	Sigma

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

### 7.7.24 Geräte:

Agarose Flachbettgelkammer:	„WideMiniSubCell“ BioRad, Cambridge, MA, USA
Brutschränke:	Heraeus, Hanau
DNA-Sequenzier 373A:	Applied Biosystems
Durchflußzytometer	FACSort, Beckton Dickinson
Elektroporationsküvetten:	BioRad, Cambridge, MA, USA
Eppendorf-Zentrifuge:	Heraeus, Hanau
Geldokumentation:	Polaroid
Genpulser (Elektroporation):	BioRad, Cambridge, MA, USA
Heizblöcke:	Grant Instruments, Cambridge, UK
Magnetrührer:	Heidolph
Mikroskope:	Zeiss, Oberkochen
PCR-Geräte GeneAmp 2400:	Perkin Elmer
Proteingelkammer, horizontal	BioRad, Cambridge, MA, USA
Proteingelkammer, horizontal I	BRL
Rechner:	Dell, USA
Schüttler:	New Brunswick, Scientific Edition, NJ, USA
Spannungsgeräte	Bachhofer, Fischer, Delta Electronica
Sorvall-Zentrifuge RC5C:	DuPont Instruments, Bad Homburg
UV-Lampen:	Benda, San Gabriel, CA, USA
UV-Stratalinker:	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Waagen:	Sartorius, Göttingen
Western Blot Aparatur (SemiDry)	BioRad, Cambridge, MA, USA

**7.7.25 Verbrauchsmaterial:**

Glasfaserrundfilter, Ø27 mm:	Schleicher & Schuell
Hämatokritkapillaren:	Hirschmann
Microcon Konzentratoren:	Millipore
Nylonmembranen	Amersham
Plastikwaren:	Greiner, Nürtingen
PVDF-Membranen	Millipore
Schwarzweißfilme:	Kodak, UK
Zellkulturplatten:	Costar

**7.7.26 Benutzte Software**

Für die Erstellung dieser Arbeit wurde folgende Software verwendet:

Microsoft Office, Aldus Freehand, Adobe Photoshop, Clone Manager, GCG Softwarepaket für Sequenzanalysen (GeneticsComputerGroup).

## 8 Bibliographie

- Abdel-Wahab, N., Kuo, Y.M., Wu, Y., Tuan, R.S., und Bianco, A.E. (1996). OvB20, an *Onchocerca volvulus*-cloned antigen selected by differential immunoscreening with vaccination serum in a cattle model of onchocerciasis. *Molecular & Biochemical Parasitology* 76, 187-199.
- Abraham, D. (1995). Vaccine development against *Onchocerca volvulus*: lessons from a mouse model. The Greene Sheets, Edna McConnell Clark Foundation, USA, Volume 3 (Abstract)
- Abraham, D., Eberhard, M.L., Lange, A.M., Yutanawiboonchai, W., Perler, F.B., Lok, und JB (1992). Identification of surrogate rodent hosts for larval *Onchocerca lienalis* and induction of protective immunity in a model system. *Journal of Parasitology* 78, 447-453.
- Abraham, D., Lange, A.M., Yutanawiboonchai, W., Trpis, M., Dickerson, J.W., Swenson, B., und Eberhard, M.L. (1993). Survival and development of larval *Onchocerca volvulus* in diffusion chambers implanted in primate and rodent hosts. *Journal of Parasitology* 79, 571-582.
- Ackerman, S.J., Kephart, G.M., Francis, H., Awadzi, K., Gleich, G.J., und Ottesen, E.A. (1990). Eosinophil degranulation. An immunologic determinant in the pathogenesis of the Mazzotti reaction in human onchocerciasis. *Journal of Immunology* 144, 3961-3969.
- Adam, R., Kaltmann, B., Rudin, W., Friedrich, T., Marti, T., und Lucius, R. (1997). Identification of chitinase as the immunodominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents. *Journal of Biological Chemistry* 271(3) 1996. 1441-1447.,
- Agterberg, M., Adriaanse, H., und Tommassen, J. (1987). Use of outer membrane protein PhoE as a carrier for the transport of a foreign antigenic determinant to the cell surface of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 59, 145-150.
- Agterberg, M., Adriaanse, H., van Bruggen, A., Karperien, M., und Tommassen, J. (1990). Outer-membrane PhoE protein of *Escherichia coli* K-12 as an exposure vector: possibilities and limitations. *Gene* 88, 37-45.
- Agterberg, M. und Tommassen, J. (1991). Outer membrane protein PhoE as a carrier for the exposure of foreign antigenic determinants at the bacterial cell surface. *Antonie van Leeuwenhoek* 59, 249-262.
- Albiez, E.J., Buttner, D.W., und Duke, B.O. (1988). Diagnosis and extirpation of nodules in human onchocerciasis. *Tropical Medicine & Parasitology* 39 Suppl 4, 331-346.
- Albrich, J.M., McCarthy, C.A., und Hurst, J.K. (1981). Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 210-214.
- Anderson, D.M. und Schneewind, O. (1997). A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* 278, 1140-1143.
- Apfel, H., Eisenbeiss, W.F., und Meyer, T.F. (1992). Changes in the surface composition after transmission of *Acanthocheilonema viteae* third stage larvae into the jird. *Molecular & Biochemical Parasitology* 52, 63-73.
- Apfel, H. und Meyer, T.F. (1990). Active release of surface proteins: a mechanism associated with the immune escape of *Acanthocheilonema viteae* microfilariae. *Molecular & Biochemical Parasitology* 43, 199-210.
- Autenrieth, I.B. und Firsching, R. (1996). Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *Journal of Medical Microbiology* 44, 285-294.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., und Rotilio, G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 22, 111-180.
- Bardwell, J.C., McGovern, K., und Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* 67, 581-589.



- Barry, M.A., Lai, W.C., und Johnston, S.A. (1995). Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 377, 632-635.
- Barthold, E. und Wenk, P. (1992). Dose-dependent recovery of adult *Acanthocheilonema viteae* (Nematoda: Filarioidea) after single and trickle inoculations in jirds. *Parasitology Research* 78, 229-234.
- Batra, S., Chatterjee, R.K., und Srivastava, V.M. (1990). Antioxidant enzymes in *Acanthocheilonema viteae* and effect of antifilarial agents. *Biochemical Pharmacology* 40, 2363-2369.
- Battistoni, A., Donnarumma, G., Greco, R., Valenti, P., und Rotilio, G. (1998). Overexpression of a hydrogen peroxide-resistant periplasmic CuZn superoxide dismutase protects *Escherichia coli* from macrophage killing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243, 804-807.
- Belyavsky, A., Vinogradova, T., und Rajewsky, K. (1989). PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells. *Nucleic Acids Research* 17, 2919-2932.
- Bennett, J.L., Williams, J.F., und Dave, V. (1988). Pharmacology of ivermectin. *Parasitology Today* 4, 226-228.
- Benov, L.T. und Fridovich, I. (1994). *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 269, 25310-25314.
- Benz, I. und Schmidt, M.A. (1989). Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection & Immunity* 57, 1506-1511.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
- Blaxter, M.L., Raghavan, N., Ghosh, I., Guiliano, D., Lu, W., Williams, S.A., Slatko, B., und Scott, A.L. (1996). Genes expressed in *Brugia malayi* infective 3rd-stage larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 77, 77-93.
- Blum, H., Beier, H., und Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Boyer, A.E., Tsang, V.C., Eberhard, M.L., Zea-Flores, G., Hightower, A., Pilcher, J.B., Zea-Flores, R., Zhou, W., und Reimer, C.B. (1991). Guatemalan human onchocerciasis. II. Evidence for IgG3 involvement in acquired immunity to *Onchocerca volvulus* and identification of possible immune-associated antigens. *Journal of Immunology* 146, 4001-4010.
- Boyer, H.W. und Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 41, 459-472.
- Brattig, N., Nietz, C., Hounkpatin, S., Lucius, R., Seeber, F., Pichlmeier, U., und Pogonka, T. (1997). Differences in cytokine responses to *Onchocerca volvulus* extract and recombinant ov33 and ovl3-1 proteins in exposed subjects with various parasitological and clinical states. *Journal of Infectious Diseases* 176, 838-842.
- Brattig, N.W., Henkle-Dührsen, K., Hounkpatin, S., Liebau, E., Kruppa, T.F., und Zipfel, P.F. (1997). Characterization of human immune responses to the cytosolic superoxide dismutase and glutathione S transferase from *Onchocerca volvulus*. *Tropical Medicine & International Health* 2, 788-798.
- Brattig, N.W., Tischendorf, F.W., Strote, G., und Medina-De la Garza, C.E. (1991). Eosinophil-larval-interaction in onchocerciasis: heterogeneity of in vitro adherence of eosinophils to infective third and fourth stage larvae and microfilariae of *Onchocerca volvulus*. *Parasite Immunology* 13, 13-22.
- Brayton, K.A., Vogel, S.W., und Allsopp, B.A. (1998). Expression library immunization to identify protective antigens from *Cowdria ruminantium*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849, 369-371.
- Britton, C., Knox, D.P., und Kennedy, M.W. (1994). Superoxide dismutase (SOD) activity of *Dictyocaulus viviparus* and its inhibition by antibody from infected and vaccinated bovine hosts. *Parasitology* 109, 257-263.

- Brown, A., Hormaeche, C.E., Demarco, d.H., Winther, M., Dougan, G., Maskell, D.J., und Stocker, B.A. (1987). An attenuated *aroA* *Salmonella typhimurium* vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned beta-galactosidase in mice. *Journal of Infectious Diseases* *155*, 86-92.
- Brunori, M. und Rotilio, G. (1984). Biochemistry of oxygen radical species. *Methods in Enzymology* *105*, 22-35.
- Bubert, A., Riebe, J., Schnitzler, N., Schonberg, A., Goebel, W., und Schubert, P. (1997). Isolation of catalase negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR. *Journal of Clinical Microbiology* *35*, 179-183.
- Buchmeier, N.A., Libby, S.J., Xu, Y., Loewen, P.C., Switala, J., Guiney, D.G., Fang, und FC (1995). DNA repair is more important than catalase for *Salmonella* virulence in mice. *Journal of Clinical Investigation* *95*, 1047-1053.
- Burchard, G.D., Büttner, D.W., und Bierther, M. (1979). Electron microscopical studies on onchocerciasis. III. The *Onchocerca* nodule. *Tropenmedizin und Parasitologie* *30*, 103-112.
- Burton, D.R. und Barbas, C.F. (1994). Human antibodies from combinatorial libraries. *Advances in Immunology* *57*, 191-280.
- Callahan, H.L., Crouch, R.K., und James, E.R. (1988). Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants. *Parasitology Today* *4*, 218-225.
- Callahan, H.L., Crouch, R.K., und James, E.R. (1990). Hydrogen peroxide is the most toxic oxygen species for *Onchocerca cervicalis* microfilariae. *Parasitology* *100 Pt 3*, 407-415.
- Callahan, H.L., Hazen-Martin, D., Crouch, R.K., und James, E.R. (1993). Immunolocalization of superoxide dismutase in *Dirofilaria immitis* adult worms. *Infection & Immunity* *61*, 1157-1163.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., und Pierce, R.J. (1992). Vaccine strategies against schistosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* *87 Suppl 4*, 19-27.
- Cesareni, G. (1992). Peptide display on filamentous phage capsids. A new powerful tool to study protein-ligand interaction. *FEBS Letters* *307*, 66-70.
- Chacon, M.R., Londono, P., Dougan, G., und Selkirk, M.E. (1996). Heterologous expression of the cuticular glutathione- peroxidase of lymphatic filariae in an attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* abrogates h-2-restriction of specific antibody-responses. *Parasite Immunology* *18*, 307-316.
- Chang, Y.C., Segal, B.H., Holland, S.M., Miller, G.F., und Kwon-Chung, K.J. (1998). Virulence of catalase deficient *Aspergillus nidulans* in p47(phox)<sup>-/-</sup> mice. Implications for fungal pathogenicity and host defense in chronic granulomatous disease. *Journal of Clinical Investigation* *101*, 1843-1850.
- Charbit, A., Boulain, J.C., Ryter, A., und Hofnung, M. (1986). Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. *EMBO Journal* *5*, 3029-3037.
- Charbit, A., Molla, A., Saurin, W., und Hofnung, M. (1988). Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of gram-negative bacteria. *Gene* *70*, 181-189.
- Chatfield, S.N., Charles, I.G., Makoff, A.J., Oxe, M.D., Dougan, G., Pickard, D., Slater, D., und Fairweather, N.F. (1992a). Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Bio/Technology* *10*, 888-892.
- Chatfield, S.N., Strahan, K., Pickard, D., Charles, I.G., Hormaeche, C.E., und Dougan (1992b). Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microbial Pathogenesis* *12*, 145-151.
- Chen, G., Cloud, J., Georgiou, G., und Iverson, B.L. (1996). A quantitative immunoassay utilizing *Escherichia coli* cells possessing surface-expressed single chain Fv molecules. *Biotechnology Progress* *12*, 572-574.
- Chen, I., Finn, T.M., Liu, Y.Q., Qi, G.M., Rappuoli, R., und Pizza, M. (1998). A recombinant live attenuated strain of *Vibrio cholerae* induces immunity against tetanus toxin and *Bordetella pertussis* tracheal colonization factor. *Infection & Immunity* *66*, 1648-1653.

- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., und Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
- Chusattayanond, W. und Denham, D.A. (1986). Attempted vaccination of jirds (*Meriones unguiculatus*) against *Brugia pahangi* with radiation attenuated infective larvae. *Journal of Helminthology* 60, 149-155.
- Collazo, C.M. und Galan, J.E. (1997). The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Molecular Microbiology* 24, 747-756.
- Comoy, E.E., Capron, A., und Thyphronitis, G. (1997). In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *International Immunology* 9, 523-531.
- Cookson, E., Blaxter, M.L., und Selkirk, M.E. (1992). Identification of the major soluble cuticular glycoprotein of lymphatic filarial nematode parasites (gp29) as a secretory homolog of glutathione peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5837-5841.
- Cookson, E., Tang, L., und Selkirk, M.E. (1993). Conservation of primary sequence of gp29, the major soluble cuticular glycoprotein, in three species of lymphatic filariae. *Molecular & Biochemical Parasitology* 58, 155-159.
- Corthésy-Theulaz, I.E., Hopkins, S., Bachmann, D., Saldinger, P.F., Porta, N., Haas, R., Yan, Z.X., Meyer, T.F., Bouzourène, H., Blum, A.L., und Kraehenbuhl, J.P. (1998). Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium phoP<sup>c</sup>* expressing urease A and B subunits. *Infection and Immunity* 66, 581-586.
- Cox, G.N. (1992). Molecular and biochemical aspects of nematode collagens. *Journal of Parasitology* 78, 1-15.
- Dalbey, R.E. und Von Heijne, G. (1992). Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family. *Trends in Biochemical Sciences* 17, 474-478.
- Daniels, D.A. und Lane, D.P. (1994). The characterisation of p53 binding phage isolated from phage peptide display libraries. *Journal of Molecular Biology* 243, 639-652.
- De Groote, M.A., Ochsner, U.A., Shiloh, M.U., Nathan, C., Mccord, J.M., Dinauer, M.C., Libby, S.J., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., und Fang, F.C. (1997). Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13997-14001.
- Denham, D.A., McGreevy, P.B., Suswillo, R.R., und Rogers, R. (1983). The resistance to re-infection of cats repeatedly inoculated with infective larvae of *Brugia pahangi*. *Parasitology* 86, 11-18.
- Devaney, E., Bancroft, A., und Egan, A. (1993). The effect of irradiation on the third stage larvae of *Brugia pahangi*. *Parasite Immunology* 15, 423-427.
- Ding, A.H., Nathan, C.F., und Stuehr, D.J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology* 141, 2407-2412.
- Dong, H., Nilsson, L., und Kurland, C.G. (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology* 177, 1497-1504.
- Doorbar, J. und Winter, G. (1994). Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *Journal of Molecular Biology* 244, 361-369.
- Duke, B.O. und Moore, P.J. (1968). The contributions of different age groups to the transmission of Onchocerciasis in a Cameroon forest village. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 62, 22-28.
- Eaton, K.A., Morgan, D.R. und Krakowska, S. (1989). *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity* 57, 1119-1125.

- Eisenbeiss, W.F., Apfel, H., und Meyer, T.F. (1991). Recovery, distribution, and development of *Acanthocheilonema viteae* third- and early fourth-stage larvae in adult jirds. *Journal of Parasitology* *77*, 580-586.
- Eisenbeiss, W.F., Apfel, H., und Meyer, T.F. (1994). Protective immunity linked with a distinct developmental stage of a filarial parasite. *Journal of Immunology* *152*, 735-742.
- Elish, M.E., Pierce, J.R., und Earhart, C.F. (1988). Biochemical analysis of spontaneous *fepA* mutants of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* *134*, 1355-1364.
- Elson, L.H., Calvopina, H.M., Paredes, W., Araujo, E., Bradley, J.E., Guderian, R.H., und Nutman, T.B. (1995). Immunity to onchocerciasis: Putative immune persons produce a Th1-like response to *Onchocerca volvulus*. *Journal of Infectious Diseases* *171*, 652-658.
- Elson, L.H., Guderian, R.H., Araujo, E., Bradley, J.E., Days, A., und Nutman, T.B. (1994). Immunity to onchocerciasis: identification of a putatively immune population in a hyperendemic area of Ecuador [see comments]. *Journal of Infectious Diseases* *169*, 588-594.
- Erttmann, K.D., Buttner, D.W., und Gallin, M.Y. (1996). Molecular-cloning, expression, and localization of e1, an onchocerca-volvulus antigen with similarity to brain ankyrin. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 1645-1650.
- Fairfield, A.S., Meshnick, S.R., und Eaton, J.W. (1983). Malaria parasites adopt host cell superoxide dismutase. *Science* *221*, 764-766.
- Farrant, J.L., Sansone, A., Canvin, J.R., Pallen, M.J., Langford, P.R., Wallis, T.S., Dougan, G., und Kroll, J.S. (1997). Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis. *Molecular Microbiology* *25*, 785-796.
- Fayolle, C., O'Callaghan, D., Martineau, P., Charbit, A., Clement, J.M., Hofnung, M., und Leclerc, C. (1994). Genetic control of antibody responses induced against an antigen delivered by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infection & Immunity* *62*, 4310-4319.
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J.L., und Earhart, C.F. (1973). Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *Journal of Bacteriology* *115*, 717-722.
- Francisco, J.A., Campbell, R., Iverson, B.L., und Georgiou, G. (1993). Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 10444-10448.
- Francisco, J.A., Earhart, C.F., und Georgiou, G. (1992). Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 2713-2717.
- Francisco, J.A., Stathopoulos, C., Warren, R.A., Kilburn, D.G., und Georgiou, G. (1993). Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Bio/Technology* *11*, 491-495.
- Frank, G.R. und Grieve, R.B. (1991). Metabolic labeling of *Dirofilaria immitis* third- and fourth-stage larvae and their excretory-secretory products. *Journal of Parasitology* *77*, 950-956.
- Freudl, R. (1989). Insertion of peptides into cell-surface-exposed areas of the *Escherichia coli* OmpA protein does not interfere with export and membrane assembly. *Gene* *82*, 229-236.
- Frey, A. und Neutra, M.R. (1997). Targeting of mucosal vaccines to Peyer's patch M cells. *Behring Institute Mitteilungen* 376-389.
- Fu, Y. und Galan, J.E. (1998). The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Molecular Microbiology* *27*, 359-368.
- Fuchs, P., Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T., und Little, M. (1991). Targeting recombinant antibodies to the surface of *Escherichia coli*: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. *Bio/Technology* *9*, 1369-1372.

- Galan, J.E. und Curtiss, R. (1989). Virulence and vaccine potential of *phoP* mutants of *Salmonella typhimurium*. *Microbial Pathogenesis* 6, 433-443.
- Galan, J.E., Nakayama, K., und Curtiss, R. (1990). Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene* 94, 29-35.
- Gallin, M., Edmonds, K., Ellner, J.J., Erttmann, K.D., White, A.T., Newland, H.S., Taylor, H.R., und Greene, B.M. (1988). Cell-mediated immune responses in human infection with *Onchocerca volvulus*. *Journal of Immunology* 140, 1999-2007.
- Gallin, M.Y., Jacobi, A.B., Buttner, D.W., Schonberger, O., Marti, T., und Erttmann, K.D. (1995). Human autoantibody to defensin: disease association with hyperreactive onchocerciasis (sowda). *Journal of Experimental Medicine* 182, 41-47.
- Gems, D. und Maizels, R.M. (1996). An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1665-1670.
- Gentschev, I., Dietrich, G., Mollenkopf, H.J., Sokolovic, Z., Hess, J., Kaufmann, S.H., und Goebel, W. (1997). The *Escherichia coli* hemolysin secretion apparatus--a versatile antigen delivery system in attenuated *Salmonella*. *Behring Institute Mitteilungen* 103-113.
- Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P.S., Nayak, A.R., Iverson, B.L., und Curtiss, R., III (1997). Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nature Biotechnology* 15, 29-34.
- Georgiou, G., Stephens, D.L., Stathopoulos, C., Poetschke, H.L., Mendenhall, J., und Earhart, C.F. (1996). Display of  $\beta$ -lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'- $\beta$ -lactamase fusions. *Protein Engineering* 9, 239-247.
- Getzoff, E.D., Tainer, J.A., Stempien, M.M., Bell, G.I., und Hallewell, R.A. (1989). Evolution of CuZn superoxide dismutase and the Greek key  $\beta$ -barrel structural motif. *Proteins* 5, 322-336.
- Gilman, R.H., Hornick, R.B., Woodard, W.E., DuPont, H.L., Snyder, M.J., Levine, M.M., und Libonati, J.P. (1977). Evaluation of a UDP-glucose-4-epimeraseless mutant of *Salmonella typhi* as a liver oral vaccine. *Journal of Infectious Diseases* 136, 717-723.
- Gomez-Duarte, O.G., Galen, J., Chatfield, S.N., Rappuoli, R., Eidels, L., und Levine, M.M. (1995). Expression of fragment c of tetanus toxin fused to a carboxyl terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine. *Vaccine* 13, 1596-1602.
- Gomez-Duarte, O.G., Lucas, B., Yan, Z.X., Panthel, K., Haas, R., und Meyer, T.F. (1998). Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. *Vaccine* 16, 460-471.
- Griffiths, L. und Cole, J.A. (1987). Lack of redox control of the anaerobically-induced *nirB*<sup>+</sup> gene of *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology* 147, 364-369.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., und Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology* 177, 4121-4130.
- Haddad, D., Liljeqvist, S., Kumar, S., Hansson, M., Stahl, S., Perlmann, H., Perlmann, P., und Berzins, K. (1995). Surface display compared to periplasmic expression of a malarial antigen in *Salmonella typhimurium* and its implications for immunogenicity. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 12, 175-186.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J.M. (1989). Free radicals in biology and medicine. In Anonymous
- Hammond, M.P. (1994). Codon usage and gene organization in *Brugia*. *Parasitology Research* 80, 173-175.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.

- Harnett, W. und Harnett, M.M. (1993). Inhibition of murine B cell proliferation and down-regulation of protein kinase C levels by a phosphorylcholine-containing filarial excretory-secretory product. *Journal of Immunology* 151, 4829-4837.
- Hartmann, S., Kyewski, B., Sonnenburg, B., und Lucius, R. (1997). A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates t-cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *European Journal of Immunology* 27, 2253-2260.
- Hayes, L.J., Conlan, J.W., Everson, J.S., Ward, M.E., und Clarke, I.N. (1991). Chlamydia trachomatis major outer membrane protein epitopes expressed as fusions with LamB in an attenuated aro A strain of *Salmonella typhimurium*; their application as potential immunogens. *Journal of General Microbiology* 137, 1557-1564.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia F., und Nataro, J.P. (1998). The great escape: Structure and function of the autotransporter proteins. *Trends in Microbiology* 6, 370-378.
- Henkle, K.J., Liebau, E., Muller, S., Bergmann, B., und Walter, R.D. (1991). Characterization and molecular cloning of a Cu/Zn superoxide dismutase from the human parasite *Onchocerca volvulus*. *Infection & Immunity* 59, 2063-2069.
- Henkle-Duhrsen, K., Liebau, E., und Walter, R.D. (1993). The *Onchocerca volvulus* mRNAs for a hsp70, a collagen-like protein and a ribosomal protein possess a 5' spliced leader sequence. *Tropical Medicine & Parasitology* 44, 337-339.
- Henkle-Dührsen, K., Warnecke, C., Brattig, N., Liebau, E., und Walter, R.D. (1994). Characterization of enzymatically active *Onchocerca volvulus* Cu/Zn superoxide dismutase expressed in *Escherichia coli*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 67, 41-47.
- Henkle-Duhrsen, K. (1997). Antigen identification and characterization. A vaccine against *O.volvulus*: what have we learned from a decade of research Meeting of the Edna McConnel Clark Foundation, Woods Hole, Massachusetts (Abstract)
- Henkle-Dührsen, K., Tuan, R.S., Wildenburg, G., Eschbach, M.L., Tawe, W., Zipfel, und Walter, R.D. (1997). Localization and functional analysis of the cytosolic and extracellular CuZn superoxide dismutases in the human parasitic nematode *Onchocerca volvulus*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 88, 187-202.
- Hess, J., Dietrich, G., Gentschev, I., Miko, D., Goebel, W., und Kaufmann, S.H.E. (1997). Protection against murine listeriosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide dismutase. *Infection and Immunity* 65, 1286-1292.
- Hobbs, M. und Mattick, J.S. (1993). Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Molecular Microbiology* 10, 233-243.
- Hohmann, E.L., Oletta, C.A., Killeen, K.P., und Miller, S.I. (1996). *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid-fever vaccine in volunteers. *Journal of Infectious Diseases* 173, 1408-1414.
- Hoiseith, S.K. und Stocker, B.A.D. (1981). Aromatic dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238-239.
- Hoogenboom, H.R. (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends In Biotechnology* 15, 62-70.
- Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J.W., Roovers, und RC (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1-20.
- Hopkins, S., Kraehenbuhl, J.P., Schodel, F., Potts, A., Peterson, D., und de Grandi, P. (1995). A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infection & Immunity* 63, 3279-3286.
- Hougard, J. M., Yaméogo, L., Sékétéli, A., Boatin, B., und Dadzie, K. Y. Twenty-two years of blackfly control in the onchocerciasis control programme in west africa. *Parasitology Today* 13(11), 425-431. 1997.

- Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* 62, 379-433.
- Igwe, E.I., Roggenkamp, A., Heesemann, J., und Rüssmann, H. (1998). Evaluation of attenuated *Yersinia enterocolitica* vaccine strains as live oral vaccine carriers in the mouse model of infection. 50. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
- James, E.R., McLean, D.C.J., und Perler, F. (1994). Molecular cloning of an *Onchocerca volvulus* extracellular Cu-Zn superoxide dismutase. *Infection & Immunity* 62, 713-716.
- Janssen, R. und Tommassen, J. (1994a). PhoE protein as a carrier for foreign epitopes. *International Reviews of Immunology* 11, 113-121.
- Janssen, R., Wauben, M., van der Zee, R., de Gast, M., und Tommassen, J. (1994b). Influence of amino acids of a carrier protein flanking an inserted T cell determinant on T cell stimulation. *International Immunology* 6, 1187-1193.
- Jarchau, T., Chakraborty, T., Garcia, F., und Goebel, W. (1994). Selection for transport competence of C-terminal polypeptides derived from *Escherichia coli* hemolysin: the shortest peptide capable of autonomous HlyB/HlyD-dependent secretion comprises the C-terminal 62 amino acids of HlyA. *Molecular & General Genetics* 245, 53-60.
- Jellis, C.L., Cradick, T.J., Rennert, P., Salinas, P., Boyd, J., Amirault, T., und Gray, G.S. (1993). Defining critical residues in the epitope for a HIV-neutralizing monoclonal antibody using phage display and peptide array technologies. *Gene* 137, 63-68.
- Jensenjarolim, E., Leitner, A., Kalchauer, H., Zurcher, A., Ganglberger, E., Bohle, B., Scheiner, O., Boltznitulescu, G., und Breiteneder, H. (1998). Peptide mimotopes displayed by phage inhibit antibody-binding to bet-v-1, the major birch pollen allergen, and induce specific igg response in mice. *FASEB Journal* 12, 1635-1642.
- Johnson, E.H., Irvine, M., Kass, P.H., Browne, J., Abdullai, M., Prince, A.M., und Lustigman, S. (1994). *Onchocerca volvulus*: in vitro cytotoxic effects of human neutrophils and serum on third-stage larvae. *Tropical Medicine & Parasitology* 45, 331-335.
- Johnson, E.H., Schynder-Candrian, S., Rajan, T.V., Nelson, F.K., Lustigman, S., und Abraham, D. (1998). Immune responses to third stage larvae of *Onchocerca volvulus* in interferon-gamma and interleukin-4 knockout mice. *Parasite Immunology* 20, 319-324.
- Jones, B.D., Ghori, N., und Falkow, S. (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *Journal of Experimental Medicine* 180, 15-23.
- Jose, J., Jahnig, F., und Meyer, T.F. (1995). Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Molecular Microbiology* 18, 378-380.
- Jose, J., Kramer, J., Klauser, T., Pohlner, J., und Meyer, T.F. (1996). Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga $\beta$  autotransporter pathway. *Gene* 178, 107-110.
- Jung, H.C., Lebeault, J.M., und Pan, J.G. (1998). Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nature Biotechnology* 16, 576-580.
- Kaper, J.B., Morris, J.G.Jr., und Levine, M.M. (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews* 8, 48-86.
- Karem, K.L., Chatfield, S., Kuklin, N., und Rouse, B.T. (1995). Differential induction of carrier antigen-specific immunity by *Salmonella typhimurium* live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of BALB/c mice. *Infection & Immunity* 63, 4557-4563.
- Karlsson, K. und Marklund, S.L. (1987). Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochemical Journal* 242, 55-59.

- Kay, B.K., Adey, N.B., He, Y.S., Manfredi, J.P., Mataragnon, A.H., und Fowlkes, D.M. (1993). An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. *Gene* 128, 59-65.
- Khan, C.M., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R.J., und Demarco de Hormaeche, R. (1994). Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the *Schistosoma mansoni* peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in a live aro-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Journal of Immunology* 153, 5634-5642.
- Khan, C.M.A., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R.J., Riveau, G., Demarco de Hormaeche, R., McNeill, H., Ali, T., Fairweather, N., Chatfield, S., Capron, A., *et al.* (1994). Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11261-11265.
- Khelef, N., Deshazer, D., Friedman, R.L., und Guiso, N. (1996). In vivo and in vitro analysis of *Bordetella pertussis* catalase and Fe superoxide dismutase mutants. *FEMS Microbiology Letters* 142, 231-235.
- Klauser, T., Pohlner, J., und Meyer, T.F. (1990). Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease  $\beta$ -domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *EMBO Journal* 9, 1991-1999.
- Klauser, T. (1991). Analyse der Protein-Transportfunktion der IgA-Protease  $\beta$ -Domäne von *Neisseria gonorrhoeae*. Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Klauser, T., Pohlner, J., und Meyer, T.F. (1992). Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* IgA $\beta$ -mediated outer membrane transport. *EMBO Journal* 11, 2327-2335.
- Knox, D.P. und Jones, D.G. (1992). A comparison of superoxide dismutase (SOD, EC:1.15.1.1) distribution in gastro-intestinal nematodes. *International Journal for Parasitology* 22, 209-214.
- Kornacker, M.G. und Pugsley, A.P. (1990). The normally periplasmic enzyme beta-lactamase is specifically and efficiently translocated through the *Escherichia coli* outer membrane when it is fused to the cell-surface enzyme pullulanase. *Molecular Microbiology* 4, 1101-1109.
- Krause, M. und Hirsh, D. (1987). A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell* 49, 753-761.
- Kroll, J.S., Langford, P.R., und Loynds, B.M. (1991). Copper-zinc superoxide dismutase of *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae*. *Journal of Bacteriology* 173, 7449-7457.
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157, 105-132.
- Lange, A.M., Yutanawiboonchai, W., Lok, J.B., Trpis, M., und Abraham, D. (1993). Induction of protective immunity against larval *Onchocerca volvulus* in a mouse model. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 49, 783-788.
- Lange, A.M., Yutanawiboonchai, W., Scott, P., und Abraham, D. (1994). IL-4- and IL-5-dependent protective immunity to *Onchocerca volvulus* infective larvae in BALB/cBYJ mice. *Journal of Immunology* 153, 205-211.
- Lattermann, C.T. (1995). Amplifikation von Gesamt-cDNA definierter Entwicklungsstadien und der cDNA zweier CuZn Superoxid Dismutasen der Filarie *Acanthocheilonema viteae* durch SL-RT-PCR. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Lebens, M. und Holmgren, J. (1994). Mucosal vaccines based on the use of cholera toxin B subunit as immunogen and antigen carrier. In *Recombinant vectors in vaccine development*. F. Brown, ed. (Basel: Karger), pp. 215-227.
- Lener, D., Benarous, R., und Calogero, R.A. (1995). Use of a constrain phage displayed-peptide library for the isolation of peptides binding to HIV-1 nucleocapsid protein (NCp7). *FEBS Letters* 361, 85-88.



- Li, B.W., Chandrashekar, R., Alvarez, R.M., Liftis, F., und Weil, G.J. (1991). Identification of paramyosin as a potential protective antigen against *Brugia malayi* infection in jirds. *Molecular & Biochemical Parasitology* 49, 315-323.
- Liebau, E., Wildenburg, G., Walter, R.D., und Henkle-Dührsen, K. (1994). A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus*. *Infection & Immunity* 62, 4762-4767.
- Liebau, E., Wildenburg, G., Brophy, P.M., Walter, R.D., und Henkle-Dührsen, K. (1996). Biochemical analysis, gene structure und localization of the 24 kda glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80, 27-39.
- Lok, J.B. und Abraham, D. (1992). Animal models for the study of immunity in human filariasis. *Journal of Parasitology* 8, 168-171.
- Londono, L.P., Chatfield, S., Tindle, R.W., Herd, K., Gao, X.M., Frazer, I. und Dougan, G. (1996). Immunisation of mice using *Salmonella typhimurium* expressing human papillomavirus type 16 E7 epitopes inserted to hepatitis B virus core antigen. *Vaccine* 14, 545-552.
- Loveless, B.J. und Saier, M.H., Jr. (1997). A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Molecular Membrane Biology* 14, 113-123.
- Lu, W.H., Egerton, G.L., Bianco, A.E., und Williams, S.A. (1998). Thioredoxin peroxidase from *Onchocerca volvulus* - a major hydrogen-peroxide detoxifying enzyme in filarial parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* 91, 221-235.
- Lu, Z., Murray, K.S., Van Cleave, V., Lavallie, E.R., Stahl, M.L., und McCoy, J.M. (1995). Expression of thioredoxin random peptide libraries on the *Escherichia coli* cell surface as functional fusions to flagellin: A system designed for exploring protein-protein interactions. *Bio-Technology* 13, 366-372.
- Lucius, R. (1995). Screening of recombinant filarial antigens in animal models: How can we shape protective antigens? The Greene Sheets, Edna McConnell Clark Foundation, USA, Volume 3
- Lucius, R., Ruppel, A., und Diesfeld, H.J. (1986). *Dipetalonema viteae*: Resistance in *Meriones unguiculatus* with multiple infections of stage 3 larvae. *Experimental Parasitology* 62, 237-246.
- Lucius, R., Textor, G., Kern, A., und Kirsten, C. (1991). *Acanthocheilonema viteae*: Vaccination of jirds with irradiation attenuated stage 3 larvae and with exported larval antigens. *Experimental Parasitology* 73, 184-196.
- Lustigman, S., Brotman, B., Huima, T., und Prince, A.M. (1991). Characterization of an *Onchocerca volvulus* cDNA clone encoding a genus specific antigen present in infective larvae and adult worms. *Molecular & Biochemical Parasitology* 45, 65-75.
- Mackenzie, C.D., Williams, J.F., Guderian, R.H., und O'Day, J. (1987). Clinical responses in human onchocerciasis: parasitological and immunological implications. *Ciba Foundation Symposium* 127, 46-72.
- Maizels, R.M., Philipp, M., Dasgupta, A., und Partoni, F. (1984). Human serum albumin is a major component on the surface of microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *Parasite Immunology* 6, 185-190.
- Maizels, R.M., Blaxter, M.L., und Selkirk, M.E. (1993a). Forms and functions of nematode surfaces. *Experimental Parasitology* 77, 380-384.
- Maizels, R.M., Bundy, D.A., Selkirk, M.E., Smith, D.F., und Anderson, R.M. (1993b). Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365, 797-805.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M.K., Warholm, M., und Jornvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 7202-7206.
- Manoutcharian, K., Terrazas, L.I., Gevorkian, G., und Govezensky, T. (1998). Protection against murine cysticercosis using cDNA expression library immunization. *Immunology Letters* 62, 131-136.

- Maroney, P.A., Denker, J.A., Darzynkiewicz, E., Laneve, R., und Nilsen, T.W. (1995). Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are trans-spliced: a role for spliced leader addition in translational efficiency. *Rna-A Publication of the Rna Society* 1, 714-723.
- Marshall, R.D. (1972). Glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 41, 673-702.
- Martin, S.A.M., Thompson, F.J., und Devaney, E. (1995). The construction of spliced leader cDNA libraries from the filarial nematode *Brugia pahangi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 75, 129-129.
- Martin, S.A.M., Hunter, S.J., Thompson, F.J., und Devaney, E. (1996). Stage-specific gene-expression in the post-infective I3 of the filarial nematode, *Brugia pahangi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 79, 109-112.
- Maskell, D.J., Sweeney, K.J., O'Callaghan, D., Hormaeche, C.E., Liew, F.Y., und Dougan (1987). *Salmonella typhimurium aroA* mutants as carriers of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit to the murine secretory and systemic immune systems. *Microbial Pathogenesis* 2, 211-221.
- Matzen, A. (1994). Molekulare Charakterisierung einer Häutungskomponente der postinfektiösen Larve von *Acanthocheilonema viteae* (Nematoda: Filarioidea). Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen pp1
- Maurer, J., Jose, J., und Meyer, T.F. (1997). Autodisplay: One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 179, 794-804.
- Maurer, J. (1998). Typ IV Sekretion: Charakterisierung des Proteinexports durch den Autotransporter AIDA-I in *E. coli*. Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- McCarvil, J., McKenna, A.J., Grief, C., Hoy, C.S., Sesardic, D., Maiden, M.C., und Feavers, I.M. (1993). Expression of meningococcal epitopes in LamB of *Escherichia coli* and the stimulation of serosubtype-specific antibody responses. *Molecular Microbiology* 10, 203-213.
- McConnell, S.J., Kendall, M.L., Reilly, T.M., und Hoess, R.H. (1994). Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. *Gene* 151, 115-118.
- Mccord, J.M. und Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.
- McEwen, J., Levi, R., Horwitz, R.J., und Arnon, R. (1992). Synthetic recombinant vaccine expressing influenza haemagglutinin epitope in *Salmonella* flagellin leads to partial protection in mice. *Vaccine* 10, 405-411.
- McGregor, D. (1996). Selection of proteins and peptides from libraries displayed on filamentous bacteriophage. *Molecular Biotechnology* 6, 155-162.
- Miller, S.I., Kukral, A.M., und Mekalanos, J.J. (1989). A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5054-5058.
- Miller, S.I., Loomis, W.P., Alpuche-Aranda, C., Behlau, I., und Hohmann, E. (1993). The PhoP virulence regulon and live oral *Salmonella* vaccines. *Vaccine* 11, 122-125.
- Molyneux, D. H. und Davies, J. B. Onchocerciasis control: moving towards the millennium. *Parasitology Today* 13(11), 418-425. 1997.
- Mossinger, J. und Barthold, E. (1987). Fecundity and localization of *Dipetalonema viteae* (Nematoda: Filarioidea) in the jird *Meriones unguiculatus*. *Parasitology Research* 74, 84-87.
- Motti, C., Nuzzo, M., Meola, A., Galfre, G., Felici, F., Cortese, R., Nicosia, A., und Monaci, P. (1994). Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene* 146, 191-198.
- Moustafa Hassan H. und Fridovich, I. (1977). Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Escherichia coli*: glucose effect. *Journal of Bacteriology* 132, 505-510.
- Murdoch, M.E. (1992). The skin and the immune response in onchocerciasis. *Tropical Doctor* 22 Suppl 1, 44-55.

- Newton, S.M., Jacob, C.O., und Stocker, B.A. (1989). Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science* 244, 70-72.
- Newton, S.M., Klebba, P.E., Hofnung, M., und Charbit, A. (1995). Studies of the anaerobically induced promoter *pnirB* and the improved expression of bacterial antigens. *Research in Microbiology* 146, 193-202.
- Newton, S.M.C., Joys, T.M., Anderson, S.A., Kennedy, R.C., Hovi, M.E., und Stocker, B.A. (1995). Expression and immunogenicity of an 18-residue epitope of HIV1 gp41 inserted in the flagellar protein of a *Salmonella* live vaccine. *Research in Microbiology* 146, 203-216.
- Nilsen, T.W. (1993). Trans-splicing of nematode premessenger RNA.. *Annual Review of Microbiology* 47, 413-440.
- Nilsen, T.W. (1995). trans-splicing: an update. *Molecular & Biochemical Parasitology* 73, 1-6.
- Nogami, S., Hayashi, Y., Tanaka, M., Korenaga, M., Tada, I., und Tanaka, H. (1986). Antigenic similarity of *Onchocerca volvulus* to other helminths examined by monoclonal antibodies against *O. volvulus*. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 56, 177-183.
- Nutman, T.B., Steel, C., Ward, D.J., Zea-Flores, G., und Ottesen, E.A. (1991). Immunity to onchocerciasis: recognition of larval antigens by humans putatively immune to *Onchocerca volvulus* infection. *Journal of Infectious Diseases* 163, 1128-1133.
- Osborn, M. J., Rosen, S. M., Rothfield, L., Zeleznick, L. D., und Horecker, B. L. Lipopolysaccharide of the Gram-negative cell wall. *Science* 145, 783-789. 1964.
- Ottesen, E.A. (1995). Immune responsiveness and the pathogenesis of human onchocerciasis. *Journal of Infectious Diseases* 171, 659-671.
- Ou, X., Tang, L., McCrossan, M., Henkle-Dührsen, K., und Selkirk, M.E. (1995a). *Brugia malayi*: localisation and differential expression of extracellular and cytoplasmic CuZn superoxide dismutases in adults and microfilariae. *Experimental Parasitology* 80, 515-529.
- Ou, X., Thomas, G.R., Chacon, M.R., Tang, L., und Selkirk, M.E. (1995b). *Brugia malayi*: differential susceptibility to and metabolism of hydrogen peroxide in adults and microfilariae. *Experimental Parasitology* 80, 530-540.
- Oyston, P.C., Williamson, E.D., Leary, S.E., Eley, S.M., Griffin, K.F., und Titball, R.W. (1995). Immunization with live recombinant *Salmonella typhimurium aroA* producing F1 antigen protects against plague. *Infection & Immunity* 63, 563-568.
- Oyston, P.C., Russell, P., Williamson, E.D., und Titball, R.W. (1996). An *aroA* mutant of *Yersinia pestis* is attenuated in guinea-pigs, but virulent in mice. *Microbiology* 142, 1847-1853.
- Pastrana, D.V., Raghavan, N., Fitzgerald, P., Eisinger, S.W., Metz, C., Bucala, R., Schleimer, R.P., Bickel, C., und Scott, A.L. (1998). Filarial nematode parasites secrete a homolog of the human cytokine macrophage-migration inhibitory factor. *Infection and Immunity* 66, 5955-5963.
- Petrone, W.F., English, D.K., Wong, K., und Mccord, J.M. (1980). Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 1159-1163.
- Pfeifer, J.D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findlay, K., Normark, S.J., und Harding, C.V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359-362.
- Philipp, M., Worms, M.J., McLaren, D.J., Ogilvie, B.M., Parkhouse, R.M., und Taylor, P.M. (1984). Surface proteins of a filarial nematode: a major soluble antigen and a host component on the cuticle of *Litomosoides carinii*. *Parasite Immunology* 6, 63-82.
- Plaisier, A.P., van Oortmarssen, G.J., Remme, J., und Habbema, J.D. (1991). The reproductive lifespan of *Onchocerca volvulus* in West African savanna. *Acta Tropica* 48, 271-284.

- Plier, D.A., Awadzi, K., und Freedman, D.O. (1996). Immunoregulation in onchocerciasis: Persons with ocular inflammatory disease produce a Th2-like response to *Onchocerca volvulus* antigen. *Journal of Infectious Diseases* 174, 380-386.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., und Meyer, T.F. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325, 458-462.
- Poirier, T.P., Kehoe, M.A., und Beachey, E.H. (1988). Protective immunity evoked by oral administration of attenuated *aroA* *Salmonella typhimurium* expressing cloned streptococcal M protein. *Journal of Experimental Medicine* 168, 25-32.
- Prichard, R. (1994). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 54, 259-268.
- Pugsley, A.P., Francetic, O., Hardie, K., Possot, O.M., Sauvonnet, N., und Seydel, A. (1997). Pullulanase: model protein substrate for the general secretory pathway of gram-negative bacteria. *Folia Microbiologica* 42, 184-192.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., und Freeman, B.A. (1991a). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 288, 481-487.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., und Freeman, B.A. (1991b). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 266, 4244-4250.
- Rickles, R.J., Botfield, M.C., Weng, Z., Taylor, J.A., Green, O.M., Brugge, J.S., und Zoller, M.J. (1994). Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *EMBO Journal* 13, 5598-5604.
- Roberts, M., Li, J.L., Bacon, A., und Chatfield, S. (1998). Oral vaccination against tetanus: comparison of the immunogenicities of *Salmonella* strains expressing fragment-C from the *nirB* and *htrA* promoters. *Infection and Immunity* 66, 3080-3087.
- Roggenkamp, A., Bittner, T., Leitritz, L., Sing, A., und Heesemann, J. (1997). Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O8. *Infection & Immunity* 65, 4705-4710.
- Rokeach, L.A., Zimmerman, P.A., und Unnasch, T.R. (1994). Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infection & Immunity* 62, 3696-3704.
- Rose, R.E. (1988). The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Research* 16, 355
- Rosqvist, R., Magnusson, K.E., und Wolf-Watz, H. (1994). Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO Journal* 13, 964-972.
- Rougeon, F. und Mach, B. (1976). Stepwise biosynthesis in vitro of globin genes from globin mRNA by DNA polymerase of avian myeloblastosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 3418-3422.
- Ruppert, A., Arnold, N., und Hobom, G. (1994). OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production, cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 12, 492-498.
- Rüssmann, H., Shams, H., Poblete, F., Fu, Y.X., Galan, J.E., und Donis, R.O. (1998). Delivery of epitopes by the salmonella type-iii secretion system for vaccine development. *Science* 281, 565-568.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakaguchi, M. (1997). Eukaryotic protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 595-601.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. (Cold Spring Harbour Laboratory Press).

- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- Schesser, K., Frithz-Lindsten, E., und Wolf-Watz, H. (1996). Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *Journal of Bacteriology* 178, 7227-7233.
- Schlor, S., Schmidt, A., Maier, E., Benz, R., Goebel, W., und Gentschev, I. (1997). In vivo and in vitro studies on interactions between the components of the hemolysin (HlyA) secretion machinery of *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics* 256, 306-319.
- Schmitt, W. und Haas, R. (1994). Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Molecular Microbiology* 12, 307-319.
- Selkirk, M.E., Smith, V.P., Thomas, G.R., und Gounaris, K. (1998). Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. *International Journal for Parasitology* 28, 1315-1332.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C., und Holden, D.W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2593-2597.
- Shimada, K., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., und Beppu, T. (1994). Extracellular transport of pseudoazurin of *Alcaligenes faecalis* in *Escherichia coli* using the COOH-terminal domain of *Serratia marcescens* serine protease. *Journal of Biochemistry* 116, 327-334.
- Simurda, M.C., van Keulen, H., Rekosh, D.M., und LoVerde, P.T. (1988). Schistosoma mansoni: identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Experimental Parasitology* 67, 73-84.
- Smith, V.P., Selkirk, M.E., und Gounaris, K. (1998). *Brugia malayi* - resistance of cuticular lipids to oxidant-induced damage and detection of  $\alpha$ -tocopherol in the neutral lipid fraction. *Experimental Parasitology* 88, 103-110.
- Soboslay, P.T., Lueder, C.G.K., Hoffmann, W.H., Michaelis, I., Helling, G., Heuschkel, C., Dreweck, C.M., Blanke, C.H., Pritze, S., et al. (1994). Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis; activation of parasite-specific Th1-type responses with subclinical *Onchocerca volvulus* infection. *Clinical & Experimental Immunology* 96, 238-244.
- Soboslay, P.T., Geiger, S.M., Weiss, N., Banla, M., Luder, C.G.K., Dreweck, C.M., Batchassi, E., Boatin, B.A., Stadler, A., und Schulzkey, H. (1997). The diverse expression of immunity in humans at distinct states of *Onchocerca volvulus* infection. *Immunology* 90, 592-599.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I., und Cornelis, G.R. (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the cyaA gene fusion approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11998-12002.
- Spada, S., Krebber, C., und Pluckthun, A. (1997). Selectively infective phages (SIP). *Biological Chemistry* 378, 445-456.
- Stamler, J.S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931-936.
- Stathopoulos, C., Georgiou, G., und Earhart, C.F. (1996). Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp'OmpA(46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer membrane. *Applied Microbiology & Biotechnology* 45, 112-119.
- Stentebjerg-Olesen, B., Pallesen, L., Jensen, L.B., Christiansen, G., und Klemm, P. (1997). Authentic display of a cholera toxin epitope by chimeric type 1 fimbriae: effects of insert position and host background. *Microbiology* 143, 2027-2038.
- Struyve, M., Visser, J., Adriaanse, H., Benz, R., und Tommassen, J. (1993). Topology of PhoE porin: the 'eyelet' region. *Molecular Microbiology* 7, 131-140.

- Su, G.F., Brahmabhatt, H.N., Wehland, J., Rohde, M., und Timmis, K.N. (1992). Construction of stable Lamb-Shiga toxin B subunit hybrids: analysis of expression in *Salmonella typhimurium aroA* strains and stimulation of B subunit-specific mucosal and serum antibody responses. *Infection & Immunity* 60, 3345-3359.
- Sugimura, K. und Nishihara, T. (1988). Purification, characterization, and primary structure of *Escherichia coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT. *Journal of Bacteriology* 170, 5625-5632.
- Suhr, M., Benz, I., und Schmidt, M.A. (1996). Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Molecular Microbiology* 22, 31-42.
- Suzuki, T., Lett, M.C., und Sasakawa, C. (1995). Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 30874-30880.
- Sztejn, M.B., Wasserman, S.S., Tacket, C.O., Edelman, R., Hone, D., Lindberg, A.A., und Levine, M.M. (1994). Cytokine production patterns and lymphoproliferative responses in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi*. *Journal of Infectious Diseases* 170, 1508-1517.
- Tabor, S. und Richardson, C.C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 1074-1078.
- Tacket, C.O., Hone, D.M., Curtiss, R., Kelly, S.M., Losonsky, G., Guers, L., Harris, A.M., Edelman, R., und Levine, M.M. (1992a). Comparison of the safety and immunogenicity of delta *aroCΔaroD* and *ΔcyaΔcrp* *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infection & Immunity* 60, 536-541.
- Tacket, C.O., Hone, D.M., Losonsky, G.A., Guers, L., Edelman, R., und Levine, M.M. (1992b). Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine* 10, 443-446.
- Tacket, C.O., Kelly, S.M., Schodel, F., Losonsky, G., Nataro, J.P., Edelman, R., Levine, M.M., und Curtiss, R. (1997). Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid- encoded hepatitis-B antigens stabilized by the *asd*-balanced lethal vector system. *Infection and Immunity* 65, 3381-3385.
- Tang, L., Ou, X., Henkle-Duhrsen, K., und Selkirk, M.E. (1994). Extracellular and cytoplasmic CuZn superoxide dismutases from *Brugia lymphatic* filarial nematode parasites. *Infection & Immunity* 62, 961-967.
- Tang, L., Smith, V.P., Gounaris, K., und Selkirk, M.E. (1996). *Brugia pahangi*: the cuticular glutathione peroxidase (gp29) protects heterologous membranes from lipid peroxidation. *Experimental Parasitology* 82, 329-332.
- Taylor, M.J., Abdelwahab, N., Wu, Y., Jenkins, R.E., und Bianco, A.E. (1995). *Onchocerca volvulus* larval antigen, ovb20, induces partial protection in a rodent model of onchocerciasis. *Infection and Immunity* 63, 4417-4422.
- Tilgner, S. und Metzke, H. Blutentnahme aus den Venen der Orbita. *Zeitschrift für Versuchstierkunde* 5, 59. 1964.
- Tite, J.P., Gao, X.M., Hughes-Jenkins, C.M., Lipscombe, M., O'Callaghan, D., Dougan, G., und Liew, F.Y. (1990). Anti-viral immunity induced by recombinant nucleoprotein of influenza A virus. III. Delivery of recombinant nucleoprotein to the immune system using attenuated *Salmonella typhimurium* as a live carrier. *Immunology* 70, 540-546.
- Tomassen, J., Agterberg, M., Janssen, R., und Spierings, G. (1993). Use of the enterobacterial outer membrane protein PhoE in the development of new vaccines and DNA probes. *Zentralblatt für Bakteriologie* 278, 396-406.
- Tree, T.I., Gillespie, A.J., Shepley, K.J., Blaxter, M.L., Tuan, R.S., und Bradley, J.E. (1995). Characterisation of an immunodominant glycoprotein antigen of *Onchocerca volvulus* with homologues in other filarial nematodes and *Caenorhabditis elegans*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 69, 185-195.
- Tsang, V.C., Boyer, A.E., Pilcher, J.B., Eberhard, M.L., Reimer, C.B., Zea-Flores, G., Zea-Flores, R., Zhou, W., und Richards, F.O. (1991). Guatemalan human onchocerciasis. I. Systematic analysis of patient populations, nodular antigens, and specific isotypic reactions. *Journal of Immunology* 146, 3993-4000.

- Turner, S.J., Carbone, F.R., und Strugnell, R.A. (1993). *Salmonella typhimurium*  $\Delta$ aroA  $\Delta$ aroD mutants expressing a foreign recombinant protein induce specific major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in mice. *Infection & Immunity* 61, 5374-5380.
- Tzschaschel, B.D., Guzman, C.A., Timmis, K.N., und de Lorenzo, V. (1996a). An *Escherichia coli* hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: export of Shiga-like toxin IIeB subunit by *Salmonella typhimurium* aroA. *Nature Biotechnology* 14, 765-769.
- Tzschaschel, B.D., Klee, S.R., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., und Guzman, C.A. (1996b). Towards a vaccine candidate against *Shigella dysenteriae* 1: expression of the Shiga toxin B-subunit in an attenuated *Shigella flexneri* aroD carrier strain. *Microbial Pathogenesis* 21, 277-288.
- Ulmer, J.B. und Liu, M.A. (1996). ELI's coming: expression library immunization and vaccine antigen discovery. *Trends in Microbiology* 4, 169-70; discussion 170-1.
- Valadon, P., Nussbaum, G., Boyd, L.F., Margulies, D.H., und Scharff, M.D. (1996). Peptide libraries define the fine specificity of anti-polysaccharide antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Molecular Biology* 261, 11-22.
- Verma, N.K., Ziegler, H.K., Stocker, B.A., und Schoolnik, G.K. (1995). Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of *Salmonella*. *Vaccine* 13, 235-244.
- Vogel, H. und Jahnig, F. (1986). Models for the structure of outer-membrane proteins of *Escherichia coli* derived from raman spectroscopy and prediction methods. *Journal of Molecular Biology* 190, 191-199.
- Vuilleumier, S. (1997). Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for?. *Journal of Bacteriology* 179, 1431-1441.
- Wahl, G., Enyong, P., Ngosso, A., Schibel, J.M., Moyou, R., Tubbesing, H., Ekale, und Renz, A. (1998). *Onchocerca ochengi*: epidemiological evidence of cross-protection against *Onchocerca volvulus* in man. *Parasitology* 116, 349-362.
- Ward, D.J., Nutman, T.B., Zea-Flores, G., Portocarrero, C., Lujan, A., Ottesen, und EA (1988). Onchocerciasis and immunity in humans: enhanced T cell responsiveness to parasite antigen in putatively immune individuals. *Journal of Infectious Diseases* 157, 536-543.
- Weiss, N. und Tanner, M. (1981). Immunogenicity of the surface of filarial larvae (*Dipetalonema viteae*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 75, 179-181.
- Wick, M.J., Harding, C.V., Normark, S.J., und Pfeifer, J.D. (1994). Parameters that influence the efficiency of processing antigenic epitopes expressed in *Salmonella typhimurium*. *Infection & Immunity* 62, 4542-4548.
- Wildenburg, G., Kromer, M., und Buttner, D.W. (1996). Dependence of eosinophil granulocyte infiltration into nodules on the presence of microfilariae producing *Onchocerca volvulus*. *Parasitology Research* 82, 117-124.
- Wildenburg, G., Plenge-Bonig, A., Renz, A., Fischer, P., und Büttner, D.W. (1997). Distribution of mast cells and their correlation with inflammatory cells around *Onchocerca gutturosa*, *O. tarsicola*, *O. ochengi*, and *O. flexuosa*. *Parasitology Research* 83, 109-120.
- Wildenburg, G. und Henkle-Dührsen, K. (1999). *Onchocerca volvulus*: Immunolocalization of the extracellular CuZn superoxide dismutase using antibodies raised against a 15-mer epitope of this enzyme. *Experimental Parasitology* 91(1), 1-6.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., und Hoogenboom, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annual Review of Immunology* 12, 433-455.
- World Health Organization (1995). Onchocerciasis and its control. WHO Technical Report Series 852,
- Worms, M. J., Terry, R. J., und Terry, A. *Dipetalonema witei*, filarial parasite of the jird, *Meriones unguiculatus* I. Maintenance in the laboratory. *Journal of Parasitology* 47, 963-970. 1961.

- Wu, J.Y., Newton, S., Judd, A., Stocker, B., und Robinson, W.S. (1989). Expression of immunogenic epitopes of hepatitis B surface antigen with hybrid flagellin proteins by a vaccine strain of *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 4726-4730.
- Wysong, D.R., Christin, L., Sugar, A.M., Robbins, P.W., und Diamond, R.D. (1998). Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infection & Immunity* 66, 1953-1961.
- Xu, M., Molento, M., Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R., und Prichard, R. (1998). Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Molecular & Biochemical Parasitology* 91, 327-335.
- Yan, Z.X., Reuss, F., und Meyer, T.F. (1990). Construction of an invertible DNA segment for improved antigen expression by a hybrid *Salmonella* vaccine strain. *Research in Microbiology* 141, 1003-1004.
- Yan, Z.X. (1992). Two-Phases system for the development of live recombinant bacterial vaccines. Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Yan, Z.X. und Meyer, T.F. (1994). The variation of antigen expression: a natural phenomenon utilised for the construction of live recombinant *Salmonella* vaccines. *Behring Institute Mitteilungen* 49-56.
- Yan, Z.X. und Meyer, T.F. (1996). Mixed population approach for vaccination with live recombinant *Salmonella* strains. *Journal of Biotechnology* 44, 197-201.
- Yan, Z.X., Andreev, J., Rottem, S., und Meyer, T.F. (1997). Construction of a *Mycoplasma penetrans* expression library in *E. coli* using the two-phase expression system. *Behring Institute Mitteilungen* 99-102.
- Yang, D.M., Fairweather, N., Button, L.L., McMaster, W.R., Kahl, L.P., und Liew, F.Y. (1990). Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *Journal of Immunology* 145, 2281-2285.
- Yano, K. und Nishie, H. (1978). Superoxide Dismutase levels in facultatively anaerobic bacteria: enzyme levels in relation to growth conditions. *Journal of General Applied Microbiology* 24, 33
- Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74, 139-162.
- Zeng, W. und Donelson, J.E. (1992). The actin genes of *Onchocerca volvulus*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 55, 207-216.
- Zychlinsky, A., Perdomo, J.J., und Sansonetti, P.J. (1994). Molecular und cellular mechanisms of tissue invasion by *Shigella flexneri*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 730, 197-208.



## 9 Anhang

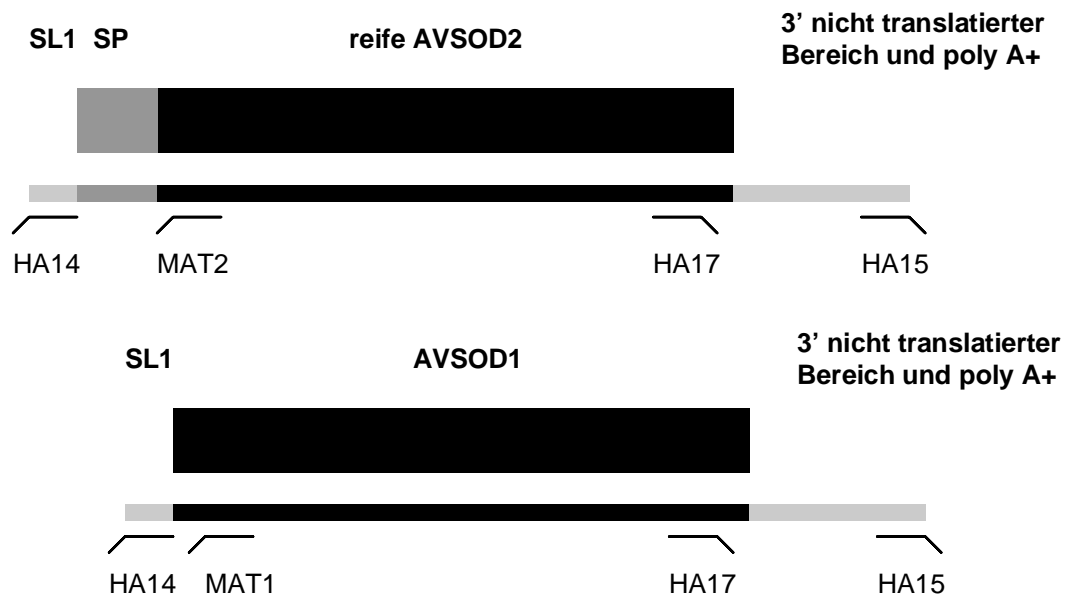
### 9.1 Abkürzungen

2-ME	2-Mercaptoethanol
Ac:	Acetat
AIDA-I:	<i>Adhesin involved in diffuse adherence</i>
Amp:	Ampicillin
AMV-RT:	reverse Transkriptase aus <i>avian myeloblastosis virus</i>
AS	Antiserum
BCIP:	5-Brom-4-Chlor-indolylphosphat
CTB:	Cholera Toxin B Untereinheit
DNA:	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs:	Desoxynukleotidtriphosphate
ECL:	<i>enhanced chemiluminescence</i>
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS:	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
GSP:	<i>general secretory pathway</i>
HEPES:	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
mAk	monoklonaler Antikörper
M-MLV-RT:	reverse Transkriptase aus <i>moloney-murine leukemia virus</i>
NBT:	Nitroblautetrazolium
OD:	optische Dichte
PAGE:	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
pi:	<i>post infection</i>
PVDF:	polyvinylidendifluorid
RT:	Raumtemperatur
RT-PCR:	Kopplung von reverser Transkription und PCR
RNA:	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
scFv:	<i>single chain variable fragment</i>
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SL	spliced leader 1 von Nematoden
SL-RT-PCR:	RT-PCR mit SL-Primer
SOD:	Superoxid Dismutase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TAE:	TRIS-Acetat-EDTA
TBE:	TRIS-Borat-EDTA
TRIS:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN:	über Nacht
X-Gal:	5-Bromo-4chloro3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
ZE:	Zentrifugationsentsalzung

## 9.2 Parasitologische Abkürzungen:

L1:	1. Larvenstadium (Mikrofilarie)
mL3:	3. Larvenstadium, infektiöse Larve, im Vektor
L3 <sub>[n]</sub> :	3. Larvenstadium, postinvasive 3. Larve (im Endwirt) n = Tag der Reisolierung
L4: 4.	Larvenstadium (im Endwirt)

## 9.3 Schematische Darstellung der Primerbindestellen in der Sequenz von AVSOD1 und AVSOD2



## 9.4 Vollständige Aminosäuresequenz von FP67 und FP77

### FP77

```
1  MSIQHFRVAL  IPFFAAFCPLP  VFAHPETLVK  VKDAEDQLGA  RVGYIELDLN
51  SGKILESFRP  EERFPMMSTF  KVLCCGAVLS  RVDAGQEQLG  RRIHYSQNDL
101 VEYSPVTEKH  LTDGMTVREL  CSAAITMSDN  TAANLLTTI  GGPKELTAFL
151 HNMGDHVTRL  DRWEPELNEA  IPNDERDTM  PAAMATTLRK  LLTGELLTLA
201 SRQQLIDWME  ADKVAGPLLR  SALPAGWFIA  DKSGAGERGS  RGI IAALGPD
251 GKPSRIVVIY  TTGSQATMDE  RNRQIAEIGA  SLIKHWRSLN  PTKESAGNTL
301 TVSNYTGTPG  SVISLGGVLE  GDNSLTDRLV  VKGNTSGQSD  IVYVNEGSG
351 GQTRDGINII  SVEGNSDAEF  SLKNRVVAGA  YDYTLQKGNE  SGTDNKGWYL
401 TSHLPTSDTR  QYRPENGSYA  TNMALANSLF  LMDLNERKQF  RAMSDNTQPE
451 SASVWMKITG  GISSGKLNDG  QNKTTTNQFI  NQLGGDIYKF  HAEQLGDFTL
501 GIMGGYANAK  GKTINYTSNK  AARNTLDGYS  VGVYGTWYQN  GENATGLFAE
551 TWMQYNWFNA  SVKGDGLEEE  KYNLNGLTAS  AGGGYNLNVH  TWTSPEGITG
601 EFWLQPHLQA  VWMGVTPDTH  QEDNGTVVQG  AGKNNIQTKA  GIRASWKVKS
651 TLDKDTGRRF  RPYIEANWIH  NTHEFGVKMS  DDSQLLSGSR  NQGEIKTGIE
701 GVITQNLSVN  GGVAYQAGGH  GSNAISGALG  IKYSF*
```

**FP67**

1 MIKCLKFGVFF TVLLSSAYAH GTPQMYIARE SNSKCLKTRNY TTKMKAVAVL  
51 RSDTVNGTIF FQQDNKSSPV MINGKISGLT PGLHGFHNHQ YGDMTNGCIS  
101 AGAHFNPFVK THSGPTDQVK HIGDLGNIKA GADGIAHINI SSNYIKLSGP  
151 ISIIGRSLVV HAMEDDLGKG IGDKREESLK TGNAGSRVTC SIIGIADSIG  
201 TRSLNPTKES AGNTLTVSNY TGTPGSVISL GGVLEGDNSL TDRLVVKGNT  
251 SGQSDIVYVN EDGSGGQTRD GINIISVEGN SDAEFSKLNK VVAGAYDYTL  
301 QKGNESGTDN KGWYLTSHLP TSDTRQYRPE NGSYATNMAL ANSLFLMDLN  
351 ERKQFRAMSD NTQPESASVW MKITGGISSG KLNDGQNKTT TNQFINQLGG  
401 DIYKFHAEQL GDFTLGIMGG YANAKGKTIN YTSNKAARNT LDGYSVGVYV  
451 TWYQNGENAT GLFAETWMQY NWFNASVKGD GLEEEKYNLN GLTASAGGGY  
501 NLNVHTWTSP EGITGEFWLQ PHLQAVWMGV TPDTHQEDNG TVVQAGAKNN  
551 IQTKAGIRAS WKVKSTLDKD TGRFRFPYIE ANWIHNTEHF GVKMSDDSQL  
601 LSGSRNQGEI KTGIEGVITQ NLSVNGGVAY QAGGHGSNAI SGALGIKYSF  
651 \*

## **Lebenslauf**

Claus Tobias Lattemann

Schöpplerstr. 13

86154 Augsburg

geboren am: 28. Juli 1969 in Tübingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung**

9/75 - 7/79 Mörke-Grundschule in Tübingen

8/79 – 5/88 Kepler-Gymnasium in Tübingen

### **Studium**

10/88 – 7/95 Studium der Biologie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

11/90 Vordiplom

2/91 – 12/91 Studium der Biologie an der Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brasilien

7/94 – 7/95 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Infektionsbiologie.  
Titel der Arbeit: „Amplifikation von Gesamt-cDNA definierter Entwicklungsstadien und der cDNA zweier CuZn Superoxid-Dismutasen der Filarie *Acanthocheilonema viteae*“

7/95 Diplom

### **Promotion**

8/95 – 3/99 Promotion am Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Infektionsbiologie, unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. T.F. Meyer: „Entwicklung von rekombinanten attenuierten *Salmonella* Vakzinstämmen zur Immunprophylaxe von *Onchocerca volvulus* Infektionen.“

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Claus Lattemann

Schöpplerstr. 13

86154 Augsburg