

Subpopulationen von humanen T-Lymphozyten zur Charakterisierung von *Plasmodium falciparum* Merozoiten-Antigenen

R. Goerlich, B. Günder, H.-G. Heidrich

Einleitung

Die erschreckende weltweite Zunahme der Malaria hat in fast allen hochentwickelten Ländern Aktivitäten ausgelöst, die sich sowohl mit der Entwicklung neuer Prophylaktika und Chemotherapeutika, hauptsächlich aber mit der Frage eines Impfstoffes gegen die Malaria befassen. Besonders bei der Lösung des letzteren Problems bedarf es noch weitgehender Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Charakterisierung solcher Parasitenantigene, die mit den Mechanismen der Parasit-Wirt Beziehungen im Zusammenhang stehen. Hier wiederum ist von dringendstem Interesse zu wissen, welche Epitopbereiche der Malaria-Antigene im Wirt eine z. B. durch Helfer-T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort auslösen können und dabei keiner oder möglichst einer geringen genetischen Restriktion unterliegen. Eine solche Restriktion liegt in dem ausgedehnten Polymorphismus der Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II (MHC II) innerhalb der verschiedenen HLA Haplotypen der menschlichen Population begründet. Sie entscheidet, ob prozessierte Epitopbereiche auf der Zelloberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle mit den Restriktionselementen des MHC II der verschiedenen genetischen Phenotypen assoziieren können oder nicht. Davon, daß dieser Komplex auf den Antigen-präsentierenden Zellen gebildet und anschließend von den CD4⁺ T-Lymphozyten erkannt wird, hängt ab, ob ein Epitop stimulierend auf Helfer-T-Zellen wirkt oder nicht. Daher muß ein wirklich effektives Impfstoffmolekül von einer Vielzahl von HLA-Haplotypen erkannt werden und nicht nur von einigen wenigen. Eine zusätzliche Forderung an ein Impfstoffmolekül ist, daß es nur CD4⁺ Helfer- und/oder CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten stimuliert, nicht aber solche, die für eventuelle Suppressorfunktionen verantwortlich sind.

Die ersten, in der jüngsten Vergangenheit mit synthetischen Impfstoffen durchgeführten Vakzinierungsversuche gegen die Malaria am Menschen (1 - 4) haben allerdings unbefriedigende Ergebnisse gebracht. Ein Grund, weshalb die bisher getesteten Konstrukte enttäuscht haben, scheint darin zu liegen, daß beim "vaccine-design" eben diesen zellulären Immunmechanismen nicht genügend Beachtung geschenkt wurde. So wurden in den ersten synthetischen Molekülen solche Epitopbereiche, die CD4⁺ Helfer-T-Lymphozyten stimulieren können, nicht in genügender Anzahl in die Konstrukte eingebaut, sodaß die T-Zellhilfe für eine Stimulierung der B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion nicht ausreichte. Diese Epitope unterlagen der oben beschriebenen genetischen Restriktion (5, 6).

Auch bei natürlichen Infektionen, d. h. bei Infektionen mit nativen Malaria-Antigenen, konnte eine genetische Restriktion nachgewiesen werden (7, siehe auch 8). Das scheint zu bedeuten, daß selbst Moleküle mit mehreren Epitopbereichen nicht mit den Restriktionselementen vieler infizierter Individuen reagieren können, sondern sich nur auf bestimmte Haplotypen beschränken. Polypeptide, die schon selbst einer starken genetischen Restriktion unterliegen, sind aber keine guten Kandidaten für die Entwicklung eines allgemein anwendbaren Impfstoffes. Nur solche Antigene und Epitopbereiche, die von einer Vielzahl von HLA Haplotypen in der Bevölkerung erkannt werden, d. h. die einer möglichst geringen genetischen Restriktion unterliegen, sind für solche Entwicklungen geeignet. Daß es solche Epitopbereiche gibt, wurde kürzlich von SINIGAGLIA (9) gezeigt. Basierend auf der Sequenz des circum-sporozoite-Polypeptids (CSP) von *Plasmodium falciparum* konnten synthetische Peptide konstruiert werden, die von einer Vielzahl von MHC II Molekülen von Mensch und Maus erkannt wurden.

Ob es allerdings native Polypeptide mit solchen Eigenschaften gibt oder inwieweit native Polypeptide einer genetischen Restriktion unterliegen, ist völlig unbekannt.

In vorliegender Arbeit verwenden wir isolierte Oberflächen-Antigene von *P. falciparum*-Merozoiten zusammen mit Subpopulationen ($CD4^+$, $CD8^+$) von T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen von HLA-typisierten naiven Spendern, um evtl. Unterschiede der Reaktionen der Polypeptide mit den verschiedenen Restriktionselementen des MHC II zu erkennen.

Methoden

Antigen-Isolierung

Merozoiten aus *P. falciparum* (FCB1 aus Kolumbien) wurden aus synchronen Kulturen isoliert (10). Die Extraktion der Merozoiten-Polypeptide erfolgte bei Eistemperatur, 60 min in Medium A (11 mM Triäthanolamin, 11 mM Essigsäure, 0,05 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, 5 mM Glucose, 0,15 mM NaCl, 2% (v/v) Aprotinin, pH 7,4 mit 1 n KOH), das noch 2 mM Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF) und die Protease-Inhibitoren Antipain, Bestatin und Pepstatin, alle in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml, und 5 mM Zwittergent 3-12 enthielt (11).

Zur Isolierung der Antigene wurden chromatographische Methoden mit Sephacryl S-300 und dem Anionenaustauscher Mono-Q verwendet (12).

Die SDS-Polyacrylamid Gel Electrophorese (PAGE) wurde in einem diskontinuierlichen System durchgeführt (10). Die getrennten Polypeptide wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Sie wurden entweder elektro-eluiert (13) oder elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (14), wie bereits für *P. falciparum*-Antigene beschrieben (15). Nach Elektro-Transfer auf Nitrozellulose wurden die Antigen-enhaltenden Bereiche der Nitrozellulose ausgeschnitten und in Antigen-tragende Partikel umgewandelt (16).

Alle Antigenpräparationen wurden 12 Stunden in PBS, pH 7,4, dann 12 Stunden gegen komplettes RPMI 1640-Medium dialysiert (siehe unten). Die Proteinkonzentrationen in den Dialysaten waren zu niedrig, um zuverlässige quantitative Bestimmungen durchführen zu können. Daher wurden alle Antigene auf ungefähr gleiche Konzentrationen eingestellt und zwar nach einem Antigen-spot Test mit Anti-Merozoiten-Serum vom Kaninchen (17).

Lymphozyten-Subpopulationen und Antigen-präsentierende Zellen

Mononukleäre Leukozyten (MNL) aus warmem, heparinisierten, peripheren Blut von naiven Spendern (d. h. bisher nicht einer Infektion mit *P. falciparum* exponiert) wurden

auf einem diskontinuierlichen Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten aufgetrennt, gewaschen und in 1% RPMI 1640-Medium (Gibco) resuspendiert, dem 25 mM HEPES, 24 mM NaHCO₃, 1 mM Glutamin, 10% fötales Kälberserum und 33 mg/l Gentamycin zugesetzt waren (komplettes RPMI-Medium).

CD2⁺ Lymphozyten wurden nach der Rosetten-Technik mit Schafserythrozyten (SRBC) nach Behandlung mit 2-Aminoäthylisothiuronium-hydrobromid (AET) unter Verwendung eines Ficoll-Hypaque-Gradienten zur Abtrennung der Rosetten und folgender Lyse der Erythrozyten gewonnen (18).

Zur Anreicherung der CD2⁺ Subpopulationen wurde die panning-Methode nach TSOI (19) in Plastik-Petrischalen verwendet, die zunächst mit Anti-Maus-IgG von der Ziege (10 µg/ml in 0,05 M Tris, pH 9,5, Kirkegaard & Perry Laboratory, USA), dann mit entweder Dako-T4 oder Dako-T8 monoklonalen Antikörpern (10 µg/ml in PBS, Dakopatts) beschichtet waren. Es wurden jeweils 2×10^7 CD2⁺ Zellen in 3 ml 5% FCS-PBS aufgetrennt. Nach Inkubation für 70 min bei 4° C wurden die nicht-adhärenenten Lymphozyten entweder des CD8⁺ oder des CD4⁺ Typs entfernt (negative Populationsauswahl). Die Reinheit dieser Zellen wurde durch indirekte Immunofluoreszenz mit Dako-T4 und Dako-T8 FITC-konjugierten Antikörpern (Dakopatts) kontrolliert.

Monozyten-angereicherte Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) wurden durch Inkubation von 5×10^6 mononukleären Zellen per ml in komplettem RPMI Medium (mit nur 5% FCS) für 1 Stunde bei 37° C in Petrischalen aus Polystyrol angereichert. Die adhärenenten Zellen (Monozyten und Makrophagen) wurden nach 20 Minuten Inkubation bei 4° C gewaschen und dann mit eiskaltem PBS von der Platte entfernt (20).

HLA-Typisierung

Zur HLA-A, -B, -C bzw. -DR, -DQ-Typisierung wurden in Terasaki-Bestimmungsplatten (One Lambda Inc., Los Angeles, USA) für die A, B, C Typisierung $1-2 \times 10^3$ MNZ in 1 µl 30 min bei RT zusammen mit den Anti-Seren inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Kaninchenkomplement für 1 Stunde bei RT wurde weiter nach Standardvorschrift verfahren. Für die DR-, DQ-Bestimmung wurde nach Vorschrift des Herstellers $1-2 \times 10^3$ B-Lymphozyten in 1 µl für 1 Stunde bei 37° C inkubiert und die Reaktionszeit mit 5 µl Kaninchenkomplement auf 2 Stunden ausgedehnt. Für jeden Spender wurden drei unabhängige Bestimmungen durchgeführt. Die Typisierungen ergaben :

RG A3, A28, B35, Bw55, Cw4, DR1, DR2, DQw1, DQw3
AH A2, A9, B5, Bw6, B51, Cw5, Dw8, DR5, DQw3, DRw52,
MA A2, Aw33, Bw4, B13, B14, B57, Cw4, DR1, DR3, DRw6, DRw52
TP A2, A25, B13, B44, Cw6, DR3, DR5, DR8, DQw2, DQw3, DRw52
CG A1, A2, Aw36, B8, Bw41, Bw6, Cw7, DR3, DRw11, DQw2, DQw3, DRw52
AP A2, A25, B7, B18, Bw6, Cw7, DR5, DRw6, DRw13, DRw52, DQw1, DQw6
AS A2, B13, Bw4, Bw6, DR2, DRw52, DQw1, DQw6
AL A1, A3, B8, B40, Bw6, DR3, DRw6, DRw52, DRw13, DQw1, DQw2
MÜ A2, A29, B7, B13, Bw4, Bw6, Cw6, DR5, DR7, DRw52, DRw53, DQw2, DQw3
RR A2, B12, Bw40, Cw3, DR2, DR7, DRw9, DRw53, DQw2, DQw3

Lymphozyten-Proliferationstest

Mononukleäre Zellen oder angereicherte Subpopulationen von menschlichen T-Lymphozyten (10^5 Zellen per well in einer 96 Flachboden-Mikrotiterplatte) von HLA-typisierten Spendern (naiv für *P. falciparum*) wurden zusammen mit autologen APZ (2×10^4 Zellen per well) 6 Tage inkubiert. Die APZ waren vorher 15 h mit der optimalen Menge gereinigten Polypeptids aus Merozoiten-Extrakt (2-6-ng) inkubiert und vor Zugabe zum

Ansatz mit komplettem RPMI gewaschen worden. Die Proliferation, die mit dem ^{14}C - oder ^3H -Thymidin-Einbau (1 μCi pro well) in die Zellen korreliert, wurde 18 Stunden später in counts per min (cpm) gemessen. Jeder Testansatz bestand jeweils aus Triplikaten. Es wurden bei allen Versuchen Kontrollstimulationen mit dem Mitogen PHA-P vorgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

Merozoiten-Antigene und Lymphozyten-Subpopulationen

Zu den wichtigsten Antigenen, die für die Entwicklung einer Immunprophylaxe von vorrangiger Bedeutung sind, gehören die Oberflächenantigene der extrazellulären Merozoiten. In unseren Versuchen kamen Polypeptide der Merozoitenoberfläche zum Einsatz, z. B. Fragmente des 185-195 kDa PMMSA (dimorphic merozoite surface antigen) wie z. B. das 83 kDa und 36 kDa-Polypeptid, und ein 46 kDa-Glykoprotein, das nicht vom PMMSA abstammt (21). Diese (und andere) Polypeptide wurden deshalb ausgewählt, weil Antikörper gegen sie zumindest beim 36 und 46 kDa-Polypeptid das Eindringen von Merozoiten in rote Blutkörperchen hemmen. Diese Antigene scheinen daher — vom 83 kDa-Antigen abgesehen — am Invasionsprozeß beteiligt zu sein.

Die Antigene wurden mit verschiedenen chromatographischen Methoden isoliert oder aus Polyakrylamid-Gelen elektroeluiert. Außerdem wurden aus Polyakrylamid-Gelen Polypeptide auf Nitrozellulose elektro-transferiert und als Granulat zur Lymphozytenstimulierung eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß die Methode der auf Nitrozellulose-Granulat gebundenen Antigene zur Stimulierung von Lymphozyten (22) zumindest bei den hier verwendeten *P. falciparum*-Antigenen zu keiner Antigen-spezifischen Blastogenese führt, sondern nur zu einem sehr hohen unspezifischen background.

Detergentien sind aus Antigenextrakten, Säuleneluaten oder aus elektroeluiertem Material schwierig zu entfernen und können die sensiblen T-Lymphozyten schädigen. Um dieses Problem zu lösen, wurden Polypeptide aus Elektro-Eluaten oder aus chromatographischen Trennungen (Antigen-Präparationen also, die in beiden Fällen nicht durch Dialyse völlig zu entfernende Detergentien enthielten), zunächst zusammen mit den widerstandsfähigeren APZ über Nacht inkubiert, und zwar auf 2×10^5 APZ im 1 ml Ansatz 20-60 ng Polypeptid. Während dieser Zeit erfolgte das processing der Antigene und die Präsentation auf der Zelloberfläche. Bei elektronen-mikroskopischen Kontrollen und Färbung mit Trypanblau waren die Zellen nach dieser Zeit morphologisch intakt und vital. Dann wurden sie mittels eines Ficoll-Gradienten vom vorhandenen Detergents abgetrennt oder auch nur gewaschen. Die mit dieser Methode zur Stimulierung der T-Lymphozyten vorbereiteten APZ zeigten in ihren Kontrollen den gewünschten niedrigen background bei der Stimulierung und waren zur Aktivierung der eingesetzten T-Zellsubpopulationen sehr gut geeignet.

Die einzelnen T-Zellsubpopulationen, die in den Stimulierungsversuchen verwendet wurden, waren jeweils durch negative Selektion gewonnen worden, d. h. es waren nur solche CD4^+ - oder CD8^+ -Zellen verwendet worden, die nicht mit monoklonalen Antikörpern beladen waren. Die Homogenität dieser Subpopulationen wurde mit indirekter Immunfluoreszenz kontrolliert. Sie war stets höher als ca. 90%.

Eine Kinetik für die zunächst drei in den Stimulierungsversuchen eingesetzten Oberflächenantigenen (83, 46 und 36 kDa) ergab in Konzentrationsbereichen von 1 bis 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der Polypeptide bei MNL, CD2^+ -, CD4^+ - und CD8^+ -Zellen gute Proliferationsraten. Dieser Bereich ist breit und wir leiten daraus eine konstante Antigenmenge von 2-6 ng Antigen pro Testansatz ab.

CD4⁺ und CD8⁺ Proliferation und HLA-Spezifitäten

In Vorversuchen, in denen MNL- und CD2⁺-Lymphozyten, also nicht weiter aufgetrennte T-Zellen mit den einzelnen Antigenen stimuliert wurden, deuteten sich bereits Gruppierungen der 10 Spender mit unterschiedlichen HLA-Haplotypen in non, low und high responder an. Es waren aber keine spenderabhängigen Unterschiede bei der proliferativen Antwort der stimulierten Zellen bezüglich der drei verwendeten Antigene zu erkennen.

Das gleiche Ergebnis sieht man bei der Stimulierung der CD4⁺-T-Zellen mit den drei Antigenen, nur werden hier die Gruppenzugehörigkeiten viel deutlicher (Abb. 1a). Die CD4⁺-Subpopulation ist nur bei den Spendern MÜ und RR durch alle drei Oberflächenantigene deutlich stimulierbar. Bei Stimulierung mit dem 46 kDa-Polypeptid gehören noch die Spender MA und CG zur Gruppe der high responder. Wenn die Graphik in Abb. 1a in tabellarische Form gebracht wird (Tab. 1), erkennt man, daß das Spenderkollektiv in drei Gruppen aufgeteilt ist, nämlich in non, low und high responder. Die non-responder-Gruppe weist als gemeinsames HLA Molekül das DQw1-Antigen auf. Dieses Antigen ist bei keinem anderem Mitglied der beiden anderen Gruppen vorhanden.

Das DQw1-HLA-Molekül ist bei der proliferativen T-Zellantwort gegen *Schistosoma japonicum*, wie von SASAZUKI (23) gefunden wurde, bei Nonrespondern mit DR2-DQw1-Haplotyp als ein Restriktionselement bestimmt worden. Dabei wurde das HLA-DR2-Molekül als Genprodukt der Ir-Gene identifiziert, während das HLA-DQw1-Molekül als Produkt der Immunsuppressions-Gene in Erscheinung trat. Das Gen für das HLA-DQw1-Molekül ist gegenüber dem Gen für das DR2-Molekül epistatisch, d. h. die suppressive Antwort dominiert über die Immunantwort. DE VRIES (24) konnte zeigen, daß bei einer fehlenden *M. leprae*-spezifischen T-Zell Antwort eine Assoziation mit dem HLA-DQw1 vorliegt, glaubt aber nun (25) im Gegensatz zu SASAZUKI (23), daß DR-Moleküle bei Antigenen von *M. leprae* auch die Suppressor-T-Zellen steuern, wobei allelische Unterschiede dazu führen sollen, ob Helfer-T-Zellen oder Suppressor-T-Zellen aktiviert werden. Unsere Spender RG und AS weisen den Haplotyp DR2-DQw1 auf und sind Nonresponder. Dieses Ergebnis muß durch Versuche zur Blockierung des DQw1-Moleküls erhärtet werden.

Als high responder können die Spender RR und besonders MÜ angesehen werden. Beide Spender besitzen das DR-Breitband-Antigen DRw53, zu dem das HLA-Antigen DR7 zählt, das bei beiden Spendern zu finden ist. Auch das HLA-DRw9 von Spendern RR ist ein split vom DRw53-Antigen. Das DR7-Molekül konnte auch von SINIGAGLIA (9) als Restriktionselement für eine gute T-Zellproliferation nach erfolgter Stimulation mit synthetischen Epitopen (Analoge zum *P. falciparum* CSP) identifiziert werden. Diese HLA-Antigene sind nur bei RR und MÜ und bei keinem anderen unserer Spender nachweisbar und daher nehmen wir an, daß sie für die hohe Proliferationsantwort verantwortlich sind.

Werden die CD8⁺ Zellen mit den drei Polypeptiden stimuliert (Abb. 1b, in einem kleineren Maßstab als Abb. 1a dargestellt), so ergibt sich für Spender AS für die Antigene 83, 46 und 36 kDa und für Spender AH und RR für das Polypeptid 83 kDa und MA für das 46 kDa-Antigen eine mittelmäßige T-Zellproliferation. Nur für das 36 kDa-Antigen kann ein high response bei Spender MÜ ermittelt werden. Auffallend bei den Stimulierungsversuchen der CD8⁺-T-Lymphozyten war (Tab. 2), daß Spender mit den splits der Bw4-Breitbandantigenen die signifikant stärkeren Proliferationsrate aufwiesen, wie z. B. B51 (AH), sowie B13 (TP, MA, RR, AS und MÜ). Diese HLA-Moleküle sind noch nicht als Restriktionselemente beschrieben worden. Wir vermuten aber, daß sie in einem Zusammenhang mit der starken proliferativen Antwort der CD8⁺-T-Zellen stehen.

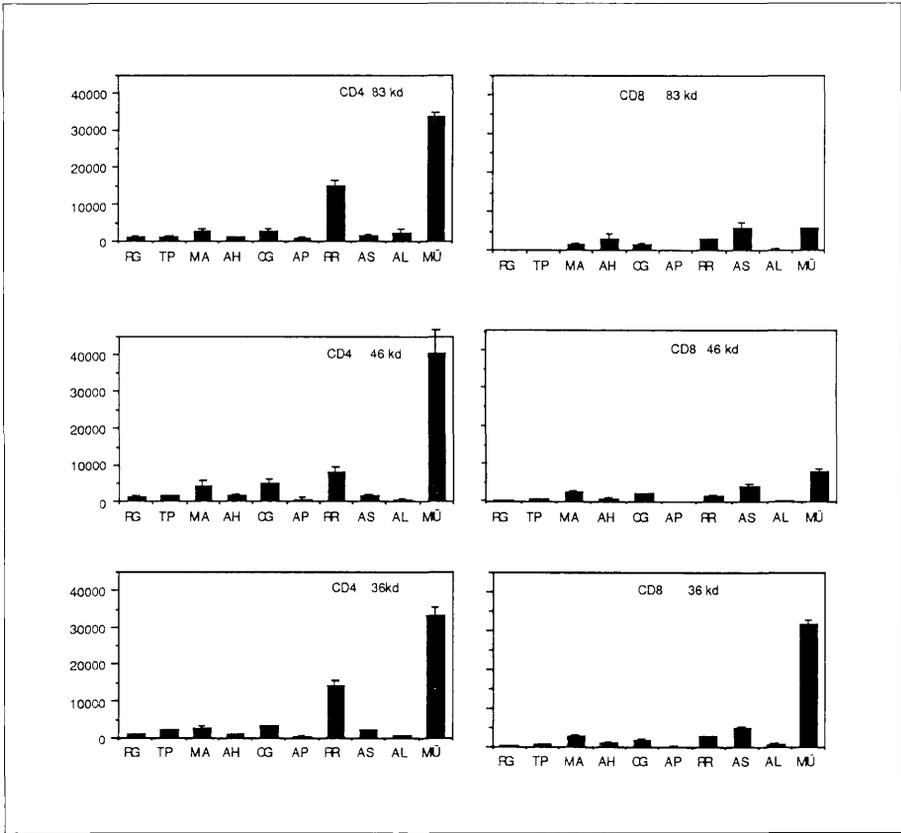


Abb. 1 a

Abb. 1 b

Es ist uns bewußt, daß die Analyse der HLA-DR-Moleküle bei unseren Spendern noch nicht weit genug in die splits hinein verfeinert ist, um die endgültigen DR-Spezifitäten für einen z. B. non oder high response zu definieren. Versuche zu diesem Problem, besonders Blockierungsversuche, sind in Arbeit. Auch ist eine grundsätzliche Diskussion notwendig, ob die bei den nachweislich noch nie mit Malaria-Polypeptiden in Berührung gekommenen naiven Spendern, die in vitro gefundenen proliferativen Stimulierungen Primärantworten auf die verwendeten isolierten Antigene sind oder Sekundärantworten auf ein früheres priming durch andere Antigene, mit denen die verwendeten *P. falciparum*-Polypeptide kreuzreagieren. Um letztere Frage zu lösen, arbeiten wir auch mit Spendern, die nach einer kurzen Malaria-Episode chemotherapiert oder mit solchen, die akut infiziert sind.

Es wird immer deutlicher, daß das limitierende Element bei der zellvermittelten Immunantwort die Präsentation der immuno-dominanten, prozessierten Epitopbereiche für den T-Zellrezeptor ist. Ohne die Aufklärung und Berücksichtigung dieses Mechanismus, wird es in der nahen Zukunft keinen Impfstoff gegen die Malaria geben, der für die vielen Millionen unter Malariarisiko lebenden allgemein und uneingeschränkt anwendbar ist.

Spender	HLA Phenotyp	Immunantwort (cpm) auf				PHA-P	Medium
		83 kDa	46 kDa	36 kDa			
RG	DR1, DQw3, DR2, <u>DQw1</u>	1243 ± 91	1042 ± 330	759 ± 233	270 ± 320	359 ± 36	
AS	DQw6, DRw8, DRw52, DR2, <u>DQw1</u>	1432 ± 157	1407 ± 507	1871 ± 299	169250 ± 9798	94 ± 36	
AP	DR5, DRw6, DRw13, DRw52, DQw6, <u>DQw1</u>	636 ± 156	657 ± 411	361 ± 273	53500 ± 3535	184 ± 253	
AL	DR3, DRw6, DRw13, DRw52, DQw2, <u>DQw1</u>	2346 ± 900	610 ± 184	553 ± 156	43599 ± 18240	491 ± 32	
AH	DR5, DR8, DRw53, DQw3	852 ± 286	1734 ± 144	797 ± 264	138524 ± 4045	772 ± 472	
TP	DR3, DR5, DR8, DRw52, DQw2, DQw3	1124 ± 350	1372 ± 352	1950 ± 395	14947 ± 1460	488 ± 189	
CG	DR3, DRw11, DRw52, DQw2, DQw3	2669 ± 363	5106 ± 809	3268 ± 263	71092 ± 4250	1524 ± 507	
MA	DR1, DR3, DQw6, DRw52	2618 ± 533	4404 ± 1267	2658 ± 520	224420 ± 11842	313 ± 76	
RR	DR2, DQw2, DQw3, <u>DR7</u> , DRw9, DRw53	14922 ± 1811	8149 ± 1331	14251 ± 1391	57294 ± 10218	312 ± 23	
MÜ	DR5, DRw52, DQw2, DQw3, <u>DR7</u> , DRw53	33685 ± 1415	40460 ± 6280	33367 ± 2105	56564 ± 6477	567 ± 91	

TABELLE 1
Proliferative Stimulierung von CD4⁺ T-Lymphozyten

Spender	HLA Phenotyp	Immuntantwort (cpm) auf				Medium
		83 kDa	46 kDa	36 kDa	PHA-P	
RG	A3, A28, B35, Bw55, Cw4	191 ± 32	268 ± 50	278 ± 75	129 ± 70	197 ± 54
CG	A1, A2, Aw36, Bw6, B8, Bw41, Cw7	1739 ± 335	1963 ± 210	1756 ± 330	38193 ± 6909	502 ± 123
AP	A2, A25, Bw6, B7, B18, Cw7	177 ± 94	112 ± 6	142 ± 5	43824 ± 2733	234 ± 67
AL	A1, A3, Bw6, B8, B40	418 ± 212	280 ± 114	595 ± 251	39240 ± 5074	48 ± 21
AH	A2, A9, B5, Bw6, Cw5, B51	2927 ± 1737	921 ± 117	999 ± 176	43726 ± 5499	632 ± 257
TP	A2, A25, B44, Cw6, B13	274 ± 117	431 ± 78	510 ± 104	18586 ± 7903	56 ± 29
RR	A2, B12, Bw40, Cw3	2897 ± 385	1301 ± 339	2447 ± 445	91515 ± 3857	403 ± 43
AS	A2, Bw6, Bw4, Cw3, B13	6002 ± 1251	4014 ± 493	4750 ± 393	139146 ± 4138	1263 ± 207
MA	A2, Aw33, B14, B57, Cw4, Bw4, B13	1578 ± 386	2570 ± 393	2707 ± 445	122992 ± 66941	189 ± 111
MÜ	A2, A29, Bw6, B7, Cw6, Bw4, B13	5663 ± 442	7902 ± 706	31895 ± 777	71425 ± 9940	363 ± 187

TABELLE 2
Proliferative Stimulierung von CD8⁺ T-Lymphozyten

Zusammenfassung

CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten-Subpopulation von HLA-typisierten Spendern wurden zusammen mit autologen Antigen-präsentierenden Zellen und isolierten *P. falciparum* Merozoiten-Antigenen in Lymphozyten-Stimulationstesten analysiert, um Informationen über eine eventuelle genetische Restriktion der Antigene im MHC II zu erhalten. Es konnten gewisse Rückschlüsse auf die HLA-Spezifitäten bei den Gruppen der Spender gezogen werden, die mit keiner oder aber mit einer sehr starken T-Zell-Proliferationsantwort auf die verschiedenen Antigene reagierten.

Schlüsselwörter

CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, HLA-Haplotyp, *P. falciparum*-Antigen, genetische Restriktion, Proliferation.

Summary

CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subpopulations from HLA-typed donors were analyzed in lymphocyte stimulation tests together with autologous antigen presenting cells and isolated *P. falciparum* merozoite antigens in order to obtain informations on an eventual genetic restriction of the antigens in the MHC II. From the experiments conclusions could be drawn about the HLA-specificities of donors who reacted with no or with a strong T-cell proliferation response.

Key words

CD4⁺ and Cd8⁺ lymphocytes, HLA haplotype, *P. falciparum* antigen, genetic restriction, proliferation.

Literatur

1. BALLOU, W. R., SHERWOOD, J. A., NEVA, F. A., GORDON, D. M., WIRTZ, R. A., WASSERMAN, G. F., DIGGS, C. L., HOFFMAN, S. L., HOLLINGDALE, M. R., HOCKMEYER, W. T., SCHNEIDER, I., YOUNG, J. F., REEVE, P., CHULAY, J. D. (1987):
Safety and efficacy of a recombinant DNA Plasmodium falciparum sporozoite vaccine.
Lancet i, 1277-1281.
2. HERRINGTON, D. A., CLYDE, D. F., LOSONSKY, G., CORTESIA, M., MURPHY, J. R., DAVIS, J., BAQAR, S., FELIX, A. M., HEIMER, E. P., GILLESSEN, D., NARDIN, E., NUSSENZWEIG, R. S., NUSSENZWEIG, V., HOLLINGDALE, M. R., LEVINE, M. M. (1987):
Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against Plasmodium falciparum sporozoites.
Nature 328, 257-259.
3. ETLINGER, H., FELIX, A. M., GILLESSEN, D., HEIMER, E. P., JUST, M., PINK, J. R. L., SINIGAGLIA, F., STÜRCHLER, D., TAKACS, B., TRZECIAK, A., MATILE, H. (1988):
Assessment in humans of a synthetic peptide-based vaccine against the sporozoite stage of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.
J. Immunol. 140, 626-633.
4. PATARROYO, M. E., MADOR, R., CLAVIJO, P., MORENO, A., GUZMAN, F., ROMERO, P., TASCÓN, R., FRANCO, A., MURILLO, L. A., PONTÓN, G., TRUJILLO, G. (1988):
A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stage of Plasmodium falciparum.
Nature 332, 158-161.
5. DEL GIUDICE, G., COOPER, J. A., MERINO, J., VERDINI, A. S., PESSI, A., TOGNA, A. R., ENGBERG, H. D., CORRADIN, G., LAMBERT, P. H. (1986):
The antibody response in mice to carrier-free synthetic polymers of Plasmodium falciparum circumsporozoite repetitive epitope is I-A^b- restricted: Possible implications for malaria vaccines.
J. Immunol. 137, 2952-2955.

6. GOOD, M. F., MILLER, L. H., KUMAR, S., QUAKYI, I. A., KEISTER, D., ADAMS, J. H., MOSS, B., BERZOFOSKY, J. A., CARTER, R. (1988):
Limited immunological recognition of critical malaria vaccine candidate antigens.
Science 242, 574-576.
7. CARTER, R., GRAVES, P. M., QUAKYI, I. A., GOOD, M. F. (1989):
Restricted or absent immune response in human populations to Plasmodium falciparum gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies.
J. Exp. Medicine 169, 135-147.
8. QUAKYI, I. A., OTOO, L. N., POMBO, D., SUGARS, L. Y., MENON, A., DEGROOT, A. S., JOHNSON, A., ALLING, D., MILLER, L. H., GOOD, M. F. (1989):
Differential non-responsiveness in humans of candidate Plasmodium falciparum vaccine antigens.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 41, 125-134.
9. SINIGAGLIA, F., GUTTINGER, M., KILGUS, J., DORAN, D. M., MATILE, H., ETLINGER, H., TRZECIAK, A., GILLESSEN, D., PINK, J. R. L. (1988):
A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules.
Nature 336, 778-780.
10. HEIDRICH, HG., STRYCH, W., MREMA, J. E. K. (1983):
Identification of surface and internal antigens from spontaneously released Plasmodium falciparum merozoites: radioiodination and metabolically labelling of merozoites.
Parasitol. Res. 69, 715-725.
11. MCBRIDE, J. S., HEIDRICH, HG. (1987):
Fragments of the polymorphic M₁ 185 000 glycoprotein from the surface of isolated Plasmodium falciparum merozoites form an antigenic complex.
Mol. Biochem. Parasitol. 23, 71-84.
12. HEIDRICH, HG. (1988):
Isolation and functional characterization of Plasmodium falciparum merozoite antigens.
Biol. Cell 64, 205-214.
13. HUNKAPILLER, M. W., LUJAN, E., OSTRANDER, F., HOOD, L. E. (1983):
Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis.
Meth. Enzymol. 91, 227-236.
14. TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. (1979):
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
15. HEIDRICH, HG., MIETTINEN-BAUMANN, A., ECKERSKORN, C., LOTTSPEICH, F. (1989):
The N-terminal amino acid sequence of the Plasmodium falciparum (FCB1) merozoite surface antigens 42 000 Da and 36 000 Da both derived from the 185 000-195 000 Da precursor.
Mol. Biochem. Parasitol. 34, 147-154.
16. ABOU-ZEID, C., FILLEY, E., STEELE, J., ROOK, G. A. W. (1987):
A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles.
J. Immunol. Meth. 98, 5-10.
17. HERBRINK, R., VAN BUSSEL, F. J., WARNAAR, S. O. (1982):
The antigen spot test (AST): A highly sensitive assay for the detection of antibodies.
J. Immunol. Meth. 48, 293-298.
18. SAXON, A., FELDHAUS, J., ROBINS, R. A. (1976):
Single step separation of human T and B cells using AET treated SRBC rosettes.
J. Immunol. Meth. 12, 285-288.
19. TSOI, M. S., APRILE, J., DOBBS, S., GOEHLE, S., STORB, R. (1982):
Enrichment (and Depletion) of Human Suppressor Immunoglobulin-coated plates.
J. Immunol. Meth. 53, 293-305.
20. LEHNER, T., AVERY, J., SMITH, R. (1985):
Helper and suppressor functions of human mononuclear cells depleted of antigen-binding T8⁺ cells.
Immunology 54, 701.

21. MIETTINEN-BAUMANN, A., STRYCH, W., MCBRIDE, J., HEIDRICH, HG. (1988):
A 46 000 Da Plasmodium falciparum merozoite surface antigen not related to the 185 000-195000 Da schizont precursor molecule: isolation and characterization.
Parasitol. Res. 74, 317-323.
22. LAMB, R. J., O'HEHIR, R. E., YOUNG, D. B. (1988):
The use of nitrocellulose immunoblots for the analysis of antigen recognition by T lymphocytes.
J. Immunol. Meth. 110, 1-10.
23. SASAZUKI, T., KIKUCHI, I., HIRAYAMA, K., MATSUSHITA, S., OHTA, N., NISHIMURA, Y. (1989):
HLA-linked immune suppression in humans.
Immunology, Suppl. 2, 21-24.
24. DE VRIES, R. R. P., VAN EDEN, W., OTTENHOFF, T. H. M. (1985):
HLA class-II immune response genes and products in leprosy. In: *Progress in Allergy*, Vol. 36 (R. R. P. de Vries, J. J. van Rood, eds.)
S. Karger, Basel/München/Paris/London/New York/Tokyo/Sydney, 1985, pp. 95-113.
25. DE VRIES, R. R. P., OTTENHOFF, T. H. M., ELFERINK, D. G., SHUGUANG, L. (1989):
HLA-molecules are both Ir- and Is-gene products for T-cell responsiveness against *M. leprae*. In:
Immunobiology of HLA, Vol. II (Bo Dupont, ed.)
Springer Verlag, New York/Berlin/Heidelberg/London/Paris/Tokyo/Hong Kong, 1989, pp. 463-464.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dr. Hans G. Heidrich
Max-Planck-Institut für Biochemie
Arbeitsgruppe MALARIA-Forschung

D- 8033 Martinsried bei München · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: [12](#)

Autor(en)/Author(s): Goerlich R., G nder B., Heidrich Hans-G.

Artikel/Article: [Subpopulationen von humanen T-Lymphozyten zur Charakterisierung von Plasmodium falciparum Merozoiten-Antigenen. 255-266](#)