

## *T-Zell Immunblotting – Ein neuer Ansatz zur Identifizierung potentiell schutzvermittelnder Antigene von *Onchocerca volvulus**

C. G. K. Lüder, P. T. Soboslay, H. Schulz-Key

**Einleitung** Chronische Infektionen mit *Onchocerca volvulus*, dem Erreger der Flußblindheit, führen häufig zu pathologischen Hautveränderungen und Blindheit und stellen für die Bevölkerung in weiten Teilen Afrikas neben der gesundheitlichen Beeinträchtigung auch ein großes sozio-ökonomisches Problem dar. Die Bekämpfung der Onchozerkose durch das Onchozerkose-Kontroll-Programm (OCP) der WHO basiert heute auf der Bekämpfung der Überträgerlarven in ihren Brutgewässern sowie der jährlichen Massenbehandlung der betroffenen Bevölkerung mit dem Medikament Ivermectin. Trotz der erzielten Erfolge bleibt die Entwicklung einer effektiven Vakzine jedoch von großer Bedeutung (17). Hierfür ist die Identifizierung und Charakterisierung potentiell schutzvermittelnder Antigene entscheidende Voraussetzung.

Die Onchozerkose gilt, wie andere Filariosen auch, als eine spektrale Erkrankung, das heißt, Patienten reagieren individuell sehr unterschiedlich auf den Parasiten. Bestimmte pathologische Erscheinungsformen können dabei mit immunologischen Reaktionstypen korreliert werden (Tab. 1 [4]). Auf der einen Seite des Spektrums beobachten wir solche Personen, die auf den Parasiten mit starken, akut-entzündlichen pathologischen Veränderungen reagieren (Sowda). Auffälligerweise besitzen diese Patienten meist nur geringe Mikrofilarien (Mf)-Dichten in der Haut, sind zellimmunologisch aber hyperaktiv. Auf der anderen Seite des Reaktionsspektrums beobachten wir Patienten, die trotz hoher Mf-Dichten nur geringe pathologische Veränderungen an Haut und Augen aufweisen und die aufgrund ihrer zellulären Immunreaktivität als hyporeaktiv oder anerg charakterisiert werden. Außerdem finden wir in endemischen Gebieten auch immer wenige Personen, die Mf-negativ sind und keine pathologischen Erscheinungen aufweisen. Bei diesen exponierten Personen ist offenbar eine adäquate Immunantwort ausgeprägt, die den Parasiten erfolgreich eliminiert oder kontrolliert. Diese Personen werden daher auch als „vermeintlich immun“ oder als endemische Kontrollen bezeichnet.

Welche Parasitenantigene an der adäquaten Immunantwort dieser endemischen Kontrollen beteiligt sind, ist jedoch weitgehend unklar und deren Identifizierung dadurch erschwert, daß das komplexe Antigenmuster von *O. volvulus* in einer für zellimmunologische Untersuchungen geeigneten Weise fraktioniert werden muß. In der vorliegenden Arbeit wurde durch präparative Elektrophoresemethoden Gesamtproteinhomogenisat von *O. volvulus* in Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt und Antigene identifiziert, die bei endemischen Kontrollen distinkte Immunreaktionen induzieren und für den Mf-negativen Verlauf der Infektion in diesen Personen verantwortlich sein könnten.

Tabelle 1:

Klinische Manifestation und immunologisches Reaktionsmuster bei der Onchozerkose des Menschen (verändert nach [4]).

O. volvulus-Mikrofilariidermie	Klinische Manifestation	Immunologisches Reaktionsmuster
hoch	wenig Pathologie „Generalisierte Onchozerkose“	hyporeaktiv (tolerant/supprimiert)
keine	keine Pathologie	adäquate Immunantwort („vermeintlich immun“; „endemische Kontrollen“)
niedrig	schwere Pathologie „Sowda“	hyperreaktiv

#### Antigene und Antigenfraktionierung

Onchozerkome wurden unter Lokalanästhesie chirurgisch aus Patienten entfernt, die adulten Filarien durch Kollagenaseverdau isoliert (7) und in 10 mM Tris-HCl, pH 8 mit 1% NaDOC und Proteaseinhibitoren wie beschrieben homogenisiert (5). Die präparative SDS-PAGE von *O. volvulus*-Gesamtantigen (OvAg) wurde in 1 mm dicken Gelen in einer Horizontalgelelektrophoresekammer (Pharmacia/LKB, Freiburg, BRD) durchgeführt. OvAg mit einem Proteingehalt von 25 mg/ml wurde in Probepuffer (2% SDS, 32,5 mM Dithiothreitol und 6% Glycerin in 37,5 mM Tris-HCl, pH 8,8) fünf Minuten gekocht und mit einer Proteinmenge von 0,5 mg pro cm Gelta-sche auf ein Sammelgel mit 4,5% T aufgetragen. Die eigentliche Proteinauftrennung erfolgte in einem 7,5 bis 17,5% T Polyacrylamid-Porengradientengel über eine Trennstrecke von 9 cm. Anschließend wurden die separierten Proteine mit einem Blotelutor (Biometra, Göttingen, BRD) simultan in die Flüssigphase elektroeluiert. Hierzu wurde ähnlich wie beim Westernblotting im Semi-Dry-Verfahren eine Transfereinheit zwischen zwei Graphitelektroden aufgebaut, jedoch statt einer proteinbindenden Festphasenmembran eine flüssigkeitsgefüllte Lochplatte verwendet. Diese Platte war in Richtung Anode durch eine Dialysemembran und ein Unterlagel so abgedichtet, daß elektroeluierte Proteine in den flüssigkeitsgefüllten Löchern zurückgehalten wurden. Die Proteine wurden für 90 Minuten bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Transferfläche in 22 Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichtes übertragen. Fraktionen gleichen Molekulargewichtes aus drei bis vier präparativen Auftrennungen wurden anschließend vereinigt, zellschädigende Bestandteile durch Dialyse (Spectra/Por Dialyseschlauch, Ausschlußgrenze Mr 5000) entfernt und die Antigenfraktionen sterilfiltriert. Der Proteingehalt wurde durch den Bio-Rad Protein-Test nach Bradford bestimmt (Bio-Rad, München, BRD).

#### Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen und Zellkultur

Periphere mononukleäre Blutzellen (PMB) von Onchozerkosepatienten und endemischen Kontrollen wurden durch diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque (Pharmacia/LKB, Freiburg, BRD) aus heparinisiertem Vollblut isoliert. Die PMB wurden zweimal gewaschen und auf eine Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Für Lymphozytentransformationstests wurden jeweils 0,1 ml Zellsuspension mit  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI 1640, 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, supplementiert mit Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin B) und 10% hitzeinaktiviertem FCS in 96-Loch Zellkulturplatten (Costar, Cambridge, USA) verteilt. PMB wurden mit PHA (Endverdünnung 1 : 100; GIBCO/BRL, Eggenstein, BRD) polyklonal aktiviert oder mit Streptolysin-O (Endverdünnung 1 : 40, Fisher Scientific), PBS-löslichem OvAg (Endkonzentration 10 µg/ml) oder mit *O. volvulus*-Antigenfraktionen (Endverdünnung 1 : 10 und 1 : 50) wie bereits beschrieben stimuliert (14). Die antigenspezifische zelluläre Reaktivität wurde als Mittelwert von Dreifachansätzen minus dem Mittelwert von Kontrollansätzen ohne Antigen berechnet.

#### Patienten, Material und Methoden

##### Patienten und endemische Kontrollen

Patienten und endemische Kontrollen stammten aus Zentraltogo, einem Feuchtsavannengebiet mit endemischer Onchozerkose, in dem trotz langjähriger Aktivitäten des OCP ein hohes Infektions- und Erblindungsrisiko besteht (1). Bei 27 Ivermectin-unbehandelten Patienten mit generalisierter Onchozerkose wurden die *O. volvulus*-Mf-Dichte sowie Begleitparasitosen bestimmt und pro Patient 20 ml Blut entnommen. Die mittlere Mikrofilariidermie dieser Patienten betrug 20,2 Mf/mg Haut ( $X_{\max.} = 93,5$ ;  $X_{\min.} = 0,3$ ). Außerdem konnten 12 togoische Personen identifiziert werden, die Ivermectin-unbehandelt waren, keine klinischen Symptome einer Infektion mit *O. volvulus* aufwiesen, Mf-negativ waren und nachfolgend als endemische Kontrollen bezeichnet werden.

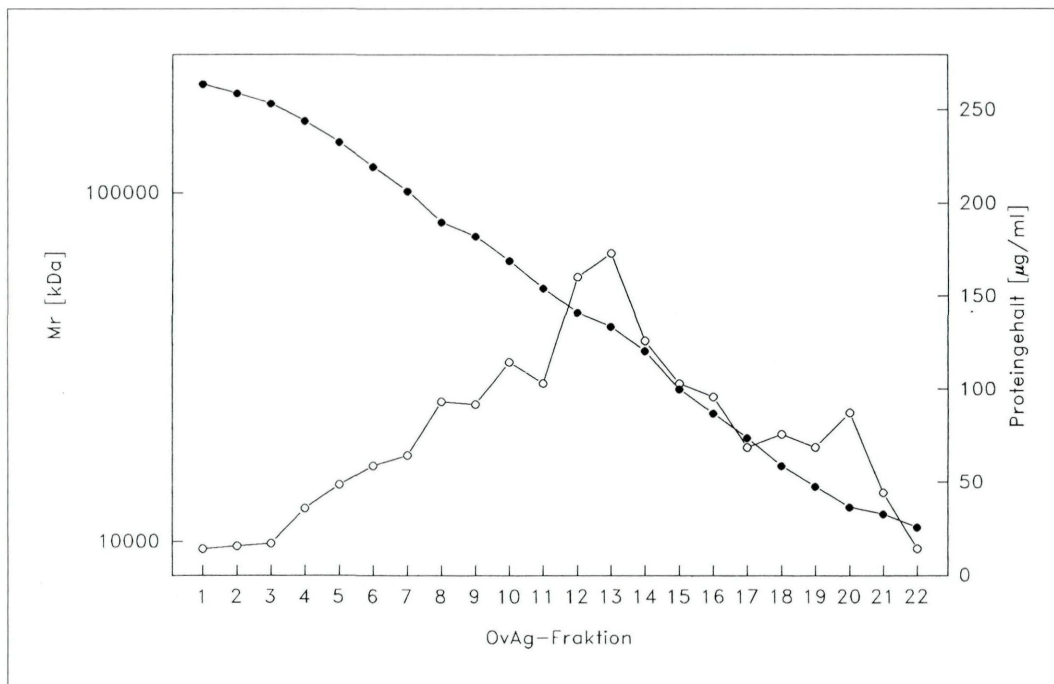


Abbildung 1:  
Mittlere relative Molekularmasse Mr (geschlossene Kreise) und Proteingehalt (offene Kreise) der *Onchocerca volvulus*-Einzelfrak-tionen. Adultwurmhomogenisat von *O. volvulus* wurde durch präparative SDS-Elektrophorese und Blotelution in 22 Einzelfrak-tionen aufgetrennt und anschließend dialysiert und sterilfiltriert. Die Mr der Antigenfraktionen wurde durch SDS-PAGE und Silberfärbung, der Proteingehalt durch den Bio-Rad-Test nach Bradford bestimmt.

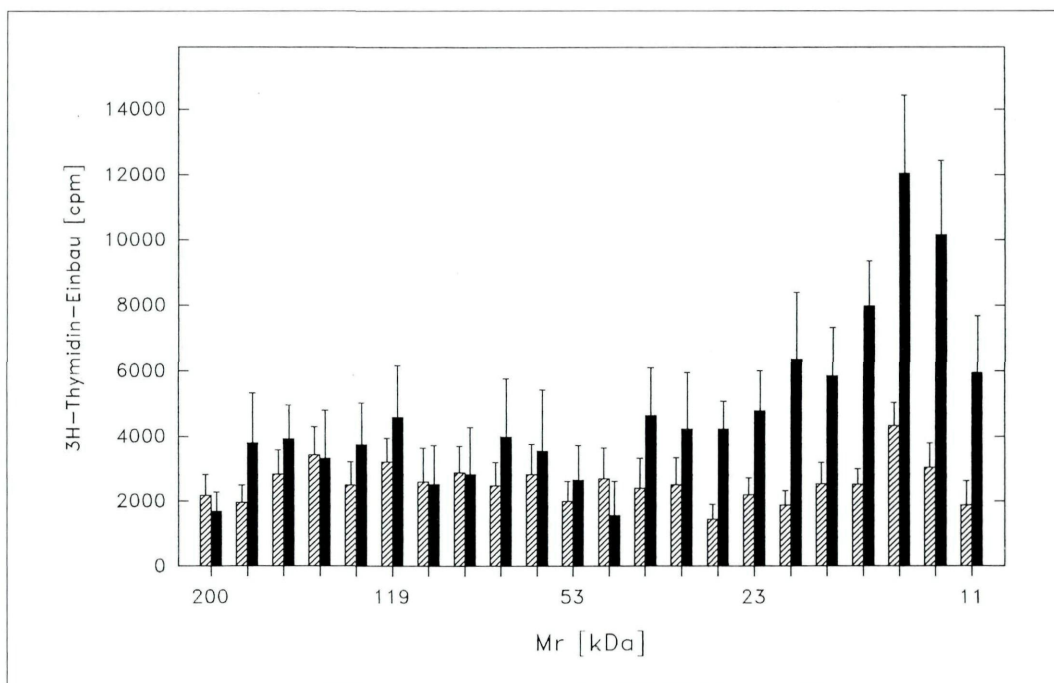


Abbildung 2:  
Zelluläre Reaktivität peripherer mononukleärer Blutzellen von Onchocerkosepatienten (n = 18, gestreifte Balken) und endemischen Kontrollpersonen (n = 9, schwarze Balken) nach in vitro-Stimulation mit *Onchocerca volvulus*-Antigenfraktionen mit kontinuierlich abnehmendem Molekulargewicht Mr. Die antigenspezifische zelluläre Reaktivität wurde als Mittelwert von Dreifachansätzen minus dem Mittelwert von Kontrollansätzen ohne Antigen berechnet. Die Balken stellen jeweils die mittlere cpm ± S. E. M. dar.

Zytokinbestimmungen in Kulturüberständen peripherer Blutzellen	Zur in vitro-Produktion von Zytokinen wurden pro Ansatz 1,0 bis $1,5 \times 10^6$ PMB ( $3 \times 10^6$ Zellen/ml) in RPMI 1640 (wie oben) und 2% FCS in 48-Loch-Zellkulturplatten (Costar) kultiviert und mit PHA (1 : 100), SL-O (1 : 40), 100 $\mu\text{g/ml}$ OvAg oder <i>O. volvulus</i> -Antigenfraktionen (1 : 10) für 48 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und der Zellkulturüberstand bei $-70^\circ\text{C}$ eingefroren.
<b>Ergebnisse</b>	Der quantitative Nachweis von Interleukin-2 erfolgte durch eine IL-2-IEMA (Dianova-Immunotech, Hamburg), die Bestimmung von Interferon- $\gamma$ durch einen humanspezifischen IFN- $\gamma$ -ELISA (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland). Die Konzentrationen von IL-5 und IL-10 wurden jeweils in „sandwich“-ELISAs mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (PharMingen, San Diego, USA) und einer parallel erstellten Standardkurve des jeweiligen Interleukins bestimmt (PharMingen). Alle Tests wurden entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt, wobei der Zytokingehalt der Proben jeweils durch Einfachbestimmung und der Gehalt der Standards durch Doppelbestimmung gemessen wurde.
Fraktionierung von <i>O. volvulus</i> -Gesamthomogenisat	Durch präparative SDS-Gelelektrophorese und anschließende Blotelution konnte das komplexe Proteinhomogenisat von <i>O. volvulus</i> in 22 Fraktionen mit kontinuierlich abnehmender relativer Molekularmasse (Mr) fraktioniert werden (Abb. 1). Fraktion 1 enthielt dabei hochmolekulare Antigene mit etwa 200 kDa, Fraktion 22 niedermolekulare Antigene, deren Mr nach Glycin-SDS-PAGE mit etwa 11 kDa bestimmt wurde. Die Proteinkonzentrationen der Einzelaktionen nach Dialyse und Sterilfiltration variierten erheblich. Sie betragen im nieder- und hochmolekularen Bereich etwa 15 $\mu\text{g/ml}$ , im mittleren Molekulargewichtsbereich dagegen bis zu 170 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 1).
Zelluläre Reaktivität von Onchozerkosepatienten und endemischen Kontrollen	PMB von Mf-positiven Onchozerkosepatienten und endemischen Kontrollen reagierten deutlich auf in vitro-Stimulation mit <i>O. volvulus</i> -Antigenfraktionen (Abb. 2). Das Reaktionsprofil unterschied sich jedoch auffällig zwischen Onchozerkosepatienten und endemischen Kontrollen. Mf-positive Personen reagierten auf alle Fraktionen mit einer relativ niedrigen Profilierung. PMB Mf-negativer endemischer Kontrollen profilieren auf Antigenfraktionen mit Mr 200 bis 30 kDa ebenfalls nur wenig, auf Antigene mit Mr < 30 kDa wurde jedoch eine signifikant erhöhte Reaktivität gemessen ( $p < 0,05$ ). Patienten und endemische Kontrollen unterschieden sich besonders auffällig bei der zellulären Reaktivität auf niedermolekulare <i>O. volvulus</i> -Antigene mit Mr 15 bis 11 kDa.
Zytokinproduktion nach in vitro-Stimulation	Zur funktionellen Charakterisierung der reaktiven Zellpopulationen wurde die Zytokinproduktion durch PMB von Patienten und endemischen Kontrollen nach Stimulation mit <i>O. volvulus</i> -Antigenfraktionen untersucht. Zellkulturüberstände Mf-positiver Onchozerkosepatienten enthielten nach Stimulation mit allen Antigenfraktionen kein IL-2, dagegen sezernierten periphere Blutzellen Mf-negativer endemischer Kontrollen besonders auf niedermolekulare Antigenfraktionen mit Mr < 20 kDa deutliche Mengen IL-2 (Tab. 2). Eine ähnliche Zytokinsekretion konnten wir bei der IFN- $\gamma$ -Produktion feststellen (Tab. 2). Onchozerkosepatienten produzierten nach Stimulation mit OvAg mittleren Molekulargewichts (Mr 25 bis 50 kDa) deutliche Mengen IFN- $\gamma$ mit Maximalwerten von 100 bis 130 $\text{pg/ml}$ . Dagegen wurde auf hoch- und vor allem niedermolekulare Antigene von <i>O. volvulus</i> nur eine geringe oder keine IFN- $\gamma$ -Produktion induziert. Im Gegensatz dazu produzierten periphere Blutzellen Mf-negativer endemischer Kontrollen nach Stimulation mit niedermolekularen <i>O. volvulus</i> -Antigenen mit Mr 11 bis 25 kDa die größten Mengen IFN- $\gamma$ und unterschieden sich damit auffällig von Mf-positiven Patienten. Vergleichbare Mengen IL-5 wurden von PMB von Patienten und endemischen Kontrollen nach Stimulation mit <i>O. volvulus</i> -Antigenfraktionen sezerniert. Beide Gruppen produzierten dabei am meisten IL-5 in Gegenwart niedermolekularer OvAg mit Mr < 20 kDa (Tab. 2). Obwohl die IL-10-Nettoproduktion (d. h. nach Subtraktion des Wertes vom Kontrollansatz ohne Antigen) in beiden Gruppen etwa gleich hoch war (Tab. 2), wurden große Unterschiede zwischen Patienten und endemischen Kontrollen bei der IL-10-Bruttoproduktion deutlich

Tabelle 2:

Produktion von IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-5 und IL-10 durch periphere mononukleäre Blutzellen von Onchozerkosepatienten und endemischen Kontrollen nach Stimulation in vitro mit *Onchocerca volvulus*-Antigenfraktionen der angegebenen relativen Molekularmassen Mr. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S. E. M. von Nettoproduktionsraten, d. h. die Produktion der entsprechenden Zytokine im Kontrollansatz ohne Antigen wurde jeweils subtrahiert.

		<i>Onchocerca volvulus</i> - Antigenfraktion						
		171 kDa	93 kDa	49 kDa	25 kDa	18 kDa	14 kDa	12 kDa
<b>IL-2 [pg/ml]</b>								
Patienten (n = 10)		< 0	< 0	< 0	< 0	< 0	< 0	< 0
Kontrollen (n = 3)		12,3 $\pm$ 14,8	3,6 $\pm$ 9,4	3,5 $\pm$ 17,1	19,4 $\pm$ 16,8	39,2 $\pm$ 26	76,9 $\pm$ 50,2	46,3 $\pm$ 19,8
<b>IFN-<math>\gamma</math> [pg/ml]</b>								
Patienten (n = 9)		3,5 $\pm$ 43,8	< 0	95,8 $\pm$ 52,5	132,1 $\pm$ 163,3	< 0	< 0	< 0
Kontrollen (n = 3)		194,2 $\pm$ 101,2	435,0 $\pm$ 244,9	384,3 $\pm$ 228,7	717,9 $\pm$ 584,0	575,0 $\pm$ 304,0	857,9 $\pm$ 504,3	746,3 $\pm$ 435,3
<b>IL-5 [pg/ml]</b>								
Patienten (n = 10)		11,7 $\pm$ 3,9	23,4 $\pm$ 16,8	5,5 $\pm$ 7,2	29,8 $\pm$ 16,4	47,3 $\pm$ 19,2	65,6 $\pm$ 29,6	48,8 $\pm$ 19,5
Kontrollen (n = 4)		30,6 $\pm$ 12,2	39,1 $\pm$ 21,2	24,9 $\pm$ 17,7	68,3 $\pm$ 36,2	74,6 $\pm$ 19,3	102,3 $\pm$ 32,5	103,6 $\pm$ 34,9
<b>IL-10 [pg/ml]</b>								
Patienten (n = 9)		158,2 $\pm$ 45,2	216,1 $\pm$ 82,2	376,4 $\pm$ 108,3	158,3 $\pm$ 74,9	58,0 $\pm$ 58,0	30,1 $\pm$ 47,7	< 0
Kontrollen (n = 4)		66,5 $\pm$ 24,2	173,4 $\pm$ 28,8	278,9 $\pm$ 54,2	176,7 $\pm$ 43,1	72,2 $\pm$ 35,9	57,8 $\pm$ 12,4	18,3 $\pm$ 14,2

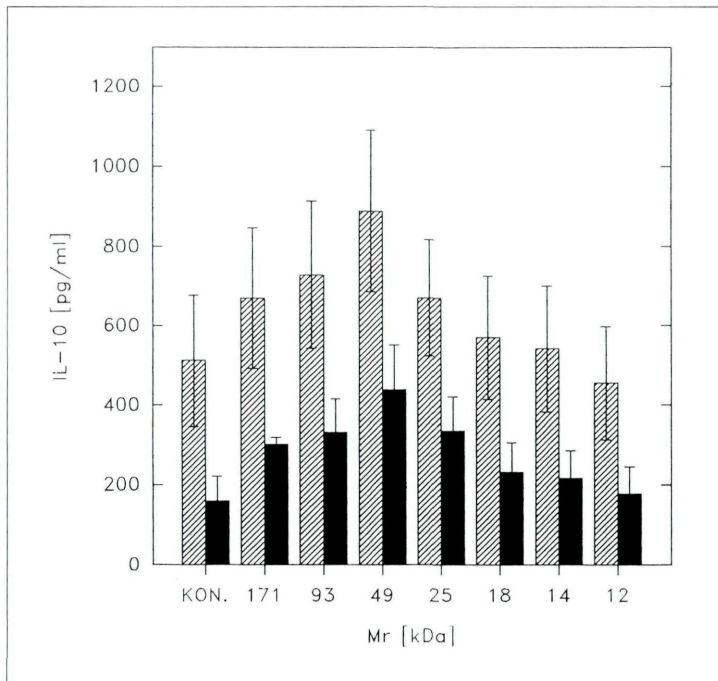


Abbildung 3:

Bruttoproduktion von IL-10 durch periphere mononukleäre Blutzellen von Onchozerkosepatienten (n = 9, gestreifte Balken) und endemischen Kontrollen (n = 4, schwarze Balken) nach Stimulation mit *Onchocerca volvulus*-Antigenfraktionen mit relativen Molekularmassen Mr wie angegeben oder nach in vitro-Kultur ohne Antigen (Kon.). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S. E. M.

(Abb. 3). Periphere Blutzellen Mf-positiver Patienten produzierten in Gegenwart aller OvAg-Fractionen zwei- bis dreimal mehr IL-10 als endemische Kontrollen. Diese erhöhte IL-10-Produktion war jedoch auch im Kontrollansatz ohne Antigenstimulanz festzustellen.

### Diskussion

Die Identifizierung und Charakterisierung potentiell schutzvermittelnder Antigene von *O. volvulus* bleibt wichtige Voraussetzung bei der Suche nach möglichen Vakzine-Kandidaten und trägt zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Parasit-Wirt-Interaktion entscheidend bei. Bisher wurden mit molekularbiologischen Techniken meist antikörperreaktive Proteine isoliert und bearbeitet, die mit Immunsereen von Onchozerkosepatienten oder mit experimentell hergestellten Immunsereen aus Genbanken isoliert wurden (10, 11). Diese Antigene konnten zwar zum Teil einen partiellen Immunschutz im Tiermodell induzieren, es bleibt jedoch fraglich, ob die natürliche Immunabwehr dadurch verstärkt werden kann (8, 13).

Die vorliegende Untersuchung stellt einen neuen Ansatz dar, der auf der Identifizierung von T-Zell-reaktiven *O. volvulus*-Antigenen basiert, die spezifisch von exponierten, aber Mf-negativen endemischen Kontrollpersonen erkannt werden. Diese „putatively immunes“ oder „endemic normals“ reagieren im Vergleich zu Mf-positiven Onchozerkose-

patienten mit einer deutlichen Zellproliferation und einer erhöhten IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion auf in vitro-Stimulation mit Parasitenantigenen (16, 14), eine anscheinend adäquate Immunantwort für die erfolgreiche Eliminierung bzw. Kontrolle der Parasitose. Mit unseren Arbeiten konnten wir zeigen, daß niedermolekulare Antigene von *O. volvulus* diese adäquate Immunantwort vermitteln können. OvAg mit Mr < 20 kDa, isoliert durch präparative SDS-PAGE und anschließende Blotelution, induzierten nicht nur eine signifikant höhere zelluläre Reaktivität in endemischen Kontrollen als in Mf-positiven Onchozerkosepatienten, sondern auch eine deutlich erhöhte IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion. Vergleichsweise niedrige Proliferationsraten und eine geringe Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  wurden dagegen sowohl in Patienten als auch in Kontrollpersonen durch Antigene hohen oder mittleren Molekulargewichtes induziert.

Die Identifizierung und Charakterisierung T-Zell-reaktiver Antigene aus komplexen Proteingemischen durch T-Zell-Immunblotting mit Hilfe proteinbindender Festphasenmembranen wurde für *Leishmania* ssp. und *Mycobacterium* ssp. beschrieben (9, 18). Die ein- oder zweidimensional aufgetrennten und an Nitrozellulosemembranen gebundenen Antigene sind allerdings nur schwer zu bearbeiten und können kaum reproduzierbar in Zellkulturen eingesetzt werden. In neueren Arbeiten wurden daher elektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch verschiedene Elutionsverfahren in Puffer übertragen, so daß die Proteinkonzentration variabel und die Antigene reproduzierbar eingesetzt werden konnten. Die von uns angewandte Methode ermöglicht die simultane Elektroelution von eindimensional aufgetrennten Proteinen in bis zu 22 Fraktionen oder von zweidimensional aufgetrennten Polypeptiden in bis zu 528 Einzelaktionen (3). Durch eindimensionale Elektrophorese und Blotelution konnten wir das komplexe Proteingemisch adulter *O. volvulus* in 22 Einzelaktionen kontinuierlich abnehmenden Molekulargewichtes auftrennen, und in ausreichender Menge bereitstellen, um Untersuchungen zur zellvermittelten Immunantwort an einer größeren Anzahl von Probanden durchzuführen. Darüberhinaus war es gelungen, das Adultwurmhomogenisat in einer Weise zu fraktionieren und aufzuarbeiten, daß die Antigenfraktionen reproduzierbar in der Zellkultur eingesetzt werden konnten und die Antigenlösungen trotz denaturierender Auftrennung durch SDS-PAGE keine zellschädigende Substanzen, wie z. B. SDS mehr enthielten.

Seit der Differenzierung der T-Helfer-Zellen in verschiedene Subpopulationen aufgrund der von ihnen sezernierten Zytokine (6) wird eine Immunantwort vom Th1- oder Th2-Typ als wichtige Determinante des klinischen Verlaufs verschiedener Parasitosen angesehen (2). Während Immunantworten vom Th1-Typ einen Schutz gegen intrazelluläre Parasiten vermitteln können, führen Reaktionen vom Th2-Typ zu einer Ausbreitung dieser Erreger im Wirt (2). Die Wirksamkeit einer Th1- oder Th2-Immunantwort wird bei Helminthosen dagegen kontrovers diskutiert (12, 15). In diesem Zusammenhang zeigen unsere Arbeiten, daß in exponierten, aber Mf-negativen Personen eine Immunantwort vom Th1-Typ durch niedermolekulare Antigene von *O. volvulus* induziert wird. Diese Immunabwehr könnte den Mf-freien Infektionsverlauf in endemischen Kontrollen vermitteln. Dagegen scheint in Mf-positiven Onchozerkosepatienten die übermäßige Produktion von IL-10, einem regulatorischen Zytokin vom Th2-Typ, zur zellulären Hyporeaktivität beizutragen.

Mit unseren Untersuchungen konnten wir durch T-Zell-Immunblotting niedermolekulare antigene Komponenten von *O. volvulus* identifizieren, die unterschiedlich ausgeprägte Immunantworten in Patienten und endemischen Kontrollen induzieren und so den klinischen Verlauf der Onchozerkose entscheidend beeinflussen könnten.

**Zusammenfassung** Die zellvermittelte Immunantwort gilt als wichtigste Determinante für den klinischen und parasitologischen Verlauf einer Infektion mit *Onchocerca volvulus*. So ist die zelluläre Reaktivität auf Parasitenantigenen bei Mf-positiven Patienten mit generalisierter Onchozerkose deutlich vermindert, während exponierte, aber Mf-negative endemische Kontrollpersonen in vitro eine starke zelluläre Reaktivität und eine erhöhte IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion aufweisen. Welche



Parasitenantigene an dieser anscheinend adäquaten Immunantwort beteiligt sind, ist weitgehend unklar, und die Identifizierung immunogener Antigene könnte einen Beitrag zur Charakterisierung protektiver Immunantworten liefern. In der vorliegenden Arbeit wurde *O. volvulus*-Adultwurmhomogenisat durch präparative SDS-PAGE und anschließende Blotelution in 22 Fraktionen mit kontinuierlich abnehmendem Molekulargewicht fraktioniert. In Lymphozytentransformationstests reagierten Mf-positive Onchocerkosepatienten auf alle OvAg-Fraktionen zwar deutlich, aber mit gleichbleibend niedriger Proliferation. Periphere mononukleäre Blutzellen (PMB) von Mf-negativen endemischen Kontrollen reagierten ebenfalls nur schwach auf Fraktionen mit Mr 30 bis 200 kDa, zeigten aber eine signifikant erhöhte Reaktivität auf niedermolekulare Antigene, insbesondere auf OvAg mit Mr 11 bis 15 kDa. Darüberhinaus induzierten niedermolekulare Antigene von *O. volvulus* die Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  bei endemischen Kontrollen, nicht jedoch bei Mf-positiven Patienten. PMB von Onchocerkosepatienten produzierten im Vergleich zu endemischen Kontrollen deutlich mehr IL-10, dies wurde jedoch nicht nur nach Stimulation mit Antigenfraktionen, sondern auch beim Kontrollansatz ohne Antigen festgestellt. Mit T-Zell-Immunblotting konnten wir niedermolekulare Antigene von *O. volvulus* identifizieren, die spezifisch in endemischen Kontrollen eine Th1-ähnliche Immunantwort induzieren und die möglicherweise für den Mf-freien Verlauf der Parasitose in diesen Personen verantwortlich sind.

**Schlüsselwörter** Onchocerkose, zelluläre Reaktivität, Zytokin, Antigenerkennung, T-Zell-Immunblotting, Elektroelution.

**Summary** *T-cell-immunoblotting: A new approach for the identification of immunodominant antigens of Onchocerca volvulus*

Parasite specific cellular responses are thought to determine the clinical and parasitological outcome of an infection with the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. Chronic onchocerciasis is associated with a depressed cellular immunity in microfilariae (mf)-positive patients. In contrast, exposed but mf-negative endemic controls demonstrate a vigorous cellular reactivity and an enhanced production of IL-2 and IFN- $\gamma$  in response to antigenic stimulation with *O. volvulus*. It is however unknown, by which antigens such an appropriate immune response is induced, and the identification of these molecules could contribute to the development of an effective vaccine. By preparative SDS-PAGE and electroelution we fractionated *O. volvulus* adult worm extract into 22 antigen fractions of continuously decreasing relative molecular mass (Mr 200 to 11 kDa). After dialysis and sterilifiltration, each antigenic fraction induced in vitro a considerable proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), however, cellular responses were relatively low in mf-positive onchocerciasis patients. In contrast, PBMC from mf-negative endemic normals disclosed a significantly enhanced ( $p < 0,05$ ) cellular reactivity to antigen fractions of Mr  $< 30$  kDa. Proliferative responses of patients and endemic controls differed most prominently after stimulation with OvAg of Mr 11 to 15 kDa. Moreover, only PBMC from mf-negative endemic controls secreted considerable amounts of IL-2 and IFN- $\gamma$  in response to antigenic stimulation with low molecular weight antigens of *O. volvulus*. Production of IL-5 was equally high in PBMC from both mf-positive and mf-negative individuals. In contrast, production of IL-10 was at least two times higher in onchocerciasis patients than in endemic controls, this cytokine production was induced by all antigenic fractions and observed in unstimulated control experiments as well. In conclusion, the Th1-type immune response to low molecular weight antigens of Mr 11 to 25 kDa as observed in endemic controls may effectively eliminate invading parasites or control already established infections. Thus, T-cell-immunoblotting is suitable for the identification of T-cell-reactive immunodominant protective antigens of *O. volvulus*.

**Key words** Onchocerciasis, cellular reactivity, cytokine, antigen recognition, T-cell-immunoblotting, electroelution.

**Danksagung** Den togoischen Mitarbeitern, insbesondere Dr. med. Meba Banla und den technischen Assistenten vom Centre Hospitalier de la Région Centrale in Sokodé möchten wir für ihre verlässliche Hilfe besonders danken. Diese Studie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Kn 244/3-1), der Kommission der Europäischen Gemeinschaft (TS3-CT92-0057), der Deutschen Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (Soins de Santé Primaires, Région Centrale, Togo) und dem Gesundheitsministerium der Republik Togo unterstützt.

### Literatur

1. DE SOLE, G. et al. (1991):  
Distribution and severity of onchocerciasis in southern Benin, Ghana and Togo.  
*Acta Tropica* 52, 87-97.
2. FINKELMAN, F. D., URBAN, J. F. (1992):  
Cytokines: Making the right choice.  
*Parasitol. Today* 8, 311-314.
3. GULLE, H., SCHOEL, B., KAUFMANN, S. H. E. (1990):  
Direct blotting with viable cells of protein mixtures separated by two-dimensional gel electrophoresis.  
*J. Immunol. Methods* 133, 253-261.
4. KING, C. L., NUTMAN, T. B. (1991):  
In: Ash, C., Gallagher, R. B. (Hrsg.): *Immunoparasitology Today*.  
Regulation of the immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis, A54-A58.  
Elsevier Trend Journals, Cambridge.
5. LÜDER, C. G. K. et al. (1993):  
Experimental onchocerciasis in chimpanzees: cellular responses and antigen recognition after immunization and challenge with *Onchocerca volvulus* infective third-stage larvae.  
*Parasitology* 107, 87-97.
6. MOSMAN, T. R., CHERWINSKY, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A., COFFMAN, R. L. (1986):  
Two types of helper T cell clones. I. Definition according to the profiles of lymphokine activities and secreted proteins.  
*J. Immunol.* 136, 2348-2357.
7. SCHULZ-KEY, H., ALBIEZ, E. J., BÜTTNER, D. W. (1977):  
Isolation of living adult *Onchocerca volvulus* from nodules.  
*Tropenmed. Parasitol.* 28, 428-430.
8. SCHULZ-KEY, H., SOBOSLAY, P. T. (1994):  
Reproductive biology and population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the vertebrate host.  
*Parasite* 1 (Suppl.), 53-55.
9. SCOTT, P., NATOVITZ, P., COFFMAN, R. L., PEARCE, E., SHER, A. (1988):  
Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens.  
*J. Exp. Med.* 168, 1675-1684.
10. SEEBER, F. et al. (1993):  
Characterization of a recombinant T cell and B cell reactive polypeptide of *Onchocerca volvulus*.  
*J. Immunol.* 150, 2931-2944.
11. SELKIRK, M. E., MAIZELS, R. M., YAZDANBAKHSI, M. (1992):  
Immunity and the prospects for vaccination against filariasis.  
*Immunobiol.* 184, 273-281.
12. SHER, A. et al. (1992):  
Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection.  
*Immunol. Rev.* 127, 183-204.
13. SOBOSLAY, P. T., SCHULZ-KEY, H., LUCIUS, R. (1994):  
In: Rölinghoff, M., Rommel, M. (Hrsg.): *Immunologische und molekulare Parasitologie*, 215-237.  
Gustav Fischer Verlag, Jena.
14. SOBOSLAY, P. T. et al. (1994):  
Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis; activation of parasite-specific Th 1-type responses with subclinical *Onchocerca volvulus* infection.  
*Clin. Exp. Immunol.* 96, 238-244.



15. URBAN, J. F. et al. (1992):  
The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes.  
*Immunol. Rev.* 127, 205- 220.
16. WARD, D. J. et al. (1988):  
Onchocerciasis and immunity in humans: Enhanced T cell responsiveness to parasite antigen in putatively immune individuals.  
*J. Infect. Dis.* 157, 536-543.
17. WHO (1987):  
WHO Expert Committee on Onchocerciasis, Third Report.  
Technical Report Series 752, WHO, Genf.
18. YOUNG, D. B., LAMB, J. R. (1986):  
T lymphocytes respond to solid-phase antigen: a novel approach to the molecular analysis of cellular immunity.  
*Immunology* 59, 167-171.

**Korrespondenzadresse:** Carsten G. K. Lüder  
Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen  
Wilhelmstraße 27  
D-72074 Tübingen · Bundesrepublik Deutschland



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://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: 1995

Band/Volume: [17](#)

Autor(en)/Author(s): Lüder Carsten G. K., Soboslay P. T., Schulz-Key Hartwig

Artikel/Article: [T-Zell Immunblotting - Ein neuer Ansatz zur Identifizierung potentiell schutzvermittelnder Antigene von Onchocerca volvulus. 143-152](#)