

### 3.4.3.2. Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die Zytokinproduktion polyklonal stimulierter, humaner PBMC

*C. elegans*-Cystatine supprimieren die Proliferation polyklonal stimulierter, humaner PBMC nur geringfügig, im Gegensatz zu einer starken Suppression durch das Cystatin der humanpathogenen Filarie *O. volvulus*. rOv17 induziert dabei in polyklonal stimulierten, humanen PBMC eine verstärkte IL-10-Produktion (Schönemeyer et al., 2001). So war es interessant, inwieweit rCysele1 und rCysele2 einen Einfluß auf die Zytokinproduktion von polyklonal stimulierten PBMC hatten.

PBMC wurden aus humanem Blut durch Dichtegradzentrifugation mittels Ficoll gewonnen und in einer Zahl von  $3,5 \times 10^5$  Zellen je Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausplattiert. In die entsprechenden Ansätze wurden rCysele1, rCysele2, rOv17 und rOv33 in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M hinzugefügt. Die Zellen wurden mit anti-CD3-Antikörpern in einer Konzentration von 100 ng / ml stimuliert. Nach 6 h wurde TNF- $\alpha$ , nach 24 h wurden IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 und IL-12p40 in den Überständen der Zellkulturen im ELISA bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Abb.19 und 20 dargestellt.

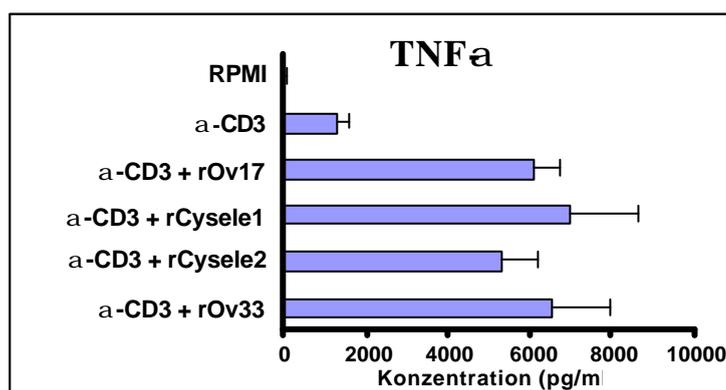
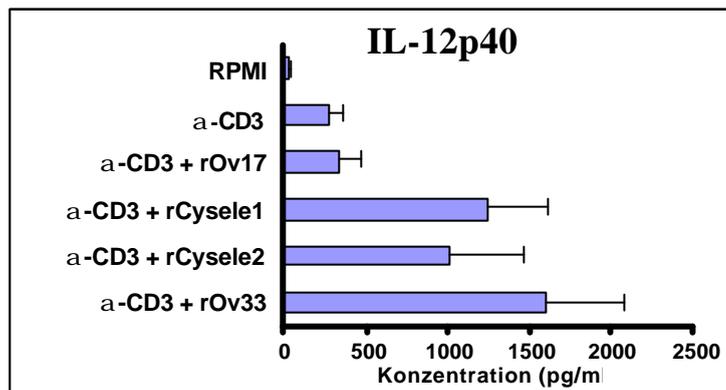
Bezogen auf die anti-CD3-Ak-Kontrolle wurde die Bildung von IL-12p40 durch rCysele1 durchschnittlich auf das 4,3-fache ( $p = 0,001$ ) erhöht, durch rCysele2 auf das 3,6-fache ( $p = 0,001$ ), durch rOv17 durchschnittlich auf das 1,25-fache und durch rOv33 auf das 5,5-fache ( $p = 0,001$ ). Bezieht man die Werte auf rOv33, inhibierten rCysele1 die Produktion von IL-12p40 durchschnittlich um 21,3 %, rCysele2 um 34,6 % und rOv17 um 77 % ( $p = 0,001$ ) (Abb.19).

Die TNF- $\alpha$ -Produktion wurde durch die rekombinanten Cystatine und durch rOv33 gegenüber der anti-CD3-Ak-Kontrolle um das ca. Vier- bis Fünffache erhöht ( $p = 0,001$ ). Gegenüber rOv33 veränderten rCysele1, rCysele2 und rOv17 die TNF- $\alpha$ -Produktion nur geringfügig (Abb.19).

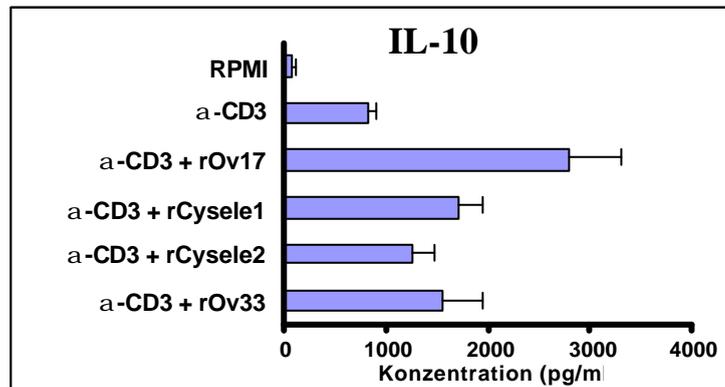
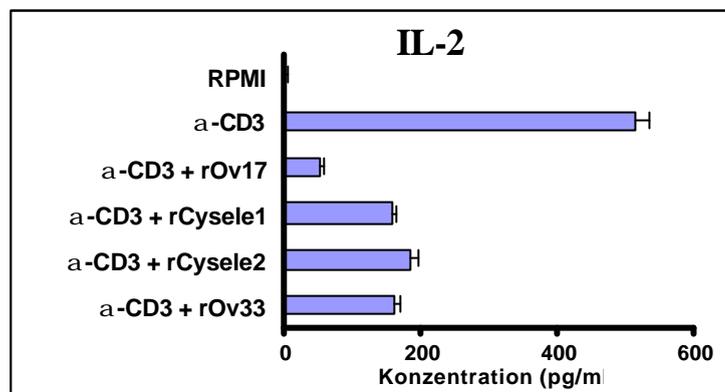
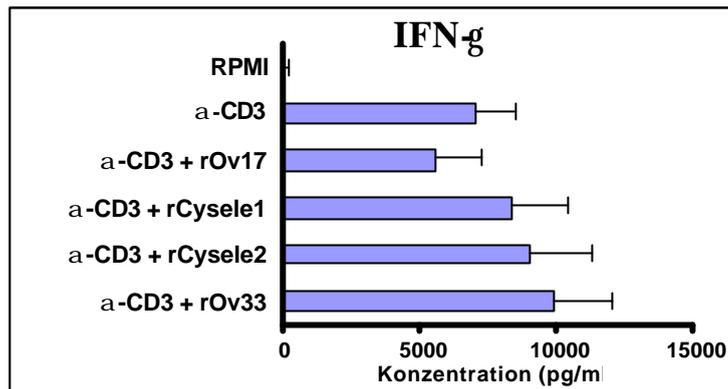
Gegenüber der anti-CD3-Ak-Kontrolle wurde die Produktion von IFN- $\gamma$  durch rCysele1 im Durchschnitt um 20,5 % ( $p = 0,05$ ) erhöht, durch rCysele2 um 22,3 % und durch rOv33 um 45 %. Durch rOv17 wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion um 26,5 % gesenkt. Gegenüber rOv33 senkten rCysele1 die Produktion von IFN- $\gamma$  im Durchschnitt um 17 %, rCysele2 um 15,7 % ( $p = 0,05$ ) und rOv17 um 49,3 % ( $p = 0,001$ ) (Abb.20).

Die Produktion von IL-10 wurde gegenüber der anti-CD3-Ak-Kontrolle durch rCysele1 im Durchschnitt verdoppelt ( $p = 0,001$ ), durch rCysele2 auf das 1,75-fache, durch rOv17 auf das 3,5-fache ( $p = 0,05$ ) und durch rOv33 auf das 1,8-fache ( $p = 0,001$ ) erhöht. Gegenüber rOv33 stimulierten rCysele1 die Produktion von IL-10 im Durchschnitt um 10,1 % und rOv17 um 79,4 % ( $p = 0,05$ ). rCysele2 inhibierte die IL-10-Produktion um 7,4 % (Abb.20).

Die IL-2-Produktion wurde gegenüber der anti-CD3-Ak-Kontrolle durch rCysele1 im Durchschnitt um 69,4 % ( $p = 0,001$ ) gehemmt, durch rCysele2 um 63,9 % ( $p = 0,001$ ), durch rOv17 um 90,0 % ( $p = 0,001$ ) und durch rOv33 um 68,8 % ( $p = 0,001$ ). Gegenüber rOv33 hemmten rCysele1 die Produktion von IL-2 im Durchschnitt um 1,8 % und rOv17 um 68 % ( $p = 0,001$ ). rCysele2 stimulierte die IL-2-Produktion um 15,8 % (Abb.20).



**Abb.19: Zytokinproduktion von humanen PBMC unter dem Einfluß von rCysele1 und rCysele2.** Humane PBMC wurden *in vitro* mit 100 ng / ml anti-CD3-Antikörpern stimuliert und mit 0,5  $\mu$ M rCysele1, rCysele2, rOv17 und rOv33 über 24 h inkubiert. Nach 6 h wurden die Kulturüberstände für die TNF- $\alpha$ -Bestimmung, nach 24 h für die IL-12p40-Bestimmung abgenommen und im ELISA eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Ergebnissen von jeweils 6 Spendern  $\pm$  SEM.

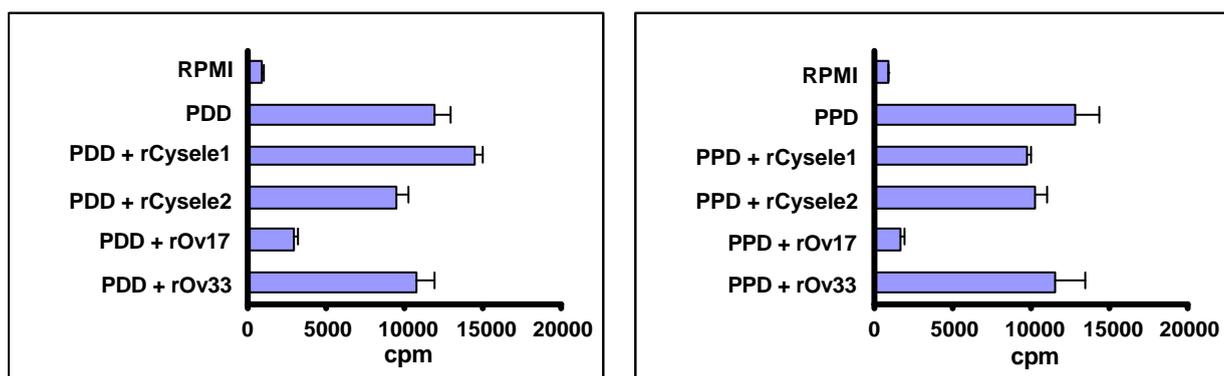


**Abb.20: Zytokinproduktion von humanen PBMC unter dem Einfluß von rCysele1 und rCysele2.** Humane PBMC wurden *in vitro* mit 100 ng / ml anti-CD3-Antikörpern stimuliert und mit 0,5  $\mu$ M rCysele1, rCysele2, rOv17 und rOv33 über 24 h inkubiert. Nach 24 h wurden die Kulturüberstände abgenommen und zur Zytokinbestimmung im ELISA eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Ergebnissen von jeweils 8 Spendern  $\pm$  SEM.

### 3.4.3.3. Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die Proliferation PPD-stimulierter, humaner PBMC

Durch rCysele1 und rCysele2 wurde die polykonal stimulierte Proliferation humaner PBMC nicht beeinflusst. Deshalb war es interessant, ob eine antigenspezifische Proliferation durch die *C. elegans*-Cystatine beeinflusst werden würde. So wurde der Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die Proliferation mit PPD stimulierter, humaner PBMC untersucht. Dabei wurde die Methode entsprechend von Baehr et al. (2001) angewandt.

PBMC wurden aus humanem Blut freiwilliger, gesunder, PPD-sensitiver Spender durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll gewonnen und in einer Anzahl von  $3,5 \times 10^5$  Zellen je Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausplattiert. rCysele1, rCysele2, rOv17 und rOv33 wurden in einer Konzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  hinzugefügt. Zur Hemmung der Basisproliferation und Verstärkung der antigenspezifischen Proliferation wurde in jedes Loch IFN- $\alpha$  in einer Endkonzentration von 125 U / ml zugesetzt. Die Zellen wurden mit PPD in einer Konzentration von 200 IE / ml über 96 h stimuliert. Gemessen wurde die Proliferation der PBMC über den Einbau von radioaktivmarkiertem  $^3\text{H}$ -Thymidin während der letzten 20 h der Proliferation. Die Ergebnisse sind in Abb.21 dargestellt. rCysele1 inhibierte die Proliferation im Durchschnitt um 1,2 %, rCysele2 um durchschnittlich 20,2 %, rOv17 um 81 % und rOv33 um 9,4 % gegenüber der PPD-Kontrolle. Wird rOv33 als Bezugspunkt gewählt, inhibierte rCysele2 die Proliferation durchschnittlich um 12 % und rOv17 um 78,9 %. rCysele1 stimulierte die Proliferation um 9 % gegenüber der rOv33-Kontrolle.



**Abb.21: Proliferation von humanen PBMC unter dem Einfluß von rCysele1 und rCysele2.** Humane PBMC wurden *in vitro* mit 200 IE / ml PPD stimuliert und mit  $0,5 \mu\text{M}$  rCysele1, rCysele2, rOv17 und rOv33 über 96 h inkubiert. Die Proliferation wurde über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin während der letzten 20 h in die DNA der proliferierenden Zellen gemessen. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von einzelnen Spendern. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, die aus Dreifachbestimmungen berechnet wurden.

### 3.5. Studien zur Ausscheidung von Cysele1 und Cysele2 durch *C. elegans*

Ziel der Untersuchung war die Quantifizierung der beiden *C. elegans*-Cystatine in Wurmhomogenisaten einzelner Entwicklungsstadien sowie im Kulturüberstand einer Gemischtflüssigkultur.

Synchronisierte *C. elegans*-Kulturen wurden angelegt. Die einzelnen Entwicklungsstadien wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet, die Würmer homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde der Cystatingehalt in den Überständen der Wurmhomogenisate mittels ELISA gemessen.

In allen Entwicklungsstadien konnten Cysele1 und Cysele2 nachgewiesen werden. Dabei war die nachgewiesene Menge an beiden Cystatinen bezogen sowohl auf jeweils ein Individuum als auch auf die Masse eines Wurmes in adulten Würmern am höchsten. Die Menge an nachgewiesenem Cysele1 war in allen Entwicklungsstadien höher als die Menge an nachgewiesenem Cysele2.

Die Proteine von Überständen von *C. elegans*-Gemischtflüssigkulturen wurden gefällt und in 1 x PBS gelöst. Durch ELISA wurde die Cystatinkonzentration in den Überständen der Gemischtflüssigkulturen ermittelt. Cysele1 und Cysele2 konnten nachgewiesen werden. Die Menge an nachgewiesenem Cysele1 war in den Gemischtflüssigkulturen höher als die Menge an nachgewiesenem Cysele2.

Genauere Daten sind der Studienjahresarbeit von Susanne Nitzsche zum Thema „Quantifizierung der Ausscheidung von *C. elegans*-Cystatin 1 und *C. elegans*-Cystatin 2“ (2001) zu entnehmen.

### 3.6. RNAi bei *C. elegans*

Durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ist es möglich, die Expression der zu dieser RNA homologen Proteine in Zellen zu verhindern (Fire et al., 1998; Montgomery et al., 1998). Dieser Vorgang wird als RNA interference (RNAi) bezeichnet. Wird dsRNA in *C. elegans* in den Bereich der Gonaden injiziert, verteilt sich die dsRNA und der RNAi-Effekt ist im gesamten Organismus zu beobachten (Timmons und Fire, 1998). Betroffen vom Effekt ist ebenfalls die F1-Generation, nur in Ausnahmefällen die F2-Generation (Montgomery et al., 1998). Aufgrund der Blockierung der Proteinexpression durch RNAi lassen sich Funktionen gezielt ausgesuchter Proteine aufzeigen.

DsRNA wurde ausgehend von den *C. elegans*-Cystatinsequenzen der Klonierungsvektoren aus 3.1.2. hergestellt. Zwölf L4 (Gruppe dsCysele1 / 2 a-d) von *C. elegans* wurden mit ca. 5 nl dsRNA der Kombination von Cysele1 + Cysele2 in einer Konzentration von 100 ng /  $\mu$ l injiziert. Eine Kombination der beiden Cystatine wurde gegenüber den einzelnen Cystatinen bevorzugt, da ausgeschlossen werden sollte, daß der Funktionsausfall bei Wegfall eines Cystatins durch das andere Cystatin kompensiert werden würde. Als Positivkontrolle dienten 12 L4, mit der dsRNA des Gens Y45 injiziert (Gruppe Y45 a-d). RNAi von Y45 führt zum embryonalen Tod, aus den Eiern schlüpfen keine L1. Als Negativkontrolle dienten 9 L4, die mit 1 x Injektionspuffer (1 x IB) injiziert wurden (Gruppe 1 x IB a-c). Die so behandelten L4 wurden auf mit *E. coli* (OP50) besiedelte NGM-Platten gebracht, OP50 dienten als Nahrung der *C. elegans*. Die Platten wurden bei 25 °C gelagert. Nach 19 h wurden die nun adulten *C. elegans* in Dreiergruppen auf neue, mit OP50 besiedelte NGM-Platten gebracht. Die Platten der ersten 19 h wurden verworfen, da davon auszugehen war, daß ein Großteil der F1-Generation der ersten Stunden nicht durch RNAi beeinflusst worden war. Nach 25 h wurden die *C. elegans* erneut auf mit OP50 besiedelte NGM-Platten überführt. Nach 45 h wurden die injizierten *C. elegans* entfernt. Die Platten aus den einzelnen Zeitintervallen wurden bei 25 °C gelagert und regelmässig kontrolliert. Im Nachkommentest wurde eingeschätzt, ob bei der zu untersuchenden F1-Generation L1 aus den Eiern schlüpfen, die F1-Generation sich bis zu Adulten weiterentwickelte und Eier produzierte. Durch Sektion wurde die Entwicklung von F2-Embryonen eingeschätzt. Im Western-Blot wurde gezeigt, inwieweit die Expression der untersuchten Proteine in *C. elegans* vermindert oder unterbunden wurde.

### 3.6.1. Nachkommentest

Die von den in Dreiergruppen zusammengefaßten, injizierten *C. elegans* über ein entsprechendes Zeitintervall abgegebenen Eier wurden gezählt. Der Schlupf der F1-Generation und deren Weiterentwicklung wurden beobachtet. Nachdem die F1-Generation der Kontrollgruppe embryonierte Eier ausschied, wurden die Beobachtungen abgebrochen und die Ergebnisse der einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Die Ergebnisse des Versuches sind in Tab.3 dargestellt.

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß sich sowohl die Eizahl, von den injizierten *C. elegans* abgegeben, als auch die Weiterentwicklung der injizierten Würmer und der F1-

Generation nicht von der Negativkontrolle unterschieden, so daß kein Einfluß der RNAi von Cysele1 in Kombination mit Cysele2 vermutet wird.

Gruppe	Anzahl der injizierten Würmer	Anzahl der Eier zwischen 19. h und 25. h	Anzahl der geschlüpften Larven der F1- Generation	Entwicklung der F1- Generation bis Adult	F1- Generation legt Eier
dsCysele1 / 2 a	3	82	alle	normal	ja
dsCysele1 / 2 b	3	103	alle	normal	ja
dsCysele1 / 2 c	3	17	alle	normal	ja
dsCysele1 / 2 d	3	73	alle	normal	ja
dsY45 a	3	50	0		
dsY45 b	3	89	0		
dsY45 c	3	52	0		
dsY45 d	3	26	0		
1 x IB a	3	24	alle	normal	ja
1 x IB b	3	107	alle	normal	ja
1 x IB c	3	45	alle	normal	ja

## A

Gruppe	Anzahl der injizierten Würmer	Anzahl der Eier zwischen 19. h und 25. h	Anzahl der geschlüpften Larven der F1- Generation	Entwicklung der F1- Generation bis Adult	F1- Generation legt Eier
dsCysele1 / 2 a	3	145	alle	normal	ja
dsCysele1 / 2 b	3	170	130	normal	ja
dsCysele1 / 2 c	3	57	alle	normal	ja
dsCysele1 / 2 d	3	161	alle	normal	ja
dsY45 a	3	87	0		
dsY45 b	3	123	0		
dsY45 c	3	150	15	normal	ja
dsY45 d	3	30	0		
1 x IB a	3	147	alle	normal	ja
1 x IB b	3	196	alle	normal	ja
1 x IB c	3	67	alle	normal	ja

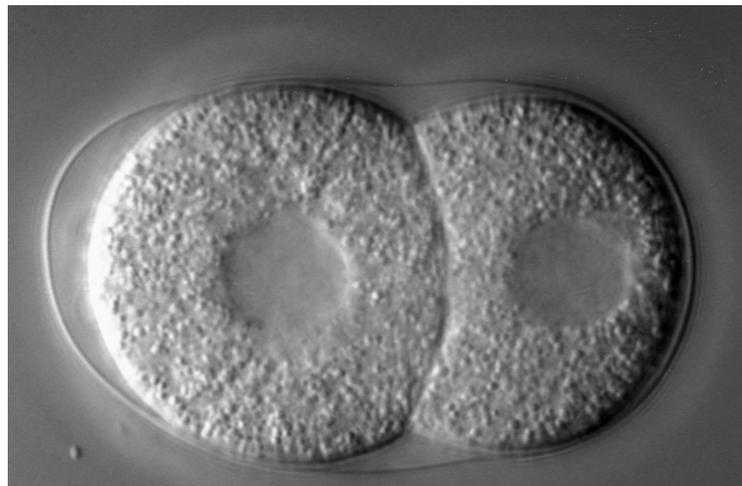
## B

**Tab.3: RNAi bei *C. elegans* mit Cysele1 in Kombination mit Cysele2.** L4 von *C. elegans* wurden mit dsRNA injiziert. Die über den Zeitraum von 19. – 25. h (A) und 25. – 45. h (B) abgegebenen Eier wurden bei 25 °C inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen auf Schlupf der L1, Weiterentwicklung zu Adulten und Eiabgabe durch die F1-Generation kontrolliert. Tiere der Gruppen dsCysele1 / 2 wurden mit dsRNA von Cysele1 in Kombination mit Cysele2 injiziert, Tiere der Gruppen dsY45 wurden mit dsRNA des Gens Y45 injiziert (Positivkontrolle), Tiere der Gruppen 1 x IB wurden mit 1 x Injektionspuffer injiziert (Negativkontrolle).

### 3.6.2. Sektion von *C. elegans*

Bei der Sektion werden adulte *C. elegans* der F1-Generation mit Hilfe von Injektionskanülen aufgerissen, die so freigesetzten embryonierten Eier (F2-Generation) werden unter dem Mikroskop betrachtet und deren Entwicklungszustand eingeschätzt.

In Abb.22 ist ein embryoniertes Ei (F2-Generation) unter dem Einfluß der RNAi von Cysele1 in Kombination mit Cysele2 abgebildet. Durch RNAi von Cysele1 in Kombination mit Cysele2 wurde die Embryonalentwicklung der F2-Generation nicht beeinträchtigt.



**Abb.22: RNAi mit Cysele1 in Kombination mit Cysele2.** L4 von *C. elegans* wurden mit dsRNA von Cysele1 + Cysele2 injiziert. Die embryonierten Eier (gebildet durch die F1-Generation) wurden unter dem Mikroskop hinsichtlich ihres Entwicklungszustandes eingeschätzt. Die Entwicklung der embryonierten Eier (F2-Generation) der mit dsRNA von Cysele1 + Cysele2 injizierten Tiere unterschied sich nicht von der Negativkontrolle.

### 3.6.3. Überprüfung der Expression von Cysele1 und Cysele2 in L4 der F1-Generation von dsRNA-injizierten *C. elegans*

Ziel war es, zu überprüfen, ob durch Injektion von dsRNA von Cysele1 in Kombination mit Cysele2 die Expression der beiden Proteine unterbunden wurde. Dazu wurde zuerst untersucht, wieviele L4 einer Negativkontrollgruppe für ein Wurmhomogenisat genutzt werden müssen, damit Cysele1 und Cysele2 in diesem Homogenisat durch Western-Blot nachgewiesen werden können.

In *C. elegans* war der Nachweis von Cysele1 durch Western-Blot schon in einer Proteinlösung aus 10 L4 deutlich möglich (siehe Abb.23). Cysele2 konnte selbst in einem

Homogenisat aus 50 L4 durch Western-Blot nicht detektiert werden. So konnte nur eine Veränderung der Expression von Cysele1 untersucht werden. Eine Anzahl aus 50 L4 wurde als ausreichend eingestuft, um eine Veränderung der Expression nachzuweisen. Jeweils 50 L4 der mit dsRNA injizierten *C. elegans* und 50 L4 der Negativkontrollgruppe wurden in 10  $\mu$ l Probenpuffer überführt und bei 99 °C 5 min inkubiert. Das gesamte Volumen wurde auf ein 16 %iges SDS-Polycrylamidgel aufgetragen. Das Ergebnis des Western-Blot ist in Abb.24 dargestellt. Durch RNAi von Cysele1 in Kombination mit Cysele2 konnte in den L4 die Expression von Cysele1 um ca. 70 % vermindert werden.



**Abb.23: Western-Blot zum Nachweis von Cysele1 in *C. elegans*.** Es wurde bestimmt, wieviele *C. elegans* in einem Western-Blot eingesetzt werden müssen, um Cysele1 in einem Wurmhomogenisat nachzuweisen.

- 1: Gesamtproteinmenge aus 10 adulten Würmern.
- 2: Gesamtproteinmenge aus 20 adulten Würmern.
- 3: Gesamtproteinmenge aus 50 adulten Würmern.
- 4: Gesamtproteinmenge aus 100 adulten Würmern.
- 5: Gesamtproteinmenge aus 200 adulten Würmern.
- 6: Negativkontrolle (*E. coli*).



**Abb.24: Western-Blot zum Nachweis der RNAi von Cysele1 in *C. elegans*-L4 (F1-Generation).** Jeweils die Wurmlysate von 50 L4 wurden pro Spur aufgetragen.

- 1: L4, mit 1 x IB injiziert.
- 2: L4, mit dsRNA von Cysele1 in Kombination mit Cysele2 injiziert.
- 3: Negativkontrolle (*E. coli*).