

1. Einleitung

1.1. *Caenorhabditis elegans*

1.1.1. *C. elegans* als Modellobjekt

Der Nematode *C. elegans* ist geographisch weit verbreitet, er lebt in den gemäßigten Klimazonen im Boden und ernährt sich von Mikroorganismen. Das Genom von *C. elegans* wurde 1998 durch das *C. elegans*-Genomprojekt komplett entschlüsselt (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Verschiedene Gründe waren ausschlaggebend, daß *C. elegans* zum Modellobjekt wurde. Die Würmer besitzen eine geringe Größe, Adulte sind ca. 1mm lang. Sie sind leicht im Labor auf mit Bakterien besiedelten Agarplatten zu halten und haben demzufolge einen geringen Platzbedarf. Adulte sind entweder Hermaphroditen mit einer exakten Gesamtzellzahl von 959 oder seltener Männchen mit einer Gesamtzellzahl von exakt 1031. Die Nachkommen der Hermaphroditen sind ebenfalls ausschließlich Hermaphroditen. Wegen dieser Eigenschaft ist *C. elegans* eines der Modellorganismen der Genetik (Brenner, 1974). Aufgrund des Entwicklungszyklus werden in kürzester Zeit hohe Individuenzahlen erzielt. Durch Synchronisation können eine große Zahl von *C. elegans* in einen gleichen Entwicklungsrhythmus gebracht werden. In Abb.1 ist der Aufbau eines adulten *C. elegans* dargestellt.

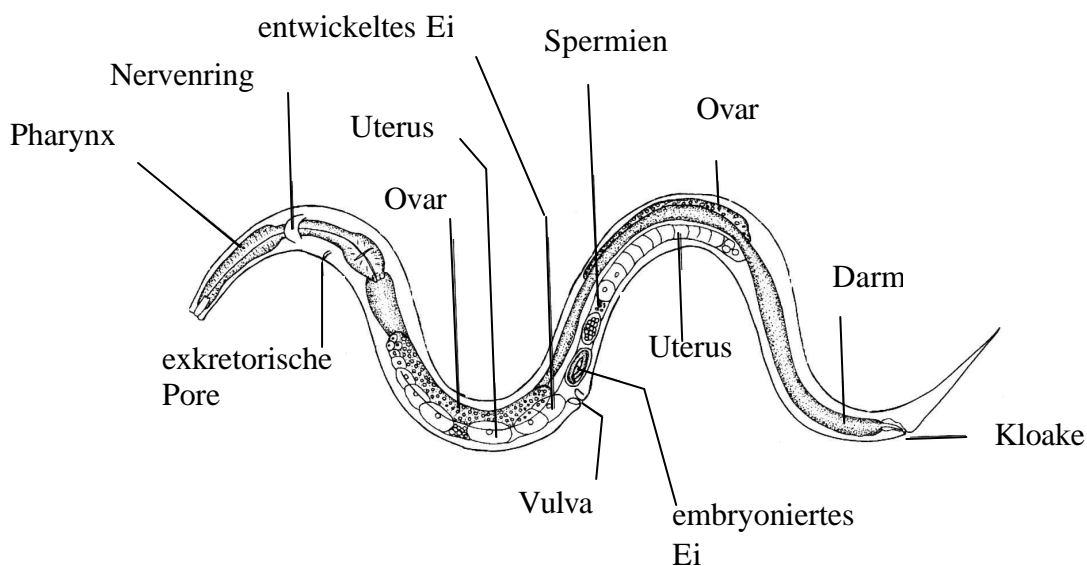


Abb.1: Aufbau eines adulten *C. elegans* (Nicholas, 1998).

1.1.2. Entwicklungszyklus von *C. elegans*

Der Entwicklungszyklus ist in Abb.2 dargestellt. Die Entwicklung von *C. elegans* ist unabhängig von einem Wirt / Zwischenwirt. *C. elegans* geben während ihrer bei 20 °C ca. zweiwöchigen Lebensdauer 300 embryonierte Eier ab. Aus diesen schlüpfen nach 12 h L1. Jeweils durch eine Häutung getrennt, entwickeln sich aus den L1 die L2, L3, L4 sowie Adulte. Aus L2 können sich bei ungünstigen Lebensbedingungen Dauerlarven entwickeln, aus denen unter folgenden günstigen Lebensbedingungen L3 hervorgehen. Die Entwicklungsstadien sind aufgrund ihrer Größe und der Reifung des Geschlechtsapparates gut voneinander zu unterscheiden. In Abb.3 ist ein Schema dargestellt, zu welchem Zeitpunkt die einzelnen Entwicklungsstadien in einer synchronisierten Kultur geerntet werden können.

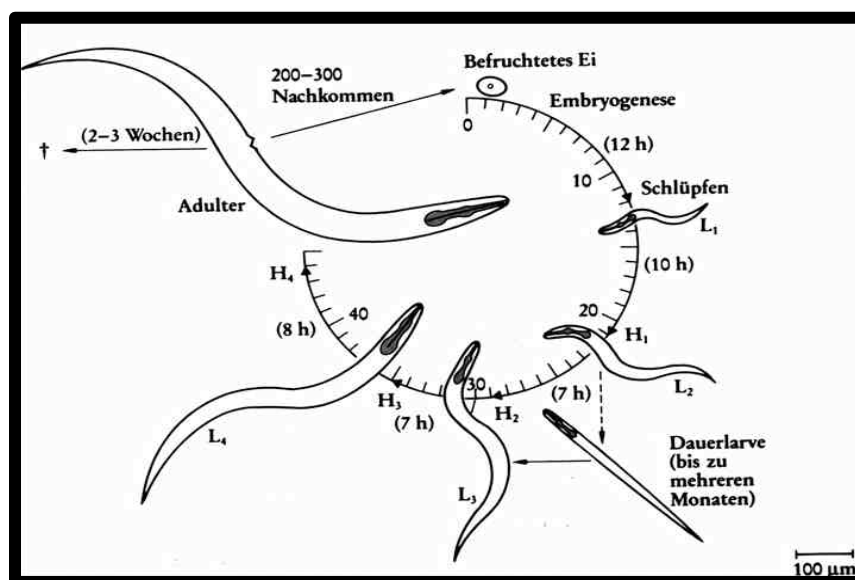


Abb.2: Entwicklungszyklus von *C. elegans* (Schierenberg und Cassada, 1986).

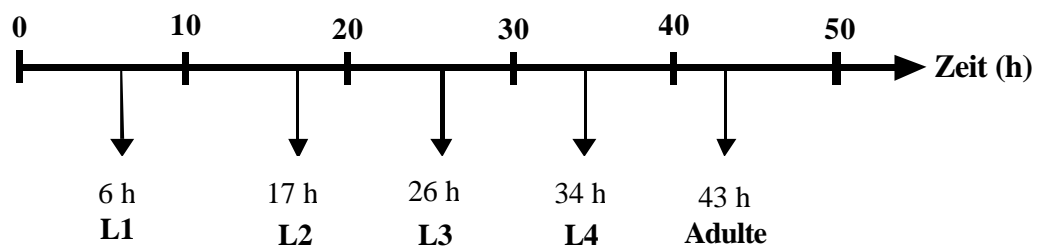


Abb.3: Zeitpunkte des Erntens der verschiedenen Entwicklungsstadien von *C. elegans* aus synchronisierten Kulturen. Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Kulturen synchronisiert.

1.2. Filarien

Filarien sind parasitische Fadenwürmer. Zur Gruppe der humanpathogenen Filarien zählen *Wucheria bancrofti* und *Brugia spp.*, die Erreger der Lymphatischen Filariosen, sowie *Onchocerca volvulus*, *Loa loa* und *Mansonella sp.*. Ein Tiermodell zur Erforschung der Filariosen ist die Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae* in der Wüstenrennmaus *Meriones unguiculatus*.

Weltweit sind ca. 100 Millionen Menschen mit Filarien infiziert, es treten schwerwiegende Krankheitserscheinungen wie Elephantiasis bei Lymphatischer Filariose oder Erblindung bei Infektionen mit *O. volvulus* auf. Die Lebensdauer der Filarien beträgt durchschnittlich 11 Jahre. Filarien sind getrenntgeschlechtlich. Gravide Weibchen produzieren bis 1500 Mikrofilarien pro Tag (Schulz-Key, 1990). Mikrofilarien werden durch den Zwischenwirt (Kriebelmücke) während einer Blutmahlzeit aufgenommen. In diesen entwickeln sich die Mikrofilarien zum infektiösem Stadium, der L3. Diese wird bei einer erneuten Blutmahlzeit des Zwischenwirtes auf den Endwirt übertragen.

Durch die lange Lebensdauer der Filarien im Wirt und unterschiedlichen immunologischen Reaktionstypen der Wirte tritt ein großes Spektrum von Krankheitsbildern auf. Filariosen können entsprechend einer klinischen Manifestation und immunologischen Reaktionstypen der Wirte eingeteilt werden in:

1. Asymptomatische Infektionen Mikrofilarien-negativer Personen
Personen zeigen weder klinische Manifestationen, noch können Mikrofilarien nachgewiesen werden. Sie werden als „potentiell immun“ bezeichnet.
2. Asymptomatische Infektionen Mikrofilarien-positiver Personen
Personen zeigen keine klinischen Manifestationen, es können Mikrofilarien nachgewiesen werden.
3. Symptomatische chronische Infektionen
Personen zeigen pathologische Veränderungen, es können Mikrofilarien nachgewiesen werden.
4. Infektionen mit akuten und oft lokalisierten Manifestationen
Es treten akute, klinische Symptome auf (Soboslay et al., 1994).

In der Regel sind Filariosen chronische Erkrankungen. Es kommt zu einer Eosinophilie, einer Erhöhung unspezifischer IgE-, IgG- und IgM- und einer Erhöhung spezifischer IgG1- und

IgG4-Antikörper. Chronische Infektionen mit hohen Mikrofilariendichten führen bei einem großen Teil der Patienten zu einer Suppression filarienantigenspezifischer T-Zell-Reaktivität. Abwehrmechanismen des Wirtes sind v.a. gegen Mikrofilarien und infektiöse Larvenstadien erfolgreich. Dabei kommt der antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität eine entscheidende Rolle zu.

1.3. Cystatine und Cysteinproteinasen

1.3.1. Charakterisierung der Cystatine

Die Superfamilie der Cystatine untergliedert sich aufgrund von Sequenzhomologien in drei Familien: 1. Stefine, 2. Cystatine, 3. Kininogene. Stefine bestehen aus ca. 100 Aminosäuren und besitzen keine Disulfidbrückenbindungen. Cystatine der Familie 2 bestehen aus einer Peptidkette mit ca. 115 Aminosäuren, es werden zwei Cysteinbrücken ausgebildet. Cystatine der Familie 2 sind v.a. extrazellulär lokalisiert. Kininogene bestehen aus ca. 355 Aminosäuren, es sind Disulfidbrückenbindungen vorhanden. Kininogene sind glykosyliert (Barrett et al., 1986a, b; Turk und Bode, 1991).

Cystatine der Familie 2 inhibieren spezifisch die Aktivität von Cysteinproteinasen durch extrem feste, reversible Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms. Es werden keine kovalenten Bindungen ausgebildet, die Hemmung ist kompetitiv zum Substrat (Nicklin und Barrett, 1984). Das stöchiometrische Verhältnis von Enzym zu Inhibitor beträgt 1 : 1 (Gounaris et al., 1984; Nicklin und Barrett, 1984; Lindahl et al., 1992). Cystatine heften sich auch dann an das Enzym, wenn dessen katalytische Reste des aktiven Zentrums blockiert sind (Barrett, 1987).

Anhand der Kristallstruktur von Eiweißcystatin definierten Bode et al. (1988), daß die drei hochkonservierten Bereiche, 1. der N-terminale Bereich um G11, 2. der Bereich um 55Q-V-V-A-G59 und 3. der Bereich um W106 (die Nummerierung bezieht sich auf humanes Cystatin C), eine keilförmige Struktur bilden, die sich in die Substratbindungsstelle der Cysteinproteinase einfügt. Die Cysteinproteinase wird somit gehemmt. Dieses Modell der Inhibition einer Cysteinproteinase durch ein Cystatin wurde durch Machleidt et al. (1989) und Auerswald et al. (1995) bestätigt.

G11 der Cystatine hat einen starken Einfluß auf die Affinität zur Proteinase, durch G11 wird eine Interaktion zwischen Cystatin und Substratbindungstaschen des Enzyms möglich (Abrahamson et al., 1987; Bode et al., 1988; Machleidt et al., 1989; Hall et al., 1993, 1998). Die Aminosäuren L9-V10 sind entscheidend für die Spezifität zu den humanen Cathepsinen B, L, H und S (Hall et al., 1995, 1998).

Der in den Cystatinen konservierte Bereich um 55Q-V-V-A-G59 formt zusammen mit der C-terminalen Region um P105-W106 eine Haarnadelstruktur, die sich in die Substrattaschen S1´ und S2 des Enzyms einfügt (Bode et al., 1988). W106 bestimmt die Affinität des Cystatins zur Proteinase, ebenfalls der Bereich um 55Q-V-V-A-G59 (Machleidt et al., 1989; Auerswald et al., 1995; Hall et al., 1995).

1999 wurde durch Alvarez-Fernandez et al. ein weiteres, zusätzliches, inhibitorisches Zentrum definiert, welches sich mit dem inhibitorischen Zentrum gegen Cysteinproteinasen nicht überlappt. Diese Domäne inhibiert Asparaginylendopeptidasen, wie z.B. Legumain.

1.3.2. Bedeutung der Cystatine

Cystatine werden als Hauptregler der Aktivität von Cysteinproteinasen verstanden (Turk et al., 1995). Sie werden von vielen Gewebetypen gebildet und sezerniert, u.a. von Makrophagen, Astrogliazellen, Hepatozyten, bronchialen Epithelzellen, mesangialen Zellen und glatten Muskelzellen (Warfel et al., 1987; Zucker-Franklin et al., 1987; Tavera et al., 1992; Burnett et al., 1995; Calkins et al., 1998; Shi et al., 1999). Neben der Kontrolle der Aktivität endogener Cysteinproteinasen schützen sich Organismen durch Cystatine vor einer Proteolyse bei unkontrollierter Freisetzung von Cysteinproteinasen (Hall et al., 1998; Turk et al., 2001). Humanen Cystatinen wurde des weiteren eine Rolle bei Keratinisierungsprozessen der menschlichen Haut zugesprochen (Järvinen, 1978).

Cystatinen kann eine Rolle im Wirts-Pathogenverhältnis zukommen. Cystatine könnten einen Beitrag bei der Abwehr von Krankheitserregern leisten. So inhibiert humanes Cystatin C Virus- (Bjorck et al., 1990) und Bakterienwachstum (Bjorck et al., 1989; Blankenvoorde et al., 1998). Krankheitserreger könnten durch Cystatine Einfluß auf die Abwehrmechanismen ihrer Wirte nehmen. Diskutiert wird, daß Filarien Cystatine ausscheiden, um eine Persistenz im Wirt zu ermöglichen (Hartmann et al., 1997; Schönemeyer et al., 2001).

1.3.3. Einteilung und Struktur von Cysteinproteinasen

Proteinasen werden in Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartylproteinasen unterteilt (Barrett et al., 1979). Charakteristisch für Cysteinproteinasen ist ein reaktives, nukleophiles Thiolat-Imidazolionpaar (Cys25---His159, Nummerierung der Aminosäuren bezogen auf Papain) im aktiven Zentrum des Enzyms (Drenth et al., 1971; Kamphuis et al., 1984).

Die Familien C1, C2 und C10 der Cysteinproteinasen formen Clan CA und werden als papainähnlich bezeichnet. Zur Proteinasenfamilie C1 gehören u.a. Papain aus der Papayapflanze und die lysosomalen, humanen Cathepsine B, L und S (Rawlings und Barrett, 1994). Papainähnliche Cysteinproteinasen sind mit Ausnahme von Cathepsin C Monomere, die zwei Domänen formen. Durch Interaktion dieser beiden Domänen kommt es zur Ausbildung des V-förmigen, aktiven Zentrums, an dessen Boden sich die katalytischen Seitenketten von Cys25 und His159 befinden (Turk et al., 1997). Das Enzym besitzt mehrere Substratbindungsstellen, in denen das Substrat in eher gestreckter Konformation über Wasserstoffbrückenbindungen fixiert wird (Turk et al., 1997). Gut definierte Substratbindungsstellen sind S2, S1 und S1', die Substratspezifität wird durch S1' und S2 bestimmt (Turk et al., 1998).

Papainähnliche Cysteinproteinasen haben ein Molekulargewicht von ungefähr 20-35 kDa (Turk et al., 1997). Das pH-Optimum von Papain liegt im neutralen bis leicht alkalischen (Zucker et al., 1985), das pH-Optimum lysosomaler Cysteinproteinasen liegt im leicht sauren Bereich (Barrett et al., 1980).

1.3.4. Bedeutung der Cysteinproteinasen

Cysteinproteinasen befinden sich in den Zellen höherer Organismen unter physiologischen Bedingungen in den Lysosomen (Xing et al., 1998), einer Gruppe hochdynamischer, funktionell unterschiedlicher Organellen (Claus et al., 1998). Sie spielen eine Rolle beim intrazellulären Proteinkatabolismus exogener und endogener Proteine (Beynon und Bond, 1986; Barrett, 1987; Ohsawa et al., 1993; Nduwimana et al., 1995), so z.B. bei der Prohormonprozessierung (Tepel et al., 2000), bei der Knochen- und Muskelentwicklung (Delaisse et al., 1984; Sohar, 1991) und bei Entwicklung der Epidermis (Roth et al., 2000). Bei der Antigenprozessierung und -präsentierung durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) werden durch Cysteinproteinasen Proteine für die Anlagerung an das Klasse-II-MHC-

Molekül aufbereitet, sowie die li-Kette vom Klasse-II-MHC-Molekül als Voraussetzung für die Anlagerung der antigenen Epitope entfernt (Blum und Cresswell, 1988; Guagliardi et al., 1990; Braciale und Braciale, 1991; Koch et al., 1991; Katunuma et al., 1994 b; Deussing et al., 1998; Pierre und Mellman 1998; Nakagawa und Rudensky, 1999; Medd und Chain 2000). Bei einer unkontrollierten Freisetzung großer Mengen von Cysteinproteinasen in den extrazellulären Raum kommt es zur Zerstörung des Gewebes, u.a. durch Elastindegredierung (Reddy et al., 1995). Durch eine Aktivierung vorhandener Proenzyme und durch die Bildung potenter Peptide werden Entzündungsreaktionen unterstützt (Fritz et al., 1986). Ein Anstieg der Konzentration von Cysteinproteinasen in Geweben und Gewebsflüssigkeiten wurde bei Entzündungsreaktionen (Lenarcic et al., 1988), bei Tumorinvasion (Kos et al., 1997; Sexton und Cox, 1997) und pathogenen Veränderungen der Blutgefäße (Sukhova et al., 1998) gemessen.

Bei Parasitosen sind Cysteinproteinasen wichtig für das Überleben von Parasiten im Wirt, sie bestimmen die Virulenz des Parasiten, werden von den Parasiten zur Entwicklung benötigt und interagieren mit verschiedenen Komponenten des Immunsystems des Wirts (Richer et al., 1993; Mottram et al., 1996; Bart et al., 1997; Frame et al., 2000).

Cysteinproteinasen werden von parasitären Nematoden für die Verdauung (Maki und Yanagisawa, 1986), Häutung (Richer et al., 1993; Lustigman et al., 1996), Gewebewanderung (Dresden et al., 1985; Knox und Kennedy, 1988) und Immunmodulation (Knox et al., 1993; Petralanda und Piessens, 1994) genutzt.

Die Aktivität der Proteinasen wird über vier Mechanismen reguliert: 1. Kontrolle der Enzymsynthese, 2. Aktivierung des Zymogens, 3. Kontrolle des aktiven Enzyms, 4. Abbau der Enzyme und / oder Eliminierung der Proteinasen. Das aktivierte Enzym wird über den pH-Wert, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, über Einfluß bestimmter Lipide und Komplexbildung mit anderen Proteinasen, Proteoglykanen und Inhibitoren kontrolliert (Römisch, 1992; Twining, 1994).

1.4. Charakterisierung der Cystatine von *C. elegans*

Auf Chromosom III von *C. elegans* wurden zu Cystatinen homologe Sequenzen gefunden. Diese Bereiche wurden als Locus CELK08B4.6 (der Bereich, der Cysele1 umfaßt) und Locus CELR01B10.1 (der Bereich, der Cysele2 umfaßt) bezeichnet. Die Sequenz eines weiteren Locus, F41E6.6, zeigt einige Ähnlichkeiten sowohl zu Cystatinen als auch zu

Cysteinproteinasen. Diese Sequenz wurde jedoch aufgrund zu geringer Homologien zu Cystatinen nicht weiter betrachtet und im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr erwähnt.

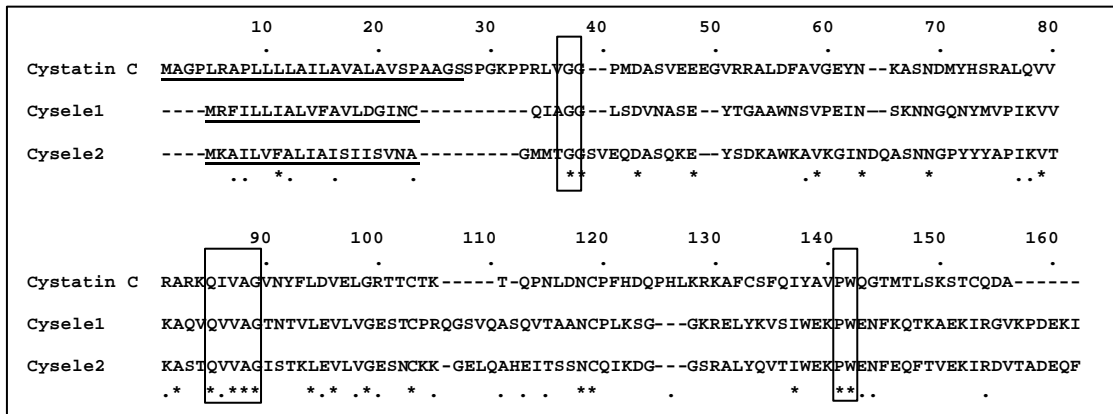


Abb.4: Aminosäuresequenzvergleich. Es wurden die Sequenzen von humanem Cystatin C und den *C. elegans*-Cystatinen Cysele1 und Cysele2 verglichen. Die Nummerierung bezieht sich auf Cystatin C. Signalsequenzen sind unterstrichen (_). Die für einen optimalen Aminosäuresequenzvergleich eingefügten Lücken sind durch Bindestriche (-) gekennzeichnet. Die durch Sternchen (*) gekennzeichneten Aminosäuren sind identisch, die durch Punkte (.) markierten Aminosäuren sind ähnlich. Die Kästchen umrahmen die aktiven, hochkonservierten Bereiche der Cystatine. Humanes Cystatin C und Cysele1 bzw. Cysele 2 besitzen 22 % bzw. 21 % identische und 16 % ähnliche Aminosäuren.

Die Cystatine von *C. elegans* zeigen Homologien zur Cystatinfamilie 2 (ebenfalls zur Familie 2 zugehörig: Eiweißcystatin, Humane Cystatine C und D). Cysele1 zeigt verstärkt Homologien zu humanem Cystatin D, Cysele2 verstärkt Homologien zu humanem Cystatin C. In Abb.4 wird die vollständige Aminosäuresequenz von Cysele1 und Cysele2 (die Signalsequenzen sind mit aufgeführt) mit humanem Cystatin C verglichen. Die Mitglieder der Familie der Cystatine besitzen nur geringe Aminosäuresequenzhomologien untereinander, mit Ausnahme der konservierten, aktiven Bereiche.

In Abb.5 ist der Abgleich der beiden *C. elegans*-Cystatine mit den Cystatinen der beiden parasitären Nematoden *A. viteae* bzw. *O. volvulus* gezeigt. Homologe Sequenzen der Cystatine befinden sich auch hier v.a. um die konservierten, aktiven Zentren. Die N-terminale Sequenz der Filariencystatine weist gegenüber humanem Cystatin C und den *C. elegans*-Cystatinen eine Verlängerung um mindestens 12 AS auf. Inwieweit diese Region die Aufnahme der Cystatine durch Zielzellen beeinflusst, wird derzeit durch Murray et al. untersucht.

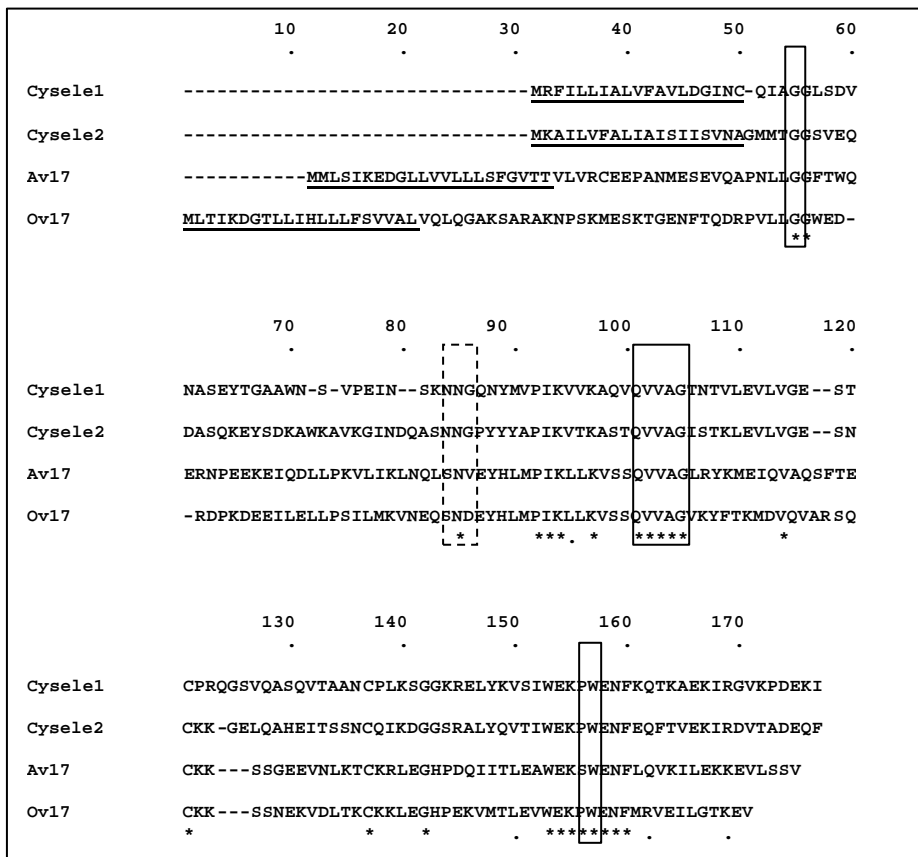


Abb.5: Aminosäuresequenzvergleich. Es wurden die Sequenzen der *C. elegans*-Cystatine (Cysele1 und Cysele2) mit *A. viteae*- (Av17) und *O. volvulus*-Cystatin (Ov17) verglichen. Die Nummerierung bezieht sich auf *O. volvulus*-Cystatin. Signalsequenzen sind unterstrichen (_). Die für einen optimalen Aminosäuresequenzvergleich eingefügten Lücken sind durch Bindestriche (-) gekennzeichnet. Kästchen umfassen die konservierten, aktiven Domänen. Die durch Sternchen (*) gekennzeichneten Aminosäuren sind identisch, die durch Punkte (.) markierten Aminosäuren sind ähnlich. Die Kästchen umrahmen die aktiven, hochkonservierten Bereiche der Cystatine, durchgängige Linien umrahmen die Bereiche, die an einer Inhibierung von Cysteinproteinasen beteiligt sind, die gestrichelte Linie den Bereich, der bei Filariencystatinen für die Inhibierung von Asparaginyldopeptidasen (AEP) verantwortlich ist. *C. elegans*-Cystatinen fehlt die Konsensussequenz zur Inhibierung von AEP.

In Tab.1 sind die Homologien der einzelnen Nematodencystatine untereinander aufgelistet. Cysele1 und Cysele2 besitzen untereinander ebenso wie Ov17 und Av17 untereinander eine Homologie in der Aminosäuresequenz von über 65 %. Av17 und Ov17 als Cystatine parasitärer Nematoden besitzen jedoch lediglich eine Homologie von bis zu 45 % zu den Cystatinen von *C. elegans*.

	Cysele1	Cysele2	Ov17	Av17
Cysele1		52 (13)	21 (13)	23 (15)
Cysele2			25 (18)	28 (17)
Ov17				55 (16)

Tab.1: Homologien und Ähnlichkeiten der Sequenzen von Cysele1, Cysele2, Ov17 und Av17. Die vor der Klammer aufgeführten Zahlen beziehen sich auf identische, die Zahlen in den Klammern auf ähnliche Aminosäuren. Verglichen wurden die Proteine ohne Signalsequenzen, die Angaben sind in Prozent (%).