

4. Diskussion

Immunantworten von mit Filarien infizierten Individuen sind durch eine zelluläre Hyporeaktivität und eine Verschiebung des Zytokinmusters in Richtung Th2-Antwort gekennzeichnet. Diese Veränderung der Immunantwort wird als wichtiger Mechanismus für die Persistenz der Filarien in ihren Wirten angesehen. Cystatine, E / S-Produkte von Filarien, werden für diese Immunmodulation mit verantwortlich gemacht, wobei eine Anzahl von Wirkungsweisen der Cystatine aufgezeigt wurde (Hartmann et al., 1997; Schönemeyer et al., 2001; Pfaff et al., 2002).

Um herauszufinden, ob die Immunmodulation durch Filariencystatine parasitenspezifisch ist, wurden in der vorliegenden Arbeit modulatorische Fähigkeiten von zwei rekombinanten Cystatinen des freilebenden, nichtparasitären Nematoden *C. elegans*, rCysele1 und rCysele2, untersucht. rCysele1 und rCysele2 zeigten einige Effekte, die denen der Filariencystatine ähnelten. Andere durch Filariencystatine hervorgerufene Effekte, wie z.B. eine zelluläre Hyporeaktivität, konnten durch rCysele1 und rCysele2 nicht gezeigt werden.

4.1. Einfluß von rCysele1 und rCysele2 auf die Proliferation polyklonal und antigenspezifisch stimulierter Mausmilzzellen bzw. humaner PBMC

E / S-Produkte adulter Helminthen werden verantwortlich gemacht, eine antigenspezifisch oder polyklonal stimulierte T-Zellproliferation zu supprimieren (Elkhalifa et al., 1991; Allen und MacDonald, 1998). Moleküle, die identifiziert worden sind, für diese Suppression verantwortlich zu sein, sind Phosphocholin, welches die Signaltransduktion beeinflusst (Lal et al., 1990), und Cystatine, eine Gruppe von Cysteinproteinaseinhibitoren (Hartmann et al., 1997; Schönemeyer et al., 2001; Pfaff et al., 2002).

Hartmann et al. (1997) zeigten, daß ein Cystatin der Nagetierfilarie *A. viteae*, rAv17, die polyklonal stimulierte Proliferation von Mausmilzzellen inhibiert. Ein Cystatin der Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis* suppressierte die antigenspezifisch stimulierte Proliferation von Mausmilzzellen (Pfaff et al., 2002). Ein rekombinantes Cystatin der humanpathogenen Filarie *O. volvulus*, rOv17, hat die Potenz, die polyklonal und antigenspezifisch stimulierte Proliferation humaner PBMC zu supprimieren (Schönemeyer et al., 2001). Um herauszufinden, ob die Suppression durch Filariencystatine parasitenspezifisch

ist, wurde vergleichend der Einfluß der Cystatine des freilebenden Nematoden *C. elegans* auf die Proliferation von Mausmilzzellen und humanen PBMC untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß rCysele1 und rCysele2 keinen signifikanten Einfluß sowohl auf die polyklonal, als auch auf die antigenspezifisch stimulierte Proliferation von Mausmilzzellen hatten. Die polyklonal bzw. antigenspezifisch stimulierte Proliferation von humanen PBMC wurde durch rCysele1 und rCysele2 gering bzw. nicht supprimiert. Somit unterscheiden sich rCysele1 und rCysele2 deutlich in dieser Eigenschaft von rAv17 und rOv17.

Im folgenden werden Vorgänge diskutiert, die diesen markanten Unterschied erklären können. Einige Aspekte werden hier nur kurz angeschnitten und in nachfolgenden Abschnitten ausführlich behandelt.

Werden humane PBMC oder Mausmilzzellen antigenspezifisch stimuliert, können Monozyten bzw. Makrophagen diese Antigene aufnehmen, prozessieren und T-Lymphozyten präsentieren. T-Lymphozyten werden somit stimuliert. Da Cysteinproteinasen sowohl bei der Antigenprozessierung als auch bei der Generierung des für die Antigenpräsentation benötigten KLASSE-II-MHC-Komplexes beteiligt sind (Vidard et al., 1991; Nakagawa und Rudensky, 1999; Pierre, 2001), kann durch Inhibition der daran beteiligten Cysteinproteinasen durch Cystatine eine Antigenprozessierung und -präsentation unterbunden werden. Die Unterschiede im Inhibitionsmuster zwischen *C. elegans*-Cystatinen und Filariencystatin zu Cysteinproteinasen und AEP könnten dazu führen, daß Filariencystatine die Proliferation humaner PBMC supprimieren, rCysele1 und rCysele2 hingegen nicht. Nähere Details sind in Abschnitt 4.1. aufgeführt.

Werden T-Lymphozyten antigenspezifisch stimuliert, muß neben der Epitopräsentation durch Makrophagen ein zweites, kostimulatorisches Signal vorliegen (McAdam et al., 1998). Eines dieser essentiellen, kostimulatorischen Moleküle, CD86, wurde unter dem Einfluß von rOv17 vermindert auf Monozyten exprimiert (Schönemeyer et al., 2001). Es wird vermutet, daß dadurch T-Lymphozyten vermindert stimuliert werden.

Durch Mitogene wie ConA und PHA und durch anti-CD3-Antikörper können T-Lymphozyten polyklonal unabhängig von einer Klasse-II-MHC-Expression und somit von einer Antigenpräsentation stimuliert werden. Auch bei dieser Art der Stimulation werden kostimulatorische Moleküle benötigt (Robey und Allison, 1995). Makrophagen spielen dabei eine zentrale Rolle. So wurde eine Suppression polyklonal stimulierter, humaner PBMC durch rOv17 nicht mehr beobachtet, wenn CD14+-Monozyten entfernt wurden (Schönemeyer et al., 2001). Schönemeyer et al. schlußfolgerten, daß Monozyten unabhängig ihrer Fähigkeit

der Antigenprozessierung und -präsentation die Proliferation von T-Lymphozyten beeinflussen.

Loke et al. (2000) zeigten, daß durch IL-4 und IL-13 alternativ aktivierte Makrophagen in Filarieninfektionen eine Proliferation von T-Lymphozyten durch Zell-zu-Zellkontakt blockierten. Dieser rezeptorvermittelte Mechanismus war nicht das Resultat von Apoptose und reversibel.

Inwieweit rCysele1 und rCysele2 die Expression von kostimulatorischen Molekülen und Rezeptoren auf Makrophagen verändern, wurde nicht untersucht. Dies könnte jedoch wichtige Hinweise für den unterschiedlichen Einfluß auf eine zelluläre Reaktivität liefern.

Ebenfalls unabhängig von einer Antigenprozessierung und -präsentation ist der Vorgang, daß durch IFN- γ klassisch aktivierte Makrophagen verstärkt NO produzieren. Dieses wirkt supprimierend auf die DNA-Synthese von T-Lymphozyten und somit auf deren Proliferation (van der Veen, 2001). Trotz einer Erhöhung der NO-Produktion durch *C. elegans*-Cystatine wurde eine T-Zellproliferation nicht supprimiert (siehe ausführlich Kapitel 4.2.).

IL-10 gilt als eine Ursache der Suppression einer T-Zellproliferation. Neben alternativ aktivierten Makrophagen als IL-10-Produzenten (Foey et al., 2001), wurden CD4+-Lymphozyten identifiziert, die makrophagenunabhängig IL-10 exprimieren (Groux et al., 1997). Hartmann et al. (1997) zeigten, daß das rekombinante Cystatin von *A. viteae* die Proliferation von ConA-stimulierten Mausmilzzellen bei gleichzeitiger Heraufregulation von IL-10 supprimiert. Durch anti-IL-10-Antikörper wurde die Suppression z.T. aufgehoben. Ähnliche Ergebnisse zeigten Mahanty et al. (1996) und Osborne und Devaney (1999). Die IL-10-Produktion wurde durch *C. elegans*-Cystatine erhöht, lag aber deutlich unter der Menge, die unter dem Einfluß von Filariencystatin produziert worden war. Es kann vermutet werden, daß diese IL-10-Konzentration zu gering war, um die T-Zellproliferation zu supprimieren (siehe ausführlich 4.3.).

4.2. Inhibition der Cysteinproteinasen Papain und humane Cathepsine L, S und B durch rCysele1 und rCysele2

Mögliche Zielproteinasen von Filariencystatinen sind die humanen Cathepsine B, L und S, die u.a. in Makrophagen exprimiert werden und an einer antigenspezifisch stimulierten Immunantwort beteiligt sein können. So wurde untersucht, ob *C. elegans*-Cystatine die Aktivität dieser Proteinasen beeinflussen. Inhibitionsstudien zeigten, daß rCysele1 und

rCysele2 potente Inhibitoren der humanen Cathepsine B, L und S sind. Die Modellcysteinproteinase Papain wurde ebenfalls gehemmt.

Cathepsine, papainähnliche Cysteinproteinasen der Lysosomen, wurden in verschiedensten Zelltypen gefunden. Als Endopeptidasen spalten sie Proteine und sind somit ein fester Bestandteil des Proteinstoffwechsels. Dabei wird den einzelnen Cathepsinen eine unterschiedliche Bedeutung zugeordnet (Kominami et al., 1991). Cathepsine werden als inaktive Vorstufen gebildet (Neurath, 1991), bei Eintritt in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums wird die Signalsequenz abgespalten. Danach werden die Cathepsine in den Endosomen zu den Lysosomen transportiert (Pierre, 2001). Durch Protonenpumpen in der Membran der Endosomen wird der pH-Wert in diesen während des Transportes verändert. Die Enzyme werden dadurch ebenso wie durch Abspaltung des Proenzym aktiviert (Neurath, 1991; Turk et al., 1995). Lysosomen als hochdynamische, funktionell bestimmte Organellen können mit unterschiedlichen Enzymmustern ausgestattet sein (Katunuma, 1989; Claus et al., 1998).

Neben proteolytischen Aufgaben im Stoffwechsel der Zelle sind Cathepsine bei der Antigenprozessierung und -präsentation durch APC beteiligt (Vidard et al., 1991; Pierre, 2001), wobei das Zusammenspiel und die Beteiligung der einzelnen Proteinasen bisher nur in Bruchstücken bekannt sind (Diment, 1990; Medd und Chain, 2000). Antigene werden durch Phagozytose von APC aufgenommen und müssen zur Prozessierung in ein saures Zellkompartiment gelangen (McCoy und Schwartz, 1988). In einigen Zelltypen werden dazu Lysosomen, in anderen Endosomen genutzt (Kleijmeer et al., 1997; Ramachandra et al., 1999). Durch endosomale / lysosomale Proteinasen werden aus den Antigenen immunogene Peptide erstellt (Vidard et al., 1991). Das für die Antigenpräsentierung durch APC notwendige Klasse-II-MHC-Molekül, an dem die immunogenen Peptide angelagert werden, wird an den Ribosomen gebildet und durch die invariante Kette (Ii) stabilisiert (Elliot et al., 1994), der Komplex wird zu den Lysosomen transportiert. In den Lysosomen wird die invariante Kette (Ii) abgespalten, das immunogene Peptid kann an das Klasse-II-MHC-Molekül gebunden werden (Roche und Cresswell, 1990). Bei der Abspaltung der invarianten Kette (Ii) spielen zelltypabhängig Cathepsin L oder S eine wichtige Rolle (Riese et al., 1996; Pierre und Mellmann, 1998; Nakagawa und Rudensky, 1999). Nach der Bindung des immunogenen Peptides an das Klasse-II-MHC-Molekül wird der Komplex an die Zelloberfläche gebracht und anderen Zellen präsentiert. Ii selbst ist ein starker Inhibitor von humanem Cathepsin L und reguliert möglicherweise dessen proteolytische Aktivität (Bevec et al., 1996).

Die Aktivität der Cysteinproteinasen wird durch verschiedene Mechanismen kontrolliert. Zum einen wird die Proteinasesynthese und die Enzymaktivierung, z.B. durch Abspaltung des Proenzym, beeinflusst (Neurath, 1989). Zum anderen unterliegen sie der Kontrolle durch den pH-Wert, durch Ca^{2+} - und ATP-Konzentration, Lipide und durch Komplexbildung mit anderen Proteinase, Proteoglykanen und Inhibitoren (Twining, 1994; Turk et al., 1995; Authier et al., 1996).

Cystatine werden als wichtigstes Kontrollelement betrachtet (Turk et al., 1995). Sie dienen in den Zellen als Schutz vor ungewollter Proteolyse bei unkontrollierter Freisetzung von Cysteinproteinasen. Cystatine binden extrem fest, aber reversibel an Cysteinproteinasen. Die Hemmung der Cysteinproteinasen durch Cystatine ist kompetitiv zum Substrat. Das Enzym wird dadurch inaktiviert. Der so gebildete Enzyminhibitorkomplex wird abgebaut oder aus dem Organismus ausgeschieden. Jeder Inhibitor bindet unterschiedlich fest an die einzelnen Cysteinproteinasen. Ausschlaggebend sind die Aminosäuresequenzen der Cystatine um die hochkonservierten, aktiven Domänen (Abrahamson et al., 1987, 1991; Lindahl et al., 1994; Cimerman et al., 1999).

Gelangen Cystatine in den Extrazellularraum, können sie durch Zielzellen, wie z.B. Makrophagen, aufgenommen und zu den Lysosomen transportiert werden. Dort können sie die Antigenpräsentation durch Inhibition der Proteinase beeinflussen (Katunuma, 1989). Durch welchen Mechanismus Cystatine in die Zielzelle gelangen, ist unklar.

Einen Einfluß auf die Antigenpräsentation könnte humanes Cystatin C unabhängig von einer Hemmung von Cysteinproteinasen aufgrund von Homologien zur invarianten Kette (Ii) haben (Katunuma et al., 1994 a).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten rekombinanten *C. elegans*-Cystatine rCysele1 und rCysele2 zeigen starke Sequenzhomologien zu humanem Cystatin C in den Bereichen der drei hochkonservierten, aktiven Domänen. Aufgrund dieser und aufgrund des Inhibitionsverlaufs gegenüber Papain kann davon ausgegangen werden, daß das allgemeine Inhibitionsmodell von Bode et al. (1988) und Akashi und Takio (2000) einer Cysteinprotease durch Cystatin auch bei der Reaktion von rCysele1 und rCysele2 mit Papain oder den humanen Cathepsinen angewandt werden kann.

rCysele1 und rCysele2 sind starke Inhibitoren der humanen Cathepsine L und S, beide Cathepsine werden ähnlich stark inhibiert. Verantwortlich für diese ähnlich starke Hemmung ist die hohe Sequenzhomologie von Cathepsin L und S und somit eine ähnliche Substrat- / Inhibitorspezifität. Cathepsin L und S besitzen zueinander in ihrer Aminosäuresequenz die höchste Ähnlichkeit innerhalb der Cysteinproteinasen-Genfamilie (Wiederanders et al., 1992).

rCysele1, rCysele2 und das rekombinante Cystatin der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* zeigen ähnliche K_i -Werte bei der Hemmung der humanen Cathepsine L und S (Schönemeyer et al., 2001).

Eine Aufgabe von Cathepsin L und S ist die Abspaltung der invarianten Kette (Ii) des Klasse-II-MHC-Komplexes als Voraussetzung einer Epitopanlage zur Antigenpräsentation (Riese et al., 1996; Pierre und Mellmann, 1998; Nakagawa und Rudensky, 1999). Schönemeyer et al. (2001) vermuteten, daß die Hemmung von Cathepsin L und S durch Filariencystatin zu einer Einschränkung der Antigenprozessierung und -präsentation durch Makrophagen führt und dieser Vorgang entscheidend für die Suppression einer T-Zellproliferation sein würde. Da Cathepsin L durch rCysele1, rCysele2 und rOv17 ähnlich stark inhibiert wird, rCysele1 und rCysele2 eine T-Zellproliferation aber nur geringfügig beeinflussen, wird von mir geschlußfolgert, daß eine Inhibition von Cathepsin L nicht für eine Suppression einer T-Zellproliferation verantwortlich gemacht werden kann. Dies trifft jedoch nur für die Annahme zu, daß eine Aufnahme der Cystatine durch Makrophagen gleich ist.

rOv17 inhibiert Cathepsin S stärker als rCysele1 und rCysele2. Somit beeinflussen rCysele1 und rCysele2 eine Funktion dieser Cysteinproteinase bei einer Antigenpräsentation weniger und könnten dadurch eine T-Zellantwort im Gegensatz zu rOv17 nicht supprimieren.

Cathepsin B wird durch rOv17 kaum inhibiert (Schönemeyer et al., 2001), wohingegen die *C. elegans*-Cystatine Cathepsin B deutlich inhibieren. Ob Cathepsin B eine Rolle bei Antigenprozessierung und -präsentation und bei der Bildung des Klasse-II-MHC-Komplexes spielt, ist unklar (Kominami et al., 1991). Medd und Chain (2000) vermuteten, daß bei der Generierung von Epitopen für die Anlagerung an ein Klasse-II-MHC-Molekül und nachfolgender Präsentation nicht die Bildung der Epitope der kritische Schritt sei, sondern der zügige Abbau dieser Epitope durch Proteinase, bevor sie an ein Klasse-II-MHC-Molekül gebunden werden können, so daß eine Antigenpräsentation ausgeschlossen ist. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung verstärkt, daß bei einer Hemmung von Cysteinproteinase durch den spezifischen Inhibitor Leupeptin eine Antigenpräsentation erhöht wird (Vidard et al., 1991; Manoury-Schwartz et al., 1997). Man vermutet, daß Cathepsin B eines der proteolytischen Enzyme ist, die für den Abbau von Epitopen verantwortlich sind (Deussing et al., 1998). Demzufolge würden durch Inhibition von Cathepsin B antigene Epitope länger für eine Anlagerung an ein Klasse-II-MHC-Molekül zur Verfügung stehen, APC würden diese Epitope verstärkt T-Lymphozyten präsentieren und diese zur Proliferation anregen können. Da rCysele1 und rCysele2 Cathepsin B stärker als

rOv17 inhibieren, kann man aufgrund dieser stärkeren Inhibition das Ausbleiben einer Suppression einer T-Zellproliferation durch die *C. elegans*-Cystatine erklären.

Einen weiteren Effekt, der durch eine Inhibition von Cathepsin B hervorgerufen werden kann, zeigten Maekawa et al. (1998). Eine Inhibition von Cathepsin B unterstützt die Veränderung einer Immunantwort in Richtung Th1-Antwort. rCysele1 und rCysele2 inhibieren stärker als rOv17 Cathepsin B. Vergleicht man das Zytokinmuster polyklonal stimulierter, humaner PBMC unter Einfluß von rCysele1, rCysele2 und rOv17, wird durch Einfluß von rCysele1 und rCysele2 das Zytokinmuster gegenüber dem Einfluß von rOv17 in Richtung Th1-Antwort verschoben. So unterstützen diese Ergebnisse die Beobachtungen Maekawas.

Durch Alvarez-Fernandez et al. (1999) wurde ein neues, inhibitorisches Zentrum der Cystatine beschrieben. Dieser Bereich überlappt sich nicht mit dem Bereich, der für die Hemmung von Cysteinproteinasen verantwortlich ist. Das durch Alvarez-Fernandez et al. beschriebene Zentrum ist aktiv gegen die Asparaginylendopeptidase (AEP) Legumain. Legumain ist v.a. ein Enzym der Lysosomen (Chen et al., 1997) und spielt eine Schlüsselrolle bei der Antigenprozessierung und -präsentation (Manoury et al., 1998). Durch Manoury et al. (2001) wurde gezeigt, daß Bm-CPI-2, ein Cystatinhomolog der humanpathogenen Filarie *Brugia malayi*, neben den Cysteinproteinasen Cathepsin B, L und S ebenfalls Legumain inhibiert. Bm-CPI-2 blockiert *in vitro* die Prozessierung von Tetanustoxin durch aufgereinigte Lysosomenfraktionen und inhibiert teilweise die Präsentation von selektierten T-Zellepitopen des Tetanustoxins durch APC. Die Konsensussequenz 38-S-N-D-40 (die Nummerierung bezieht sich auf humanes Cystatin C) des inhibitorischen Zentrums gegenüber Asparaginylendopeptidasen ist in Cystatinen von *Brugia malayi*, *O. volvulus* und *Litomosoides sigmodontis* enthalten, so daß eine AEP-inhibitorische Aktivität auch durch *O. volvulus*- und *Litomosoides sigmodontis*-Cystatine vermutet werden kann. Cysele1 und Cysele2 zeigen diese Konsensussequenz nicht und besitzen nur eine sehr geringe Fähigkeit, Asparaginylendopeptidasen zu inhibieren (Maizels, persönliche Mitteilung). So ist es möglich, daß durch *C. elegans*-Cystatine eine Antigenprozessierung auf der Basis der Aktivität von AEP nicht inhibiert und somit eine T-Zellproliferation nicht beeinflusst wird.

Die voneinander abweichenden, inhibitorischen Aktivitäten der Cystatine zu den verschiedenen Proteinasen beruhen auf Unterschieden in den Aminosäuresequenzen der Cystatine. Es ist möglich, daß die Cystatinsequenzen der Filarien im Verlauf der parasitären Lebensweise abgewandelt wurden, um Mechanismen einer Antigenpräsentation durch APC zu beeinflussen.

4.3. Stimulation der iNOS von Mausperitonealmakrophagen durch rCysele1 und rCysele2

Cystatine aller drei Cystatinfamilien, u.a. auch Filariencystatine der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* und der Nagetierfilarie *A. viteae*, stimulieren die Stickoxidproduktion IFN- γ -aktivierter Mausperitonealmakrophagen (MPM) (Verdot et al., 1996; Hartmann et al., 2002). Stickoxid (NO) ist ein starkes Effektormolekül im Infektionsgeschehen parasitärer Erkrankungen (James, 1995; MacMicking et al., 1997). So wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch durch *C. elegans*-Cystatine die NO-Produktion beeinflusst wird. Es zeigte sich, daß *C. elegans*-Cystatine ähnlich der Filariencystatine die induzierbare Stickoxidsynthetase (iNOS) IFN- γ -aktivierter MPM konzentrationsabhängig stimulieren.

Stickoxid ist ein gasförmiges, kurzlebige Radikal und wird von fast jeder Zelle gebildet (Nathan und Xie, 1994; Drapier, 1997). Dabei wird durch Stickoxidsynthetasen (NOS) L-Arginin oxidiert, es entsteht neben Stickoxid L-Citrullin. Bisher wurden drei Säugetier-NOS-Gene und somit drei NOS identifiziert (Wang und Marsden, 1995). Zwei NOS produzieren konstitutiv geringe Mengen an NO (= cNOS). Eine der beiden cNOS, ecNOS bezeichnet, wurde zuerst in Endothelzellen (Palmer et al., 1988; Lamas et al., 1992; Koide et al., 1993), später auch in anderen Zellen gefunden (Shaul et al., 1994; Colin et al., 1997; Dweik et al., 2001). Die zweite cNOS, ncNOS bezeichnet, wurde ursprünglich in Neuronen nachgewiesen, später in vielen anderen Zellen und Geweben (Nathan und Xie, 1994; Forstermann et al., 1998). Die Induktion der cNOS wird über die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bzw. über Bindung von Calmodulin kontrolliert (Bredt und Snyder, 1990; Beesley, 1995). Die dritte Form der NOS, die Calmodulin sehr fest bindet und deshalb unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird, ist induzierbar und wird iNOS bezeichnet (Xie und Nathan, 1994). Durch sie können große Mengen an NO über einen längeren Zeitraum gebildet werden. iNOS wurden im Zytosol fast aller Zelltypen, v.a. in Monozyten und Makrophagen, nachgewiesen (Buttery et al., 1994; Reiling et al., 1994; Amin et al., 1995-96).

Die Menge der in der Zelle vorhandenen iNOS wird durch verschiedene Mechanismen geregelt (Xie und Nathan, 1994). Zum einen kann die Enzyymbildung kontrolliert werden. So induzieren IFN- γ , LPS und IL-1 die Genexpression (Koide et al., 1993; Xie und Nathan, 1993; Martin et al., 1994; Geng und Lotz, 1995). Zum anderen reguliert die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration die Transkription und beeinflusst die Stabilität der gebildeten mRNA (Geng und Lotz, 1995; Jordan et al., 1995).

IFN- γ ist das einzige Zytokin, welches ohne weiteren Stimulus die NO-Synthese heraufregulieren kann (Verdot et al., 1999). Produzenten von IFN- γ sind T-Lymphozyten, wobei zum einen CD8⁺-Zellen, zum anderen CD4⁺-Zellen verantwortlich gemacht werden (Paliard et al., 1988; Seguin et al., 1994). Neben IFN- γ , LPS und IL-1 können die Zytokine TNF- α und IL-2 und die Faktoren cAMP und PGE₂ die Aktivität der iNOS stimulieren (Drapier et al., 1988; Liew et al., 1990; Gaillard et al., 1992; Ellman et al., 1993; Imai et al., 1994; Williams et al., 1994; Samlowski et al., 1995). IL-4 und TGF- β inhibieren die iNOS-Aktivität (Bogdan et al., 1994; Green et al., 1994; Stenger et al., 1994).

Beobachtungen zum Effekt von IL-10 auf die NO-Produktion sind komplexer. So berichten Bogdan et al. (1991) bei Zugabe von IL-10 zu IFN- γ -aktivierten MPM von einer Inhibition der Stickoxidproduktion. Wurden IFN- γ -aktivierte MPM gleichzeitig mit IL-10 und den zusätzlichen Stimuli LPS oder TNF- α versetzt, wurde dieser supprimierende Effekt nicht nur aufgehoben, sondern die NO-Produktion wurde stimuliert (Corradin et al., 1993; Jacobs et al., 1998).

NO kann extrazellulär wirken oder in Zellen hineindiffundieren und dort als Botenstoff vielfältigste Mechanismen beeinflussen. So hat es Einfluß auf die Gefäßdilatation (Sakuma et al., 1988) und auf Neurotransmission, Neuroprotektion und Neurotoxizität (Sanders und Ward, 1992; Dawson, 1995; Vidwans et al., 1999). NO ist bei der Regelung der Apoptose beteiligt (Ellman et al., 1993) und in eine Reihe immunologischer Prozesse einbezogen, wie zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen und Mikroorganismen, T- und B-Zellsuppression, Zytokinproduktion und Inhibition von Adhäsion und Migration von Leukozyten (Hibbs et al., 1987; Kubes et al., 1994; Thuring et al., 1995; Falzarano et al., 1996; Gao et al., 1999; van der Veen, 2001).

Wirtsorganismen können durch NO Parasiten bekämpfen, einige Beispiele sollen dies veranschaulichen. Hepatozyten und Kupffersche Sternzellen produzieren NO zur Zerstörung von Plasmodien-infizierten Hepatozyten (Seguin et al., 1994). Eine Stimulation der NO-Produktion durch IFN- γ bewirkt eine Abheilung einer Leishmaniose in Mäusen (Vouldoukis et al., 1996). NO tötet *Leishmania major in vitro* (Green et al., 1990). Durch IFN- γ und LPS stimulierte Makrophagen produzieren NO und töten *Brugia malayi in vitro* (Thomas et al., 1997).

Parasiten zeigen die Fähigkeit, die Bildung von NO zu beeinflussen, um im Wirt besser überleben zu können. *Entamoeba histolytica* z.B. moduliert iNOS-mRNA (Wang et al., 1994). Schafft es der Parasit, die Aktivität der iNOS des Wirtes zu hemmen, kann es im Wirt

zu einem Ausbruch bzw. zu einer Verstärkung der parasitären Erkrankung kommen (Seguin et al., 1994; Rajan et al., 1996; Stenger et al., 1996).

Gegensätzlich zu einer Inhibition der iNOS des Wirtes können Parasiten die iNOS-Aktivität von Makrophagen erhöhen, um im Wirt eine zelluläre Hyporeaktivität auszulösen. So zeigten O'Connor et al. (2000), daß eine durch *Brugia pahangi*-Antigene hervorgerufene Suppression einer T-Zellproliferation aufgehoben wurde, wenn man eine iNOS-Aktivität durch spezifische Inhibitoren blockierte. Die Beobachtung, daß eine erhöhte NO-Produktion eine T-Zellproliferation supprimiert, wird durch Untersuchungen von Mabbott et al. (1995) und Schleifer und Mansfield (1993) unterstützt.

Die Suppression einer T-Zellproliferation durch NO läßt sich derzeit durch unterschiedliche Mechanismen erklären. Zum einen beeinflußt NO die Jak / STAT5-Signaltransduktionskaskade von T-Zellen (Bingisser et al., 1998), zum anderen kann NO auf die Expression regulatorischer Proteine, die den Zellzyklus steuern, einwirken (Tanner et al., 2000). So zeigten Krenger et al. (1996) und Togashi et al. (1997), daß NO die NF κ B-Aktivierung in Glia- und T-Zellen inhibiert. Obwohl NO eine T-Zellproliferation supprimieren kann, wird dabei die Zytokinproduktion der T-Zellen nicht beeinflußt (van der Veen et al., 1999).

Cystatine besitzen die Fähigkeit, die NO-Produktion IFN- γ -stimulierter Makrophagen heraufzuregulieren. Zuerst wurde dies an Eiweißcystatin gezeigt (Verdot et al., 1996). Dabei wird durch Eiweißcystatin die TNF- α - und IL-10-Produktion von Makrophagen erhöht und wirkt auf die Makrophagen-iNOS stimulierend zurück (Verdot et al., 1999). Hartmann et al. (2002) wiesen später eine Heraufregulation der NO-Produktion durch Filariencystatine nach. IFN- γ war, wie bei Verdot et al. (1999) schon gezeigt, ein essentieller Stimulus. Der genaue Mechanismus der Beeinflussung der iNOS durch Cystatine ist unklar, eine Aktivität der Cystatine gegenüber Cysteinproteinasen spielt dabei jedoch keine Rolle, da auch inaktiviertes Cystatin eine NO-Produktion stimuliert (Verdot et al., 1996; Hartmann et al., 2002).

Die *C. elegans*-Cystatine erhöhen die Stickoxidproduktion IFN- γ -stimulierter MPM konzentrationsabhängig ähnlich der Stimulation durch Filariencystatin. Somit ist innerhalb der Gruppe der Nematoden diese Eigenschaft kein spezifisches Charakteristikum der Filarien. Trotz einer Stimulation der NO-Produktion durch rCysele1 und rCysele2 wird eine T-Zellproliferation von Mausmilzzellen nicht beeinflußt. Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen von Hartmann et al. (2002), die zeigten, daß eine Suppression der T-Zellproliferation durch Filariencystatine unabhängig von einer Erhöhung der NO-Produktion war.

Die Möglichkeit der Stimulation der iNOS durch Cystatine ist ein Effekt, der nicht während des Parasitismus entwickelt wurde, wohl aber durch Filarien genutzt werden kann. Unter welchen Bedingungen im Wirt durch Cystatine eine NO-Produktion stimuliert wird, ist bisher nur bruchstückhaft bekannt.

Auf der einen Seite besteht die Möglichkeit, daß Filarien über eine Steigerung der NO-Produktion durch Cystatine eine zelluläre Hyporeaktivität im Wirt auslösen (O'Connor et al., 2000), wobei, wie in dieser Arbeit gezeigt, eine Erhöhung der NO-Produktion nicht zwangsläufig zu einer Suppression der T-Zellproliferation führt. Auf der anderen Seite dürften Filarien eine NO-Produktion nicht unterstützen, da NO ab einer bestimmten Konzentration für Parasiten toxisch ist, ein Wirtsorganismus kann durch NO Parasiten bekämpfen (Vouldoukis et al., 1996; Thomas et al., 1997). Das et al. (2001) zeigten, daß durch hohe Mengen an Cystatin eine NO-Produktion so stark stimuliert werden kann, daß Parasiten abgetötet werden. Sie behandelten BALB/c-Mäuse, die mit *Leishmania donovani* infiziert waren, mit Eiweißcystatin und konnten die Parasitenlast der Milzzellen vollständig eliminieren.

Ein gegenteiliger Effekt zu einer Stimulation der iNOS durch Cystatine wurde durch Pfaff et al. (2002) gezeigt. Durch kontinuierliche, intraperitoneale Gabe von *Litomosoides sigmoidontis*-Cystatin wurde eine durch *Litomosoides sigmoidontis*-Mikrofilarien stimulierte NO-Produktion im Mausmodell signifikant reduziert. Dieses Ergebnis läßt sich schwer in bisherige Modelle einordnen.

So erscheint es, daß der Regelmechanismus der NO-Produktion komplex ist und daß Filarien nur unter bestimmten Voraussetzungen in einem begrenzten Umfang eine NO-Produktion stimulieren, um davon einen Nutzen zu haben.

4.4. Beeinflussung des Zytokinmusters polyklonal stimulierter, humaner PBMC

Durch die rekombinanten Cystatine des freilebenden Bodennematoden *C. elegans* wird eine polyklonal und antigenspezifische Proliferation von humanen PBMC nicht oder nur geringfügig beeinflußt. Im Gegensatz dazu supprimiert das rekombinante Cystatin der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* die polyklonal und antigenspezifisch stimulierte Proliferation von humanen PBMC (Schönemeyer et al., 2001). Dieser Unterschied kann auf einer veränderten Zytokinproduktion polyklonal stimulierter, humaner PBMC in Anwesenheit von rCysele1 und rCysele2 beruhen.

Durch rCysele1 und rCysele2 wird die IFN- γ -, IL-10- und IL-12-Produktion erhöht. Die Erhöhung von IL-10 durch rCysele1 und rCysele2 ist jedoch geringer als durch rOv17. Die IL-12-Produktion unter Einfluß von rCysele1 und rCysele2 ist wesentlich stärker als unter dem Einfluß von rOv17. Durch die *C. elegans*-Cystatine wird IL-2 vermindert exprimiert. Vergleichend dazu inhibiert rOv17 noch stärker eine IL-2-Produktion. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Th1-spezifische Zytokine unter Einfluß von rCysele1 und rCysele2 gegenüber rOv17 verstärkt, Th2-spezifische Zytokine vermindert produziert werden.

Filarien beeinflussen in unterschiedlicher Weise das Zytokinmuster ihrer Wirte. Symptomatische, chronische Infektionen mit Filarien, bei denen keine Mikrofilarien nachgewiesen werden können, führen zu einer Veränderung des Zytokinmusters in Richtung Th1-Antwort. Werden z.B. PBMC von Personen mit einer chronischen *Brugia malayi*-Infektion mit *Brugia malayi*-Antigen (BmA) stimuliert, kommt es zu einer verstärkten IL-2- und IFN- γ -Produktion (Nutman et al., 1987). Personen asymptomatischer Infektionen, die keine klinischen Manifestationen aufweisen, in denen Mikrofilarien jedoch nachgewiesen werden können, zeigen die Ausprägung einer Th2-Antwort. Werden die PBMC von diesen *Brugia malayi*-infizierten Personen mit BmA stimuliert, können IL-2 und IFN- γ nicht mehr nachgewiesen werden, eine IL-4-Produktion ist erhöht (Nutman et al., 1987; King et al., 1993).

Auch parasitäre Darmnematoden beeinflussen das Zytokinmuster der Wirtsimmunzellen. Antigen-spezifisch stimulierte CD4⁺-Zellen von Mäusen, die mit dem Darmnematoden *Nippostrongylus brasiliensis* infiziert wurden, produzierten vermehrt IL-4, IL-5 und IL-10. IL-2 und IFN- γ wurden vermindert gebildet (Street und Mosmann 1990; Finkelman et al., 1997). Auch Grecis et al. (1991) zeigten, daß intestinale Nematoden eine Th2-Antwort hervorrufen.

Um den Einfluß von Parasiten auf das Zytokinmuster bestimmter Immunzellen einordnen zu können, ist es wichtig, die Wechselwirkungen und Beeinflussungen der einzelnen zytokinproduzierenden CD4⁺-Zellsubpopulationen zu verstehen.

Naive CD4⁺-Zellen können sich zu Th1-, Th2-, Th3- oder Th0-Subpopulationen entwickeln. Jede dieser Subpopulationen ist durch ein entsprechendes Muster an produzierten Zytokinen geprägt (Mosmann et al., 1986; Del Prete et al., 1991). Eine Th1-Subpopulation entwickelt sich unter Einfluß von IL-12, das von Monozyten / Makrophagen, B-Lymphozyten und Dendritischen Zellen produziert wird (D'Andrea et al., 1992; Valiante et al., 1992; Heufler et al. 1996; Kang et al., 1996; Koch et al., 1996), unter Beteiligung kostimulatorischer Moleküle (Rocken et al., 1992; Murphy et al., 1994) und IFN- γ (Scott, 1991), welches durch IL-12-

stimulierte NK-Zellen und T-Zellen produziert wird (Chan et al., 1992; D'Andrea et al., 1992; Scharon und Scott, 1993). Spezifische Zytokine, durch Th1-Zellen ausgeschieden, sind IFN- γ , IL-2, TNF- α und TNF- β (Heinzel et al., 1991). Th1-Zellen induzieren eine zellvermittelte Immunantwort.

IL-12 überdeckt die Wirkung von IL-4 (Manetti et al., 1994). In Abwesenheit von IL-12 oder IFN- γ entwickelt sich unter dem Einfluß von IL-4, welches von T-Zellen, Basophilen Granulozyten und Mastzellen ausgeschieden wird, eine Th2-Subpopulation (Pearlman et al., 1993; Scott, 1996). Für eine Th2-Subpopulation charakteristische Zytokine sind IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 (Mattner et al., 1996). Th2-Zellen induzieren eine B-Zellantwort und werden für allergische Reaktionen verantwortlich gemacht. Exprimiertes IFN- γ wirkt negativ auf die Produktion von Th2-spezifischen Zytokinen.

IL-4 und IL-10 wirken u.a. durch Verminderung kostimulatorischer Moleküle und Einfluß auf die Klasse-II-MHC-Molekülbildung negativ auf die Entwicklung einer Th1-Subpopulation (de Waal Malefyt et al., 1991; D'Andrea et al., 1993; Enk et al., 1993; Powrie et al., 1993; Willems et al., 1994). Des weiteren wirkt IL-10 immunsupprimierend und anti-inflammatorisch durch Hemmung der Bildung der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-12 in akzessorischen Zellen (Ding et al., 1993). Durch Supprimierung der IL-12- und IFN- γ -Produktion wird somit eine Th1-Entwicklung, sowie eine negative Rückkopplung von IFN- γ auf eine Th2-Entwicklung verhindert (Gajewski und Fitch, 1988; Hsieh et al., 1993).

Ob sich aus naiven CD4⁺-Zellen Th1- oder Th2-Zellen entwickeln, hängt demzufolge neben Mikroumwelt, kostimulatorischen Molekülen und genetischem Hintergrund des Wirtsorganismus in einem großen Maß von der Bildung von Zytokinen, sowie durch Auswahl der Epitope für die Antigenpräsentation durch Antigenpräsentierende Zellen ab (Romagnani et al., 1997; Medd und Chain, 2000).

Den Th0-Zellen wird eine Funktion bei der Regelung des Gleichgewichtes zwischen Th1- und Th2-Zellen zugeschrieben (Kemp et al., 1999). Sie produzieren Th1- und Th2-spezifische Zytokine gleichzeitig (Firestein et al., 1989; Kemp et al., 1999). Th3-Lymphozyten produzieren TGF- β und tragen zur Immunsuppression bei (Weiner, 2001).

Haben sich naive CD4⁺-Zellen in eine der Subpopulationen entwickelt, ist eine Änderung des Status schwer möglich (Pearlman et al., 1993; Launois et al., 1997). Eine Th1-Antwort wird durch die Mikroumwelt aufrechterhalten, IL-12 spielt dabei keine Rolle. IL-10 ist für die Aufrechterhaltung einer Th2-Antwort nicht notwendig (Chatelein et al., 1999).

Daß Cysteinproteinaseinhibitoren einen Einfluß auf die Prägung der Immunantwort haben können, zeigten Maekawa et al. (1998). Durch Gabe von Inhibitoren von Cathepsin B bei

einer *Leishmania major*-Infektion in BALB/c-Mäusen riefen sie eine Verschiebung des Zytokinmusters von einer Th2- in eine Th1-Antwort hervor. Die in dieser Arbeit erzielten Daten zur Zytokinproduktion humaner PBMC unterstützen diese Aussage. *C. elegans*-Cystatine inhibieren stärker als Filariencystatine humanes Cathepsin B und unterstützen vermehrt die Produktion Th1-spezifischer Zytokine. Der Mechanismus ist unklar.

Hartmann et al. (1997) und Schönemeyer et al. (2001) zeigten, daß Filariencystatine das Zytokinmuster der Wirtszellen beeinflussen, indem IL-10 herauf und IFN- γ , IL-2 und IL-12 herunterreguliert wurden. Durch Mahanty et al. (1996), Osborne und Devaney (1999) und Hartmann et al. (1997) wurde gezeigt, daß hohe IL-10-Werte mit einer Suppression einer T-Zellproliferation einhergehen. So wurden in chronischen Filariosepatienten mit starker zellulärer Hyporeaktivität humaner PBMC hohe IL-10-Konzentrationen gemessen (Mahanty et al., 1996). Eine durch *Brugia pahangi*-Antigen hervorgerufene Suppression polyklonal stimulierter Mausmilzzellen von mit *Brugia pahangi*-L3-infizierten BALB/c-Mäusen konnte durch anti-IL-10-Antikörper aufgehoben werden (Osborne und Devaney, 1999). Hartmann et al. (1997) unterstützten diese Aussage, da eine Suppression der T-Zellproliferation von polyklonal stimulierten Mausmilzzellen durch Filariencystatin durch anti-IL-10-Antikörper teilweise aufgehoben werden konnte.

Daß eine zelluläre Hyporeaktivität jedoch nicht immer als Folge einer verstärkten IL-10-Produktion anzusehen ist, zeigten Schönemeyer et al. (2001). Sie vermuteten für die T-Zellsuppression einen zweiten IL-10-unabhängigen Mechanismus, da eine Suppression einer T-Zellproliferation in Anwesenheit von rOv17 durch monoklonale Antikörper gegen IL-10 nicht aufgehoben werden konnte.

Schönemeyer et al. (2001) zeigten, daß die Zielzellen der Wirkung von Filariencystatinen Monozyten sind. Es ist zu vermuten, daß rCysele1 und rCysele2 durch einen äquivalenten Mechanismus Monozyten und deren Zytokinproduktion beeinflussen. Unter Einfluß von rCysele1 und rCysele2 wurde durch humane PBMC gegenüber rOv17 verstärkt IL-12 gebildet. Diese erhöhte IL-12-Produktion könnte ein entscheidender Faktor bei der Verschiebung des Zytokinmusters in Richtung Th1-Antwort sein. Eine vollständige Suppression der Expression Th-2-spezifischer Zytokine konnte nicht beobachtet werden, so daß anzunehmen ist, daß die durch rCysele1 und rCysele2 induzierte Menge zu gering war, um eine Th2-Antwort vollständig zu unterbinden.

4.5. RNA interference mit dsRNA von Cysele1 in Kombination mit Cysele2 in *C. elegans*

Fire et al. (1998) berichteten erstmals, daß durch Injektion doppelsträngiger RNA (dsRNA) in *C. elegans* die Expression der Gene, die homolog zu dieser dsRNA war, unterbrochen wurde. Dieser Mechanismus wird RNA interference (RNAi) genannt. Bei diesem Vorgang wird die homologe, endogene mRNA degradiert (Montgomery et al., 1998). Der genaue Ablauf ist z.Z. nur in Bruchstücken bekannt (Kuwabara und Coulson, 2000). Mette et al. (2000) berichteten, daß z.B. durch dsRNA eine Veränderung der Methylierung der DNA auftreten kann.

Ein RNAi-Effekt ist u.a. auch in *Trypanosoma brucei* (Ngo et al., 1998), *Drosophila* (Kennerdell und Carthew, 2000), Zebrafischen (Wargelius et al., 1999) und Mäusen (Wianny und Zernicka-Goetz, 2000) nachgewiesen worden.

Injiziert man dsRNA in *C. elegans*, kommt es nicht nur an der Injektionsstelle, sondern ebenfalls in ausgedehnten Körperregionen zur RNAi (Fire et al., 1998). Der RNAi-Effekt tritt in den injizierten Würmern und in der F1-Generation auf, seltener in der F2-Generation (Montgomery et al., 1998). Neben einer Injektion kann dsRNA auch mit anderen Methoden appliziert werden. Durch Füttern von *C. elegans* mit *E. coli*, die Plasmide zum Ablesen von zwei komplementären RNA-Strängen enthalten, wird RNAi hervorgerufen (Timmons und Fire, 1998; Timmons et al., 2001). *C. elegans* können in einer dsRNA-Lösung gebadet werden (Tabara et al., 1998). Durch Elektroporation kann dsRNA in *Trypanosoma brucei* gebracht werden (Ngo et al., 1998).

Die Exons eines Genes sind RNAi-aktiv, nicht jedoch die Introns (Fire et al., 1998). Es gibt verschiedene Annahmen, welche Rolle RNAi in Organismen spielen könnte. So wird vermutet, daß Organismen sich durch RNAi vor einer RNA-Virus-Infektion schützen können, durch dsRNA wird die IFN- γ -Produktion der betroffenen Zellen erhöht, dadurch wird ein antiviraler Status erreicht (Sharp, 1999). Eine weitere mögliche Rolle könnte RNAi beim Transposon silencing spielen (Tabara et al., 1999).

Durch Gönczy et al. (2000) wurde die Expression von ca. 96% der 2300 geschätzten Open Reading Frames auf Chromosom III von *C. elegans* durch RNAi mittels Injektion inhibiert. Der Einfluß dieser Gene wurde auf die frühe Embryonalentwicklung der F1-Generation untersucht. 133 Gene aus Chromosom III waren für die frühe Embryonalentwicklung essentiell. Die für die *C. elegans*-Cystatine Cysele1 und Cysele2 kodierenden Sequenzen K08B4.6 und R01B10.1 sind dabei nicht untersucht worden. Deshalb wurde in unseren Versuchen der RNAi-Effekt von dsRNA der *C. elegans*-Cystatine überprüft.

DsRNA der beiden *C. elegans*-Cystatine wurde gleichzeitig in *C. elegans* injiziert. Die F1-Generation der injizierten Würmer wurde in ihrer Entwicklung beobachtet und beurteilt. Embryonen der F2-Generation wurden unter dem Mikroskop in ihrem Entwicklungszustand eingeschätzt. Sowohl bei der Entwicklung der F1-Generation wie auch im Entwicklungszustand der Embryonen der F2-Generation waren keine Unterschiede zwischen der mit dsRNA von Cysele1 und Cysele2 injizierten und der Kontrollgruppe, injiziert mit 1 x Injektionspuffer, zu erkennen.

Die Expression von Cysele1 konnte durch RNAi in den L4 der F2-Generation nur zu ca. 70% unterdrückt werden. Eine Expression von Cysele2 konnte nicht eingeschätzt werden, da ein Nachweis von Cysele2 im Gesamtwurmhomogenisat durch Western-Blot im Gegensatz zu Cysele1 nicht möglich war. Die Ergebnisse der Studienjahresarbeit von Susanne Nitzsche (2001) unterstützen diese Beobachtung. Durch ELISA konnte sie Cysele1 und Cysele2 in allen Entwicklungsstadien nachweisen, die Menge an gebildetem Cysele2 war jedoch deutlich geringer als an Cysele1.

Eine unvollständige Suppression der Expression von Cysele1 kann durch verschiedene Annahmen erklärt werden. Es wäre möglich, daß durch RNAi eine Expression von Cysele1 nicht vollständig verhindert werden kann. Weiterhin könnten zum Zeitpunkt des Erntens der L4 der F1-Generation sich schon einige Individuen zu jungen Adulten mit Embryonen ohne RNAi-Effekt entwickelt haben. Eine Entwicklung der F1-Generation verlief nicht exakt synchron, da die durch die injizierten Würmer abgegebenen Eier über einen Zeitraum von mehreren Stunden zu einer Gruppe zusammengefaßt worden waren. Eine weitere Erklärung ergibt sich aus der Möglichkeit, daß der RNAi-Effekt schon innerhalb einer kurzen Zeitspanne nachläßt, so daß in L4 der F1-Generation die Expression nicht mehr vollständig unterbunden wird (Dr. Srayko, persönliche Mitteilung). Um diese möglichen Beeinflussungen zu klären, müßten, korrekt voneinander abgegrenzt, die einzelnen Stadien L1, L2, L3 und L4 in die Untersuchungen einbezogen werden. Neben der Untersuchung der F1-Generation ist es ebenfalls möglich, die injizierten Würmer in einem Western-Blot auf Proteinexpression zu untersuchen. Dabei müßte die Geschwindigkeit des Proteinturnovers des untersuchten Proteins beachtet werden. Ein langsames Turnover verfälscht stark eine Einschätzung des RNAi-Effektes, da nur eine Proteinexpression verhindert wird, schon vorhandene Proteine werden nicht verändert. Da die Funktion von Cystatinen in *C. elegans* nicht bekannt ist, ist auch eine Einschätzung über den Proteinturnover der Cystatine schwer möglich.

Über weitere, neben einer möglichen Immunmodulation vorhandene Funktionen von Filariencystatinen ist wenig bekannt. Lustigmann et al. (1996) vermuteten, daß das Cystatin

der humanpathogenen Filarie *O. volvulus* eine Rolle bei der Häutung des Parasiten spielt. Hartmann et al. (1997) zeigten jedoch an dem Cystatin der Nagetierfilarie *A. viteae*, daß es in allen Entwicklungsstadien vorhanden sei, also auch in Stadien, die sich nicht häuten, wie z.B. den Männchen.

Cysele1 und Cysele2 werden in allen Entwicklungsstadien von *C. elegans* exprimiert und konnten in den Überständen von Gemischtflüssigkulturen nachgewiesen werden. Sie sind demzufolge ebenso wie die Filariencystatine Komponenten der E / S-Produkte dieser Organismen. Mittels RNAi von Cysele1 und Cysele2 konnte kein Einfluß auf die Entwicklung von *C. elegans* gezeigt werden. So bleibt die Frage, welche Funktionen Cystatine für *C. elegans* besitzen, offen.

Die Frage, ob Cystatine für die Auseinandersetzung parasitärer Nematoden mit den Abwehrmechanismen der Wirte essentiell sind, dürfte nur durch RNAi-Untersuchungen an diesen Parasiten zu klären sein. Mit Hilfe des *C. elegans*-Modells sind dazu notwendige Informationen erhältlich, inwieweit Cystatine für Leben und Weiterentwicklung, nicht jedoch für eine Auseinandersetzung mit einem Wirt, von Nematoden unentbehrlich sind.