

1. Einleitung

1.1. *Caenorhabditis elegans* – ein Nematodenmodell

Der freilebende Bodennematode *C. elegans* ernährt sich von Mikroorganismen. Unter Laborbedingungen ist er in Flüssigkultur oder auf Agar-Platten mit *E. coli* OP50 leicht zu halten und zu vermehren. Während des 43 Stunden dauernden Entwicklungszyklus häutet sich die L1 über die L2 und L3 zur L4 und schließlich zu den Adulten, die in den folgenden zwei Wochen 200 bis 300 Eier pro Wurm ablegen. Dieser Zyklus ermöglicht die Produktion hoher Nachkommenzahlen innerhalb kurzer Zeit bei relativ geringem Arbeitsaufwand. Die vollständige Sequenzierung seines Genoms (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) prädestiniert *C. elegans* zusätzlich als Modellorganismus.

1.2. *Acanthocheilonema viteae* – ein Filarienmodell

Filarien leben endoparasitisch in Wirbeltieren, auf die die fadenförmigen Nematoden durch blutsaugende Arthropoden übertragen werden. Die meisten Filarien sind streng an ihren Wirt adaptiert. Sie verursachen bedeutende Humanparasitosen in den Tropen und Subtropen, beispielsweise die Flußblindheit (*Onchocerca volvulus*) oder die Elephantiasis (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*), wobei die jeweils typischen, pathologischen Erscheinungen durch die Lokalisation der Adulten bedingt sind. Durch deren teilweise jahrelange Persistenz und Akkumulation im Wirt können schwere chronische Erkrankungen entstehen. Der Ausprägungsgrad klinischer Symptome hängt von der immunologischen Reaktionslage des Wirtes ab und kann von asymptomatisch über symptomatisch-chronisch bis hin zu akuten klinischen Symptomen reichen. Zu den von parasitärer Seite zur Überlebenseicherung eingesetzten Immunevasionsmechanismen gehört die Sekretion von Immunmodulatoren, so daß die Parasitosen durch zelluläre Hyporeaktivität und Induktion einer Th2-Antwort geprägt sind (Maizels et al., 2001; Maizels und Yazdanbakhsh, 2003; Maizels et al., 2004).

Bei der Prävention und Kontrolle von Filarieninfektionen können Vakzine aufgrund ihrer langen Wirkdauer und günstigen Herstellung eine wichtige Komponente sein. Für die Entwicklung eines solchen Impfstoffes spielt die Identifizierung und Aufdeckung der Wirkungsweise von Filarien-Immunmodulatoren eine wichtige Rolle.

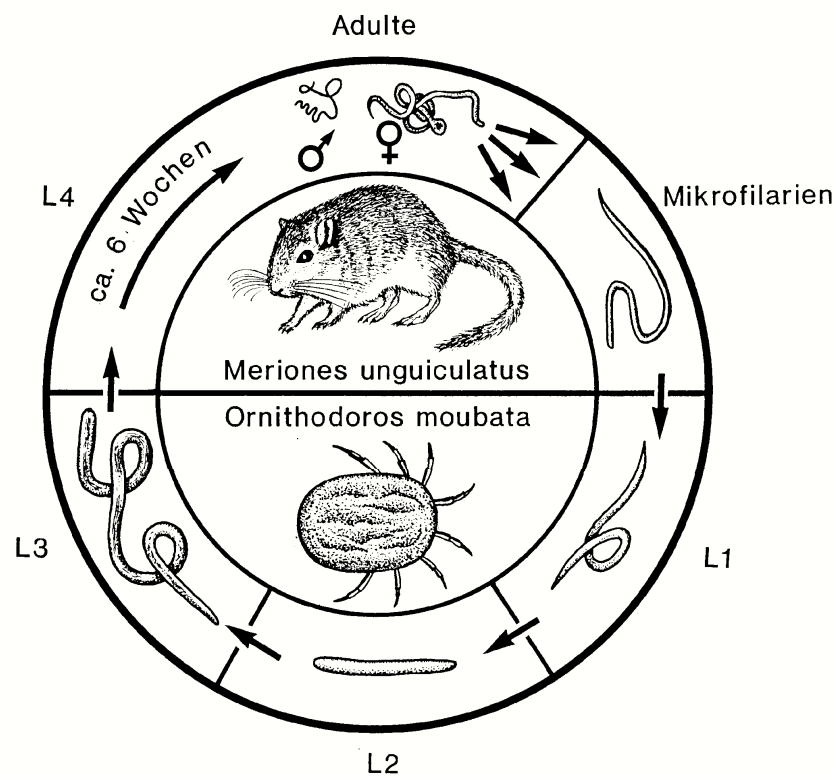


Abbildung 1: Lebenszyklus von *Acanthocheilonema viteae* (Archiv des Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie, Institut für Biologie der HU Berlin).

Als Modellsystem für humanpathogene Filarien, wurde in dieser Arbeit das unter Laborbedingungen etablierte Modellsystem der Nagetierfilarie *A. viteae* verwendet. Endwirt ist die Wüstenrennmaus *Meriones unguiculatus*, in deren subkutanen Bindegewebe die adulten *A. viteae* parasitieren. Von den viviparen Weibchen werden ungescheidete Mikrofilarien (L1) entlassen, die über die peripheren Blutgefäße in das Blut der *Meriones* gelangen. Vom Zwischenwirt, der Lederzecke *Ornithodoros moubata*, werden die zirkulierenden Mikrofilarien bei der Blutmahlzeit aufgenommen. Über zwei Häutungen entwickeln sie sich in der Zecke zur Infektionslarve L3, die dann während der Blutmahlzeit bzw. unter Laborbedingungen *per injectionem* wieder auf den Endwirt übertragen wird. Nach der Häutung zur L4 entwickeln sich hier über ein präadultes Stadium die adulten Würmer (Abbildung 1).

1.3. *Eimeria tenella*

Aviäre Eimerien-Spezies besitzen hinsichtlich der Vollendung ihres Lebenszyklus und der Induktion von Infektionen eine starke Wirtsspezifität. Sie sind meist nicht nur auf eine Wirtsspezies und bestimmte Organsysteme, sondern auch auf Abschnitte dieses Organsystems, Zelltypen und sogar auf eine bestimmte Lokalisation innerhalb der Zelle begrenzt, wobei invasive Stadien weniger wirtsspezifisch sind (Augustine, 2000).

Eimeria tenella parasitiert im Caecum von Huhn und Pute. Die Tiere nehmen über eine orale Schmutzinfektion sporulierte Oozysten als infektiöses Material auf. Bei der Magen-Darm-Passage wird die Hülle der Oozyste mechanisch (Muskelmagen) und enzymatisch (Proteasen) zerstört, so daß schließlich die freien Sporozoiten die Epithelzellen des Blinddarms penetrieren. Hier entsteht durch ungeschlechtliche Vermehrung die erste und zweite Schizontengeneration. Die reifen Merozoiten (Schizonten) der zweiten Generation gelangen in subepitheliales Gewebe der Darmzotten, wo sie Schizonten der dritten Generation bilden. Diese entwickeln sich über Gamonten zu Mikro- und Makrogameten, die nach ihrer Verschmelzung die Zygote (Oozyste) bilden. Nach der Ausscheidung mit dem Kot erfolgt unter Sauerstoffeinfluß die Sporogonie, die mit vier Sporozysten mit je zwei Sporozoiten endet (Abbildung 2).

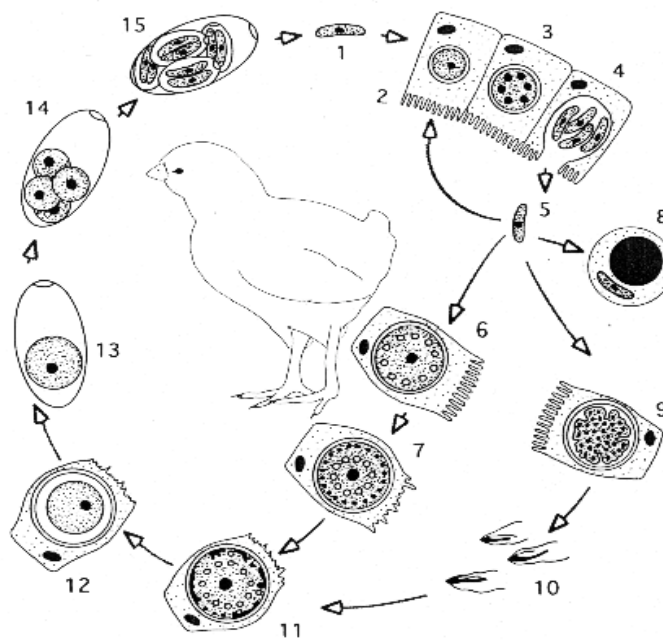


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Eimeria tenella*. 1 – Sporozoit, 2 – Trophozoit in Darmepithelzelle, 3 – Schizont, 4 – Merozoiten, 5 – freier Merozoit, 6 – Makrogametozyt, 7 – Makrogamet, 8 – Ruhestadium in subepitheliales Gewebe, 9 – Makrogamet, 10 – Zygote, 11 – Oozyste, 12 – Oozyste, 13 – Oozyste, 14 – Oozyste, 15 – Sporozysten.

intraepitheliales Lymphozyt, **9** – Mikrogametozyt, **10** – Mikrogameten, **11** – Zygote, **12** – intrazellulärer Sporont, **13** – ausgeschiedener Sporont innerhalb der Oozyste, **14** – Sporoblasten innerhalb der Oozyste, **15** – Oozyste mit Sporozysten, die Sporozoiten enthalten (aus Lucius u. Loos-Frank, 1997).

Die durch *E. tenella* verursachte Kokzidiose des Huhnes bzw. der Pute ist durch eine Zerstörung des Caecumepithels sowie des subepithelialen Gewebes einschließlich Kapillaren gekennzeichnet, was durch eine erhöhte Permeabilität zu Diarrhoe sowie starken Hämorrhagien führt. Es treten zudem bakterielle und virale Sekundärinfektionen auf. Neben Gewichtsverlust und Wachstumsdepression kann es durch den Blutverlust und durchfallbedingten Flüssigkeitsverlust zum hypovolämischen Schock und damit zum Tod der Tiere kommen. Momentan werden zur Kokzidienkontrolle Kokzidiostatika und attenuierte Lebendvakzinen eingesetzt. Die Entwicklung neuer, rekombinanter Impfstoffe ist nicht nur aus Kostengründen von Bedeutung, sondern auch vor dem Hintergrund, daß v.a. antibiotische Kokzidiostatika in absehbarer Zeit nicht mehr als Futterzusatzstoffe eingesetzt werden dürfen (IP/02/1891, EC 1831/2003).

1.4. Charakterisierung von Serinproteasen

Serinproteasen kommen in den meisten Organismen vor. Unter den Säugetierproteasen bilden sie die größte Klasse und zeichnen sich durch eine hoch konservierte Tertiärstruktur aus, wobei die Primärstrukturen z. T. stark voneinander abweichen. Diese Unterschiede sind für die Selektivität der einzelnen Serinproteasen verantwortlich. Sie besitzen im aktiven Zentrum einen katalytisch essentiellen Serinrest, der viel reaktiver ist als andere Serine im Protein (Owen und Campbell, 1999). Die Fähigkeit, Peptidbindungen zu hydrolysieren, ist bei den Serinproteasen mit der sog. katalytischen Triade verknüpft. Diese besteht aus den Aminosäuren His⁵⁷, Asp¹⁰² und Ser¹⁹⁵ (Chymotrypsin-Nummerierung), die in der Tertiärstruktur im aktiven Zentrum zusammengeführt werden (Neurath, 1984).

Nach der Aminosäuresequenz dieser katalytischen Reste werden die Trypsin-ähnlichen und Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen unterschieden. Zu den Trypsin-ähnlichen Serinproteasen gehören Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Sie zeichnen sich durch die Aminosäurereihenfolge His⁵⁷ – Asp¹⁰² – Ser¹⁹⁵ aus. Die große Ähnlichkeit zwischen diesen Serinproteasen belegt, daß sie durch Genduplikation aus einer „Ur-“Serinprotease hervorgegangen sind mit anschließender divergenter Evolution.

Subtilisin wird vom *Bacillus subtilis* sekretiert und besitzt die Aminosäurereihenfolge Asp³² – His⁶⁴ – Ser²²¹ für die Triade. Die Primär- und Sekundärstruktur weist keine erkennbare Beziehung zu den Trypsin-ähnlichen Serinproteasen auf, das aktive Zentrum jedoch ist identisch. Subtilisin und Trypsin sind ein Beispiel für konvergente Evolution (Carter und Wells, 1988; Stryer, 1995).

Serinproteasen gehen ihrer Funktion sowohl intra- als auch extrazellulär nach. Die meisten Serpinproteasen werden als inaktive Vorläufer (Zymogene) synthetisiert, die durch limitierte Proteolyse aktiviert werden. Ausnahmen sind humane Leukozytenelastase, Cathepsin G und Protein 3, die in aktiver Form in den Leukozyten gespeichert werden.

Die Funktion von Serpinproteasen kann in vier Hauptkategorien eingeteilt werden:

1. Abbau von Zielproteinen

Hierzu gehören die Verdauungsenzyme (Trypsin, Chymotrypsin und Elastase), Granzyme, die in Lymphozyten gebildet werden und vom Immunsystem vorbestimmte Zellen proteolysieren, und Myeloblastine, die mit der Degradierung von Elastin, Kollagen und Firbronektin eine wichtige Rolle bei der Wundheilung haben und durch die Degradierung extrazellulärer Matrix die Zellmigration ermöglichen.

2. Aktivierung von Proenzymen oder Zymogenen

Die Serinprotease Enterokinase beispielsweise aktiviert durch limitierte Proteolyse die Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin. Die Serinprotease Thrombin, die ihrerseits von Faktor X und Faktor V (Serinproteasen) aktiviert wird, ist verantwortlich für die Fibrinogenspaltung zu Fibrin, aber auch für die Aktivierung von Serinproteasen der Gerinnungskaskade (Faktor V, VII, VIII, XIII u.v.a.). Ebenso gehören verschiedene Serinproteasen der Komplementkaskade (C1r, C1s, C3-Konvertase) in diese Kategorie.

3. Verlust der proteolytischen Funktion

Einige Serinproteasen haben bei gleicher Tertiärstruktur wie die anderen Serinproteasen ganz andere Aufgaben entwickelt, z. B. Hepatocyte Growth Factor oder Macrophage Stimulating Protein (Stryer, 1995).

4. Aktivierung von Rezeptoren

Eine besondere Stellung besitzt die Regulation von Zellfunktionen durch einige Serinproteasen. Durch proteolytische Spaltung aktivieren sie Protease Activated Receptors

(PARs), was durch Signaltransduktion zu einer schnellen Transkription von Genen führt, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind. PAR_{1/3/4} sind das Ziel der Serinproteasen Thrombin, Trypsin und Cathepsin G, PAR₂ wird u.a. von Trypsin und Tryptase aktiviert. PARs werden von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, die in Immunantwort und Entzündungsprozesse involviert sind. Sie beeinflussen u.a. die Sekretion von Entzündungsmediatoren oder Neuropeptiden und regulieren Endothel-Leukozyten-Interaktionen (MacFarlane et al., 2001; Steinhoff et al., 2004). Serinproteasen dienen mittels PARs als Schlüsselmodulatoren von biologischen Funktionen und könnten neue Behandlungsmöglichkeiten für entzündungs- oder immunbedingte Erkrankungen eröffnen.

Um eine unkontrollierte Proteolyse und damit Schäden an funktionellen Zellen und Geweben zu verhindern, sind Protease-Inhibitoren notwendig.

1.5. Charakterisierung von Serinprotease-Inhibitoren (SPI)

Serinprotease-Inhibitoren (SPI) zeichnen sich durch einen Serinrest im aktiven Zentrum aus. Sie sind starre Proteine, wie z. B. die Angehörigen der Kunitz- und Kazal-Familie, oder metastabil wie die Serpine (Stratikos und Gettins, 1999; Silverman, 2001; Ye und Goldsmith, 2001; Plotnick et al., 2002).

SPI kontrollieren die Aktivität von Proteasen und regulieren somit zahlreiche biologische Prozesse. Sie kontrollieren proteolytische Kaskaden, wie das Gerinnungssystem oder die Komplementaktivierung und regulieren Entzündungsantworten. Sie schützen Immunzellen vor ihren eigenen zytotoxischen Proteasen (Granulozyten, Monozyten, zytotoxische Lymphozyten) oder schützen durch Beeinflussung der Zellmobilität vor Metastasen (*maspin*) (Potempa et al., 1994).

Diese regulative Funktion der SPI wird von einigen Pathogenen und Parasiten zu ihrem Vorteil gegenüber dem Wirtsorganismus genutzt. So hemmen Pockenviren die Zytolyse und Apoptose infizierter Zellen durch SPI (Komiya et al., 1994; Quan et al., 1995; Petit et al., 1996). Hämatophage Parasiten bilden SPI, die die Blutgerinnung und neutrophile Chemotaxis hemmen, so dass eine Beeinträchtigung der Blutaufnahme durch die Koagulation des Wirtsblutes und eine lokale Entzündungsreaktion mit Gewebeswellung während der Blutmahlzeit verhindert wird. (Capello et al., 1996; Tanaka et al., 1999; Menssen et al., 2001; Mulenga et al., 2001; Markwardt, 2002; Markwardt, 2002; Azzolini et al., 2003).

Einige parasitäre Nematoden sezernieren Serpine, die eine Schutzfunktion für den Parasiten auch in Form von Immunevasionsaufgaben haben (Zang et al., 1999, 2000; Milstone et al., 2000; Chu et al., 2003).

Aufgrund der starken Antigenität der Parasiten-SPI bieten sie aber gleichzeitig eine Möglichkeit der Bekämpfung. Ein Zecken-kodiertes Antikoagulant (Bm86) wird bereits erfolgreich als Vakzine gegen *Boophilus microplus* eingesetzt (Mulenga et al., 2001; Habeck 2002; Trimnell et al., 2002).

SPI werden aber auch zur Abwehr von Pathogenen und Parasiten genutzt. Beim Kürbis konnte ein Serpin isoliert werden, das eine Wirkung auf die Überlebensfähigkeit der Blattlaus zeigt. Da Pflanzen keine eigenen Serinproteasen bilden, wird für das gebildete Serpin eine Abwehrfunktion angenommen (Yoo et al., 2000). Das *Manduca sexta*-Serpin 1 hemmt bakterielle und pilzeigene Serinproteasen und kann so den Arthropoden vor mikrobiellen Proteasen und pathogenen Pilzen schützen (Jiang und Kanost, 1996).

Aufgrund starker Sequenzhomologien werden auch Proteine ohne inhibitorische Aktivität zu den SPI gezählt. Sie transportieren Hormone (Thyreoid-, Kortikosteroid-bindendes Globulin), regulieren den Blutdruck (Angiotensinogen) oder wirken als Chaperone bei der Proteinfaltung mit (HSP 47) (Silverman, 2001).

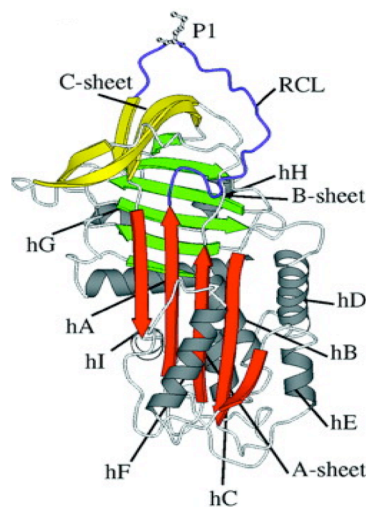
Aufgrund fehlenden aktiven Serpins oder pathologischer Effekte von Serpinpolymeren können Erkrankungen entstehen, die sog. Serpinopathien, z. B. Emphyseme bei Mangel an α_1 -Antitrypsin, Gerinnungsstörungen, Hepatitis, Hypertension oder Förderung von Alzheimer durch Antichymotrypsin, das als Chaperon für die Fibrillenformation dient (Lomas und Carrell, 2002; van Gent et al., 2003).

1.6. Bau und Funktionsweise von Serpinen

Serpine besitzen eine konservierte Tertiärstruktur, die in Abbildung 3 schematisch dargestellt ist. Sie bestehen aus drei β -Faltblättern (A-C), in der Regel neun α -Helices (A-I) und einer exponierten, mobilen Schleife, dem Reactive-Site Loop (RSL). Dieser RSL bildet das reaktive Zentrum und besitzt einen P1-Rest, der als Pseudosubstrat für die Zielprotease präsentiert wird (Suizid-Substrat-Inhibitor-Mechanismus). Nachdem die Zielprotease an den P1-Rest gebunden hat, spaltet sie den RSL an dieser Stelle. Anschließend kommt es zu einer Konformationsänderung des Serpinmoleküls, bei der der RSL mit der gebundenen Protease in das Molekül eingeführt wird, so daß die Protease vom oberen zum unteren Pol des Serpins

transloziert. Dabei kommt es zu starken Verdrehungen, v.a. im aktiven Zentrum der Protease, und zur Deformation des Moleküls durch die Kompression gegen das Serpin, was zu einer irreversiblen Hemmung der Protease führt. Die Stöchiometrie beträgt bei den Serpinen 1:1. Der Komplex aus Protease und Serpin ist empfänglicher für Clearance und Abbau. Durch die Bindung der Protease an das Serpin nimmt die Stabilität der Protease ab und ihre proteolytische Verwundbarkeit zu, was ihre Spaltung, z. B. durch Neutrophilenelelastase (NE), möglich macht. Die Spaltung der Protease im Komplex ermöglicht den lokalen Abbau vor der langsameren rezeptorabhängigen Aufnahme des Serpin-Protease-Komplexes aus der Zirkulation (Stratikos und Gettins, 1999; Huntington et al., 2000; Irving et al., 2000; Silverman et al., 2001; Ye und Goldsmith, 2001; Plotnick et al., 2002).

Die Mobilität des RSL wird durch die „Hinge“-Region (P15-P9) gewährleistet. Abweichungen von dem Konsensmuster in der Hinge-Sequenz durch Mutationen wandeln inhibitorische Serpine oft in Substrate um, die von der Protease gespalten werden anstatt die Protease zu inaktivieren (Irving et al., 2000; Whisstock et al., 2000; Silverman, 2001).



nach Silverman et al., 2001

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Serpin-Moleküls. A/B/C-sheet - β -Faltblatt A/B/C, hA-I - α -Helix A-I, RCL – Reactive-Centre Loop (=RSL – Reactive-Site Loop), P1 – P1-Rest (Pseudosubstrat).

Die Primärstruktur der Serpine ist durch eine geringe Gesamthomologie gekennzeichnet. Allerdings sind die Aminosäuresequenzen an Schlüsselpositionen, die z. B. an Konformationsänderungen des Moleküls beteiligt sind, konserviert. Dazu gehören das Serpin-Motiv und die Serpin-Signatur (siehe Anhang 1). Die Aminosäuresequenz des RSL ist hypervariabel, da dieser, v.a. mit dem P1-Rest, für die Substratselektivität verantwortlich ist

(Stratikos und Gettins, 1999; Silverman et al., 2001; Zang und Maizels, 2001; Plotnick et al., 2002).