

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Band: 138 (1996)

Heft: 3

Artikel: Die Klonierung einer Protease-Genfamilie von Fasciola hepatica mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Autor: Heussler, V. / Dobbelaere, D.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-590529>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 13.10.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Die Klonierung einer Protease-Genfamilie von *Fasciola hepatica* mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

V. Heussler und D. Dobbelaere

Zusammenfassung

Degenerierte Oligonukleotide, die für Zysteinproteasen spezifisch sind, wurden als Primer für eine PCR benutzt, um cDNS des Parasiten *Fasciola hepatica* zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden in einen Plasmidvektor kloniert und 86 Klone analysiert. Insgesamt konnten 7 unterschiedliche Teilsequenzen (Fcp1–7) mit offenem Leseraster isoliert werden, die alle signifikante Ähnlichkeit zu Zysteinproteasen hatten. Dabei ähnelten 5 Klone mehr dem Kathepsin L Typ der Zysteinproteasenfamilie, die beiden übrigen zeigten mehr Homologie zu dem Kathepsin B Typ. Mit einer speziellen Anwendung der PCR, dem sogenannten RACE (Rapid Amplifikation of cDNA Ends), konnte dann die gesamte cDNS Sequenz der Protease Fcp1 kloniert werden. Fcp1 wurde in den Expressionsvektor pGEX umklontiert und als rekombinantes Glutathion-S-Transferase-Fcp1-Fusionsprodukt (GST:Fcp1) exprimiert. Gereinigtes GST:Fcp1 wurde zur Gewinnung eines Antiserums in Kaninchen eingesetzt. Das Anti-GST:Fcp1 Antiserum erkannte in Proteinextrakten von adulten und juvenilen Leberegeln hauptsächlich zwei Proteinbanden von jeweils 30 und 38 kDa. In anderen Parasitenstadien konnten Proteine von unterschiedlichem Molekulargewicht detektiert werden, was auf eine stadienspezifische Regulierung der Expression der Zysteinproteasen hindeutet.

Schlüsselwörter: *Fasciola hepatica* – Zysteinproteasen – PCR – RACE – degenerierte Primer

Cloning of a protease gene family in *Fasciola hepatica* by PCR

RT-PCR and degenerative Oligonucleotide primers derived from conserved cysteine protease sequences were used to amplify seven different *Fasciola hepatica* cysteine protease cDNA clones (Fcp1–7). Five of the clones showed homology to proteases of the cathepsin L type, whereas two appeared to represent the cathepsin B family. The 5' and the 3' regions of Fcp1 were amplified using the rapid amplification of cDNA Ends PCR (RACE-PCR) protocol. The Fcp1 cDNA fragment was also subcloned in the expression vector pGEX and expressed as a glutathione-S-transferase (GST) fusion protein. Antibodies, raised in rabbits against the GST:Fcp1 fusion protein, were used in Western blot analysis to examine expression in different life-cycle stages of *F. hepatica*. In extracts from immature and adult parasites proteins of 30 and 38 kDa were detected. In other stages, proteins of different molecular weight were recognized by anti-GST:Fcp1 antiserum, indicating stage-specific gene expression.

Key words: *Fasciola hepatica* – cysteine protease – PCR – RACE – degenerate primer

Einleitung

Der grosse Leberegel *Fasciola hepatica* ist ein weltweit verbreiteter, parasitischer Trematode, der eine ganze Reihe verschiedener Säugerspezies befallen kann. In bestimmten Regionen besteht auch eine hohe Infektionsrate beim Menschen. Im Bereich der Veterinärmedizin hat die Fasziose hauptsächlich beim Schaf und Rind immer noch grosse ökonomische Bedeutung. Die

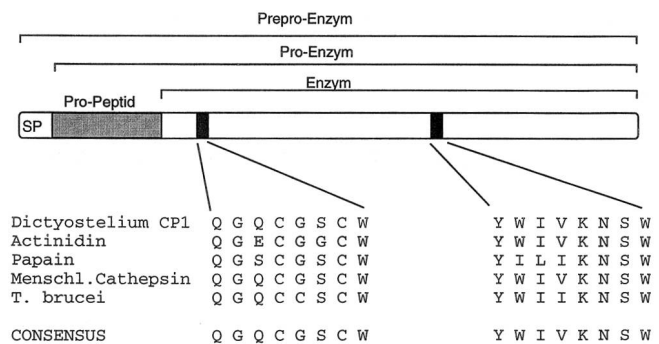
Fasziose ist eine meist chronisch verlaufende Krankheit und ruft nur gebietsweise gehäuft Todesfälle hervor. Verluste werden insbesondere durch erhebliche Minderung der Milch-, Fleisch- und Woll-Leistung bedingt. Geschlechtsreife *F. hepatica* leben in den grossen Gallengängen des Endwirtes und legen täglich bis zu 20 000 Eier ab, die mit dem Kot ins Freie gelangen. Aus den ausgeschiedenen Eiern schlüpfen unter geeigneten klimatischen Bedingungen Mirazidien (Wimperlarven), die

in die 'Leberegelschnecke' (*Lymnaea truncatula*) eindringen und sich über verschiedene Entwicklungsstadien zu Zerkarien weiter entwickeln. Diese 'Schwanzlarven' verlassen die Schnecke und enzystieren sich an Gräsern zu infektiösen Metazerkarien. Nach der Aufnahme der Metazerkarien mit der Nahrung schlüpfen die juvenilen Leberegel im Darm des Wirtes. Die 'neu exzystierten Juvenilen' (NEJ) penetrieren dann die Darmwand und wandern zur Leber, wo sie zum nächsten Stadium, den nichtgeschlechtsreifen Formen, heranreifen. Schliesslich dringen die Parasiten in die Gallengänge des Wirtes ein, und entwickeln sich, vor dem Immunsystem des Wirtes weitgehend geschützt, zu erwachsenen geschlechtsreifen Würmern.

Proteasen spielen im Lebenszyklus von *F. hepatica* eine fundamentale Rolle. Das Durchdringen der verschiedenen Organe während der Migration wird wahrscheinlich durch spezielle Proteasen, sogenannte Kollagenasen, die der Parasit ausscheidet, erleichtert (Howell, 1966). Weiterhin wurde durch verschiedene Untersuchungen belegt, dass der Parasit durch die Expression von Zysteinproteasen Teile des Immunsystems erfolgreich bekämpfen kann. So sind etwa bestimmte Fasciola-Proteasen in der Lage, Antikörper des Wirtes zu spalten und unwirksam zu machen (Chapman, 1982). Ausserdem wurde eine Kathepsin L Protease dieses Parasiten beschrieben, die das Anheften von Eosinophilen an NEJ verhindert (Carmona et al., 1992; Chapman und Mitchell, 1982). Die Fähigkeit, Proteasen wirksam gegen das Immunsystem des Wirtes einzusetzen, ist keine Eigenheit von *F. hepatica*: eine ganze Reihe unterschiedlichster Parasitenspezies wie etwa *Schistosoma mansoni* (McKerrow und Doenhoff, 1988), *Hypoderma bovis* (Chabaudie und Boulard, 1992), *Trypanosoma brucei* (Mottram et al., 1989), *Trypanosoma cruzi* (Campetella et al., 1992) und *Entamoeba histolytica* (Tannich et al., 1991) benutzen ebenfalls diese hochaktiven Enzyme, um im Wirt überleben zu können (North et al., 1990).

Von den verschiedenen Strategien, die sich für die Klonierung dieser wichtigen Moleküle anbieten, wurde die PCR-Methode gewählt. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von Zysteinproteasen verschiedenster Tier- und Pflanzenspezies, so fallen konservierte Struktur motive auf, die höchst wahrscheinlich für die enzymatische Funktion essentiell sind (Abb. 1). Von diesen identischen Aminosäuresequenzen können DNS Oligonukleotide abgeleitet werden die es erlauben, Zysteinproteasesequenzen beliebiger Spezies mittels PCR zu amplifizieren. Bei der Synthese der Oligonukleotide muss der Degeneration des genetischen Codes Rechnung getragen werden, denn die meisten Aminosäuren werden durch mehrere Nukleotid-Triplets kodiert. Aus diesem Grunde verwendet man ein Gemisch von ähnlichen DNS-Sequenzen, die entsprechend als degenerierte Oligonukleotide bezeichnet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels PCR in *F. hepatica* eine ganze Familie engverwandter Zysteinproteasen identifiziert und kloniert werden, die offensichtlich stadienspezifisch und z.T. in grossen Mengen exprimiert



'sense primer':

5' ACGGAATTC CAR GGI CAR TGY GGI XNI TGY TGG 3'
EcoRI Q G Q C G S C W

'antisense primer':

5' ACCGAATTC CCA INX RTT YTT IAC PAT CCA RTA 3'
EcoRI W S N K V I W Y

X = T or A; N = G or C; Y = T or C;
R = A or G; I = inosine; P = A or G or T

Abbildung 1: Schematisch-vereinfachte Darstellung einer Zysteinprotease.

Nach Abspaltung des Signalpeptids (SP) vom Prepro-Enzym entsteht das inaktive Pro-Enzym, das durch weitere Abspaltung der Pro-Region zur enzymatisch aktiven Protease umgewandelt wird. Weitere Spaltungen (z. B. in der Mitte des Moleküls oder im C-terminalen Bereich) – bei den individuellen Zysteinproteasen für die Aktivierung zusätzlich notwendig – sind nicht illustriert. Dunkel markierte Regionen entsprechen den hoch-konservierten Aminosäuresequenzen, die zum Entwurf der PCR-Primer verwendet wurden. Um die Klonierung der PCR-Produkte zu vereinfachen sind am 5'-Ende der Primer eine EcoRI-Schnittstelle und drei zusätzliche Basen angehängt worden.

werden. Mittels 5'- und 3'-RACE-PCR konnte die vollständige Nukleotidsequenz einer dieser Zysteinproteasen (Fcp1) bestimmt werden. Die Expression eines Fcp1 cDNS-Fragmentes in *E. coli* als Glutathion S-Transferase (GST) Fusionsprotein ermöglichte zusätzlich die Produktion Zysteinprotease-spezifischer Antikörper.

Material und Methoden

Parasiten und Bakterienstämme

Adulte *F. hepatica* wurden aus den Gallengängen infizierter Rinder isoliert, die aus dem Schlachthof Bern stammen. Die Parasiten wurden mehrmals mit PBS gewaschen und entweder direkt verwendet (für RNS-Präparationen) oder über Nacht in PBS aufbewahrt (für DNS- und Protein-Präparationen). Nicht geschlechtsreife Parasiten wurden aus dem Leberparenchym infizierter Rinder isoliert. Mirazidien wurden erhalten, indem Eier von adulten Parasiten für 10–14 Tage im Dunkeln in Leitungswas-

ser inkubiert wurden. Das Schlüpfen der Mirazidien wurde dann durch Licht induziert. Redien und Zerkarien wurden aus natürlich infizierten Schnecken (*Lymnaea truncatula*) isoliert. Metazerkarien wurden grosszügigerweise von C. Gaasenbeek (Central Diergeneeskundig Instituut, Lelystad) zur Verfügung gestellt. Das Schlüpfen von NEJ wurde durch *in vitro* Stimulierung, wie bei Carmona et al. (1992) beschrieben, initiiert. Die verschiedenen Stadien wurden für die Protein-Präparation in einem Glashomogenisierer verarbeitet. Die Homogenate wurden zentrifugiert (14,000 rpm, 10 min) und der Überstand bei -20 °C gelagert.

Für die Klonierungs- und die Expressionsarbeiten wurde der Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue verwendet.

RNS-Reinigung

Adulte Parasiten wurden in 4 M Guanidinisothiocyanat mit einem Polytron homogenisiert. Gesamt-RNS wurde nach einem abgeänderten Protokoll von Chomczynski (Chomczynski und Sacchi, 1987) extrahiert und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst (Heussler und Dobbe-laere, 1994). Poly-A⁺-RNS für die cDNS-Synthese wurde aus der Gesamt-RNS mittels Oligo-dT-Chromatographie gewonnen.

RT-PCR und das Klonieren von proteasespezifischen cDNS-Fragmenten

Poly-A⁺-RNS von adulten Leberegeln wurde mittels 'Reverse Transcriptase' (RT) in einzelsträngige cDNS überschieden. Für die PCR wurden degenerierte Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die hoch konservierten Bereichen eukaryontischer Zysteinproteasen entsprechen (siehe Abb. 1). *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen wurden an die 5'-Enden der Primer angehängt, um die Klonierung zu erleichtern. Folgendes PCR-Temperaturprofil wurde verwendet: 95 °C, 50 Sek.; 50 °C, 2 Min.; 72 °C, 3 Min. Dieser Zyklus wurde 30 mal durchlaufen, bevor zum Abschluss ein Verlängerungsschritt von 72 °C für 10 Min. hinzugefügt wurde. Amplifizierte cDNS-Fragmente wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Äthanol präzipitiert, in Wasser aufgenommen, mit *EcoRI* verdaut, und schliesslich über ein Agarosegel gereinigt. Danach erfolgte die Klonierung in den *EcoRI*-verdauten Plasmidvektor pUC19.

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-PCR

Amplifikation des 3'-Endes von Fcp1: Bei dieser Reaktion macht man sich den Poly-A-Schwanz zunutze, den nahezu alle mRNA Moleküle am 3'-Ende tragen. Man konstruiert deshalb einen Oligonukleotid-Primer mit einem Poly-dT-Teil, der komplementär zu dem mRNA-Schwanz ist. Amplifiziert wird dann mit diesem allgemein einsetzbaren Primer und einem genspezifischen Primer bekannter Sequenz (GSP1).

Amplifikation des 5'-Endes von Fcp1: Da das 5'-Ende der verschiedenen mRNA-Moleküle keine gemeinsamen Sequenzen hat (wie der 3'-Poly-A-Schwanz), muss erst *in vitro* eine geeignete Manipulation durchgeführt werden, bevor man eine Amplifikation durchführen kann. Im Anschluss an die cDNS-Synthese wird an das 3'-Ende ein Schwanz aus identischen Nukleotiden angehängt. Dazu benutzt man bevorzugt das Deoxynukleotid Guanosin und verwendet für die Amplifikation einen entsprechenden Oligo-dC-Nukleotidprimer, weil die Bindung zwischen Guanin und Cytosin stärker ist als die zwischen Adenin und Thymin. Um die für Zysteinproteasen spezifischen cDNS Moleküle von Anfang an zu selektionieren, wurde die cDNS Synthese mit einem genspezifischen Primer (GSP2) durchgeführt. Für die PCR wurden dann nacheinander zwei genspezifische Primer (GSP2 und GSP3) eingesetzt, um die Spezifität während der Reaktion zu erhöhen (GSP2 = 5' GTCACCTTGGCATAT 3'; GSP3 = 5' CCGGAATTCGTATTGACACGGACC 3'). In der Literatur bezeichnet man den zweiten, internen Primer auch als 'nested primer'.

Sequenzanalyse

Die DNS-Sequenz der Plasmidinserts wurde durch Doppelstrangsequenzierung mit einem Pharmacia T7 Kit bestimmt. DNS-Sequenz- und Aminosäuresequenz-Analyse und die Vergleiche derselben wurden mit dem GCG Programm und der GenEMBL Datenbank durchgeführt. Anhand von Übereinstimmungen in der cDNS-Sequenz liessen sich die 86 sequenzierten cDNS-Klone in sieben unterschiedliche Zysteinproteasegruppen einteilen, die als Fcp1 bis Fcp7 bezeichnet wurden.

Expression von Fcp1 in *E. coli* als GST: Fcp1 Fusionsprotein und Antikörperproduktion

Das Fcp1 cDNS-Fragment das durch PCR mit degenerierten Primern amplifiziert wurde, wurde in den Expressionsvektor pGEX umklontiert. Die Expression des GST-Fusionsprotein in *E. coli* wurde durch Zugabe von IPTG für 6 Std. induziert und die Reinigung des GST-Fusionsproteins erfolgte mittels Affinitätschromatographie über Glutathion-beads. Die Produktion von Antikörpern wurde in einem Kaninchen durch 3 subkutane Injektionen des rekombinanten, gereinigten Fusionsproteins Fcp1 in jeweils 3-wöchigem Zeitabstand induziert. Für die Immunisierung wurde eine Fusionsprotein-Emulsion (25 µg Protein) im kompletten bzw. inkompletten Freund's Adjuvans verwendet.

A

Fcp1c	MRFV.LAVL	TVGVFASND	L.....W	HQWKRIYNKE	YNGADDEHRR	NIWGNVVKHI	QEHNLRHGLG	LVTYKLGQ	FTDLTFEEFK	AKYLIEIPRS	91
HumCL	MNPTLILAAF	CLGI.ASATL	TFDHSLEAQW	TKWKAMHNL	YGMNEEGWRR	AVWEKNMKMI	ELHNQYREG	KHSFTMAMNA	FGDMTSEEFR	QVMNGFNRR	99
	*	**	* **	*	** *	*	**	*	* ** **	*	
Fcp6
Fcp4
Fcp3
Fcp2
Fcp1
Fcp1c	SELLSRGIPY	KANKLAVPES	IDWRDYVVT	EVKDQGCQS	CWAFSTTGAV	EGQFRKNERA	SASFSEQQLV	DCTRDFGNYG	CGGGMENAY	EYLKHNGLT	191
HumCL	PRGKVFQEP	LFYEA..PRS	VDWREKGYVT	PVKNQGCQS	CWAFSATGAL	EGQMFRTGR	LISLSEQNLV	DCSGPQGNEG	CNGGLMDYAF	QYVQDNGGLD	197
		* *	*** **	** *****	*****	***	*****	**	** * **	** **	
Fcp6	.ESSYPYAV	EGQCRYNEQL	GVAKVTGYT	VHSGSEVELK	NLVGSEGP	SPVDVESDFM	M.YRSGIYQS	QTCLPFALNH	AVLAVGYGT	...QDGTDYW	
Fcp4	.EGDYPYEA	DNRCRANR	GIVKVKSYT	LKNESETHSR	SWSGTRGP	VGIHADDGQ	F.YSHGIYVS	STCSSWPANH	GVLVVGYYGA	...EANSPLYW	
Fcp3	.ESSYPYRA	EGQCRYNEQL	GVAKVTGYT	VHSGDEVELQ	NLVGAGRPA	VALDVESDFM	M.YRSGIYQS	QTCSPDLNH	GVLAVGYGT	...QDGTDYW	
Fcp2	.ESSYSYRAD	EGPCQYDRQL	GVAQVSGYFI	VHSDVEVALK	NLIGVEGP	VALDVNIDFM	M.YRSGIYQD	EICSSRYLNH	AVLAVGYGT	...EDGTDYW	
Fcp1	.ESYYPYQAV	EGPCQYDGR	AYAKVTGYT	VHSGDEIELK	NLVGTEDLPA	VALDADSDFM	M.YQSGIYQS	QTCLPDLRTH	AVLAVGYGS	...QDGTDYW	
Fcp1c	.ESYYPYQAV	EGPCQYDGR	AYAKVTGYT	VHSGDEIELK	NLVGTEDLPA	VALDADSDFM	M.YQSGIYQS	QTCLPDLRTH	AVLAVGYGS	...QDGTDYW	285
HumCL	SEESYPYEA	EESCKYNPKY	SVANDTGFVD	IPKQ.EKALM	KAVATVGPIS	VAIDAGHESF	LFYKEGIYFE	PDCSSEMDH	GVLVVGYYGFE	STESDNKYYW	296
	* **	* **	* **	* **	*	*	* **	*	* **	* **	
Fcp6	IVKNSW...
Fcp4	IVKNTW...
Fcp3	IVKNTW...
Fcp2	IVKNTW...
Fcp1	IVKNSW...
Fcp1c	IVKNSWGTWW	GEDGYIRFAR	NRGNMCGIAS	LASVPMVARF	P. 326						
HumCL	LVKNSWGEW	GMGGYVKMAK	DRRNHCGLAS	AASYPTV...	.. 333						
	*****	*	* **	* **	*****	** **					

B

Fcp5	QGQGCWCWAF	GA.STMSDRI	CIASQGKHTP	VLSAENMVDC	CTSCGMCGNC	GGFPLKLG..	.SIGKKTRSC	HRWFVRIERW	MPTILVPSLR	
Fcp7	QGQGTWCWAF	GAVGAMSDRV	CIHSRQMKP	HLSARDLLSC	CEFCGRGCRG	GSPALAWDYW	KSSGIVTGGG	LEEPTGCAPY	PPPKCAHHG.	
SchiCB	GCKSIATIRD	QSRGCSWSF	GAVEAMSDRS	CIQSGGKQNV	ELSAVDLLTC	CESCLGCGE	GILGPAWDYW	VKEGIVTASS	KENHTGCEPY	FFPKCEHHT.	199
		* ** **	*** **	** **	*** **	*****	*	*****	*****	*****	
Fcp5	TSRDWTEPC	NQDVT.TPAC	KHTCRPGYNN	TYQDKWKYAR	TVYKVPADH	RIMRELLTNG	PMEVSFEVYG	DFPSYKSGVY	Q		
Fcp7	..SSGGYKPC	PEEY..PA
SchiCB	...KGKYP	GSKIYNTPRC	KQTCQRKYKT	PYTQDKHRGK	SSYNVKNDEK	AIQKEIMKYG	PVEASFVYE	DFLNYKSGIY	KHITGEALGG	HAIRIIGWV	296
	* **	* **	* **	* **	* **	* **	* **	* **	* **	* **	

Abbildung 2: Vergleich der von der DNS-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Klone Fcp1-7 (Genbank accession numbers: Z22763-22770). Eine Computeranalyse ergibt Homologien der Fcp1-4 und Fcp 6 Fragmente zu dem Kathepsin Typ L (A), während Fcp5 und Fcp7 mehr den Kathepsinen des B Types ähneln (B). Die Aminosäuren C, G und H, die zum "catalytic triad", gehören, sind durch Fettdruck hervorgehoben. HumCL entspricht dem humane Kathepsin L und SchiCB dem Schistosoma mansoni Kathepsin B (Klinkert et al., 1989).

Resultate

Isolierung und Analyse von F. hepatica-spezifischen Zysteinproteasen-Genfragmenten

Anhand der beiden konservierten Regionen der Aminosäuresequenzen von Zysteinproteasen, die zusammen das aktive Zentrum bilden, wurden degenerierte Oligonukleotid-Primer hergestellt, welche in einer RT-PCR eingesetzt wurden. Als mRNS-Quelle wurde RNS von adulten F. hepatica verwendet. Mit diesen degenerierten Zysteinproteasen-Primern wurde eine Population von cDNS-Fragmenten amplifiziert, die mit etwa 500 Bp der erwarteten Größe entsprach. Nach der Klonierung der Fragmente in den Plasmidvektor pUC19 wurden 86 Einzelklone sequenziert. Die Analyse der offenen Leseraster

der Klone resultierte in 7 verschiedenen Gensequenzen, die alle den Zysteinproteasen zugeordnet werden konnten. Innerhalb der Familie der Zysteinproteasen unterscheidet man verschiedene Typen, u.a. die lysosomalen Proteasen mit ihren typischen Vertretern Kathepsin B, H und L. Diese verschiedenen Kathepsine variieren in ihrer Substratspezifität und in ihren biologischen Funktionen. Die aufgrund der DNS-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenzen der verschiedenen F. hepatica Proteasenklone sind in Abb. 2 dargestellt und sind mit homologen Sequenzen aus der Genbank verglichen. Die Computeranalyse ergab Homologien der Fcp1-4 und Fcp 6 Fragmente zu dem Kathepsin L-Typ, während Fcp5 und Fcp7 mehr den Kathepsinen des B-Types ähnelten. Der Grad der Verwandtschaft auf Nukleotid- und Aminosäurese-

Abbildung 3: Mass der Verwandtschaft (dargestellt in % Identität) anhand von Nukleotidsequenz- und Aminosäuresequenz-Vergleich. (Oberer Teil: Aminosäuren; unterer Teil: Nucleotide).

		Aminosäuresequenz (% Identität)								
		Fcp1	Fcp2	Fcp3	Fcp4	Fcp5	Fcp6	Fcp7	HumCL	SchiCs
Nukleotidsequenz (% Identität)	Fcp1		70	78	47	30	73	30	49	29
	Fcp2	79		78	48	35	72	31	49	36
	Fcp3	85	84		51	32	84	37	50	30
	Fcp4	57	59	61		36	49	34	47	32
	Fcp5	<50	53	<50	55		30	36	45	38
	Fcp6	84	82	88	59	50		29	47	30
	Fcp7	56	57	55	<50	64	51		29	56
	HumCL	57	57	57	56	<50	56	<50		29
	SchiCs	<50	<50	<50	<50	55	<50	63	<50	

quenz Ebene ist in der Abbildung 3 zusammengefasst. In der Aminosäuresequenz können deutlich Bereiche grosser und geringer Identität erkannt werden. Obwohl die Gesamtidentität zu dem menschliche Kathepsin L bzw. zu dem *Schistosoma mansoni* Kathepsin B mit maximal 56% relativ gering ausfällt, sind die Positionen der Zysteinreste hoch konserviert. Zysteinreste sind am Aufbau der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen beteiligt und sind im Falle der Zysteinproteasen für deren enzymatische Funktion wichtig. Ebenfalls konserviert ist der Histidinrest in Position 276 der menschlichen Kathepsin L Protease. Dieser Aminosäurerest ist Teil der katalytischen Triade, die an der eigentlichen Reaktion der Enzyme, der Hydrolyse von Peptidbindungen, beteiligt ist.

Amplifikation der 3'- und 5'-Enden der Fcp1-cDNS

Die cDNS-Fragmente, die durch PCR mit degenerierten Primern amplifiziert und kloniert wurden, entsprechen nur einem Teil der vollständigen cDNS. Für die Klonierung der 3'- und 5'-flankierenden cDNS-Regionen wurde ein modifiziertes PCR-Verfahren, 'Rapid Amplification of cDNA Ends' (RACE), angewandt. Das Prinzip der RACE-PCR wurde im Einführungsartikel «Molekulare Grundlagen der PCR und neue Entwicklungen» nicht im Detail besprochen, und deshalb werden die Grundlagen vereinfacht in der Abbildung 4 dargestellt. Das Verfahren der RACE-PCR wurde im Detail von Frohman (1990a, 1990b) beschrieben. Durch das Amplifizieren des 3'- und des 5'-Endes der Fcp1-cDNS konnte die Nukleotidsequenz der vollständigen Fcp1 cDNS von insgesamt 1,1 kb, bestimmt werden. Das komplette Molekül beinhaltet einen kurzen 5'-nichttranslatierten Bereich, ein Startkodon und am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal und einen kurzen Poly-A-Schwanz. Nach der Übersetzung in die Aminosäuresequenz kann am N-Terminus des Proteins eindeutig eine Signalsequenz identifiziert werden. Dieses Merkmal ist Voraussetzung für die Sezernierung von Proteasen.

Charakterisierung des Fcp1-Produktes durch Immunoblot-Analyse

Das Fcp1-cDNS-Fragment wurde in den Expressionsvektor pGEX umklontiert und als ein GST-Fusionsprodukt, GST:Fcp1, in Bakterien exprimiert. Nach der Reinigung wurde das GST:Fcp1 Fusionsprodukt zur Antiserumproduktion in einem Kaninchen benutzt. Dieses Hyperimmunserum erkennt in Immunoblot-Analysen von Proteinextrakten verschiedener *F. hepatica*-Stadien eine ganze Reihe von Proteinen unterschiedlicher Molekulargewichte (Abb. 5). In Redien und Zerkarien wird eine Einzelbande von 48 kDa detektiert, während in Metazerkarienextrakten 2 Banden von ≈ 30 kDa und ≈ 50 kDa zu sehen sind. Ähnlich dazu erscheinen bei NEJ Proteinbanden bei 31, 50 und zusätzlich bei 62 kDa. Doppelbanden bei 30/31 und 37/38 kDa sind vorherrschend bei der Antigenpräparation von nicht geschlechtsreifen Leberegeln, schwächere Banden sind bei 29 und 35 kDa zu sehen. In adulten *F. hepatica*-Proteinextrakten erkennt das Antiserum hauptsächlich 4 Banden bei 27, 28, 30 und 38 kDa. Dalton und Hefferman (1989) haben gezeigt, dass Zysteinproteasen von *F. hepatica* ausgeschieden werden. Mit den anti-GST:Fcp1-Antikörpern konnte auch in überständen von adulten *F. hepatica*, die über Nacht im PBS gehalten wurden, Proteine mit einem Molekulargewicht von 30/31 kDa nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen über die enzymatische Aktivität konnten bestätigen, dass die 30/31 kDa-Formen die aktiven Proteasen, und die 37/38 kDa-Formen die inaktiven Proenzyme repräsentieren (Heussler und Dobbeleere, 1994).

Diskussion

Die Tatsache, dass ein einzelner PCR-Ansatz die Isolierung einer Zysteinproteasen-Genfamilie von *F. hepatica* ermöglichte, betont auf überzeugende Art und Weise die Vorteile der PCR unter Verwendung degenerierter Primer. Innerhalb kürzester Zeit konnten mit verhältnismässig einfachen Mitteln eine ganze Reihe relativ verschiedener Proteasen kloniert und analysiert werden.

Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends).

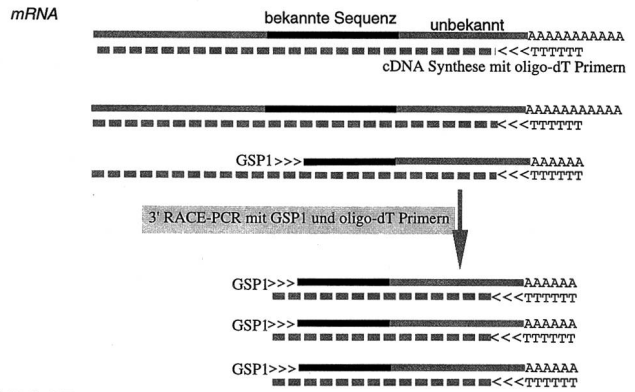
In einer normalen PCR wurde anhand von degenerierten Primern ein Teil der cDNS amplifiziert, kloniert und sequenziert (schwarzer Teil).

Die 3'-RACE-PCR ermöglicht die Amplifikation des 3'-Bereiches einer mRNA. Für die 3'-RACE-PCR werden zwei Primer eingesetzt: i) ein Oligo-dT-Primer, der sich am Poly-A-Schwanz aller mRNS anlagert und deswegen nicht Gen-spezifisch ist und ii) ein genspezifischer Primer, GSP1, der einem Bereich der schon bekannten Sequenz entspricht. Die Amplifikationsprodukte werden wie üblich in einem Plasmidvektor kloniert und sequenziert.

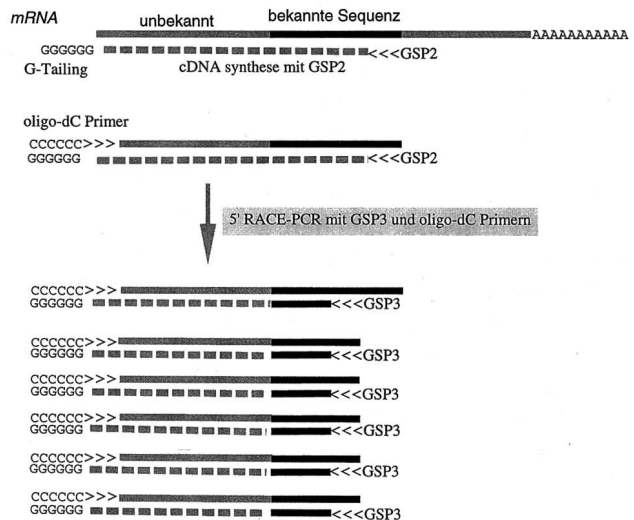
Bei der 5'-RACE wird die cDNS-Synthese nicht mit einem Oligo-dT-Primer, sondern mit einem genspezifischen Primer (GSP2) durchgeführt, der anhand der bekannten Nukleotidsequenz gewählt worden ist. Dadurch wird sichergestellt, dass fast ausschliesslich Zysteinprotease-spezifische cDNS synthetisiert werden. Im Anschluss an die cDNS-Synthese wird an die cDNS ein Guanosin-Schwanz angehängt. Dieser Poly-dG-Schwanz erlaubt die Anlagerung eines Oligo-dC-Primers. Zunächst wird eine PCR mit Oligo-dC und dem genspezifischen Primer (GSP2) durchgeführt. Anschliessend wird mit einem Teil des Amplifikationsproduktes eine weitere PCR angesetzt, in der dieses Mal als Primer Oligo-dC und GSP3 eingesetzt werden. Der GSP3-Primer ist so gewählt, dass er sich nur an cDNS-Fragmente anlagern kann, die durch PCR mit dem GSP2 und Oligo-dC entstanden sind (sogenannte 'nested Primer'). Dadurch wird die Spezifität erheblich erhöht.

Um die Klonierung zu vereinfachen sind die Oligo-dC- und GSP3-Primer mit einer Schnittstelle für Restriktionsenzyme versehen (nicht gezeichnet).

3' RACE



5' RACE



Ausserdem ist es möglich mit denselben degenerierten Primern Proteasen aus vielen anderen Eukaryonten zu amplifizieren. So wurden mit diesen Primern schon vorher Genfragmente von Zysteinproteasen ganz anderer Parasiten, wie etwa Trypanosomen, Leishmania und Amöben amplifiziert (Sakanari et al., 1989; Eakin et al., 1990; Souza et al., 1992). Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit wurden in den anderen Publikationen sehr verschiedene PCR-Bedingungen beschrieben. Der wichtigste Unterschied ist dabei die Wahl der Hybridisierungstemperatur. Wegen der Degeneration der Oligonukleotide rechnet man nicht mit einer 100%igen Komplementarität zwischen Primern und den Proteasen cDNS-Sequenzen. Damit trotzdem eine hinreichende Hybridisierung zwischen dem Primer und der cDNS stattfinden kann, muss die Stringenz der Bedingungen, also die Temperatur, in der Regel relativ niedrig gehalten werden. Die anderen Autoren haben 37 °C als optimale Hybridisierungstemperatur für das Zysteinproteasen Primerpaar

berechnet. Unter diesen Bedingungen war es aber nicht möglich, aus *F. hepatica*-cDNS ein spezifisches Amplifikationsprodukt zu erhalten. Um die Spezifität der Hybridisierung zu gewährleisten, wurde deshalb entsprechend die Temperatur erhöht. Die Hybridisierungstemperatur von 50 °C, einer Temperatur, die weit über der errechneten Schmelztemperatur des Primer-cDNS-Hybridisierens liegt, ermöglichte die Amplifikation grosser Mengen von cDNS-Fragmenten mit einer ungefähren Länge von 500 Bp. Nach der Klonierung einer kompletten Proteasen-cDNS (Fcp1) konnten, interessanterweise, 5 Misspaarungen des degenerierten Primers mit dieser cDNS über eine Länge von 24 Bp festgestellt werden. Deshalb kann die spezifische Amplifikation des Fcp1-Fragmentes nicht mit einer zufälligen Übereinstimmung der Hybridisierungspartner erklärt werden. Die RNS-Präparationen aus adulten Parasiten enthalten grosse Mengen verschiedener Proteasen mRNA-Populationen. Dies konnte durch RNS-Analysen bestätigt werden (Heussler und Dobellae-

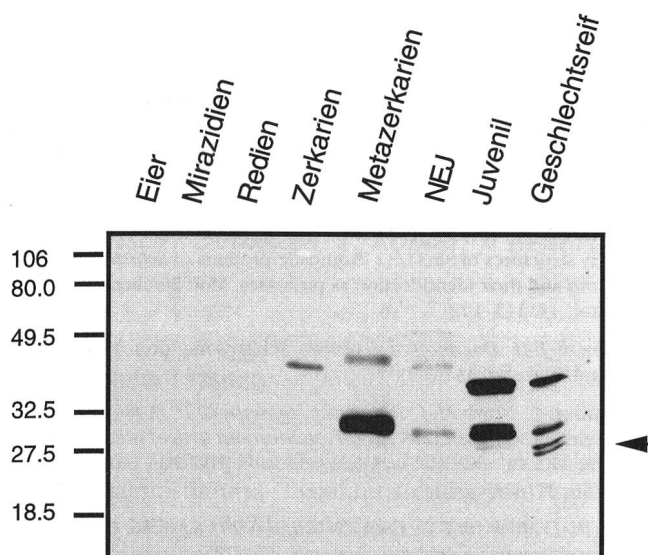


Abbildung 5: Dargestellt ist eine Immunoblot-Analyse von Proteinextrakten verschiedener *F. hepatica*-Stadien. Anti-GST: Fcp1-Antikörper erkennen Proteine unterschiedlicher Molekulargewichte. Bei Redien ist bei längerer Exposition eine Bande deutlich zu erkennen. Die Proteine bei 28/29 kDa (Pfeil) entsprechen *F. hepatica*-GST und werden auch von anti-GST-Antikörpern erkannt. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind in kDa angegeben.

re, 1994). Bei niedrigen Temperaturen kann es zu vielen unspezifischen Hybridisierungen, und damit auch zu unspezifischen Amplifikationen kommen. Bei hohen Temperaturen finden zwar nach wie vor Bindungen mit Missparungen statt, allerdings wird die Zeit, in der die Hybridisierungspartner binden, erheblich verkürzt. Deshalb ist bei einer genügend grossen Anzahl von spezifischen cDNS-Molekülen eine spezifische Amplifikation möglich. Dies zeigt deutlich, dass es sich lohnt, für jedes Experiment, die Bedingungen sorgfältig und systematisch auszutesten. Zusätzlich sollte man sich bewusst sein, dass theoretisch hergeleitete Reaktionsparameter nicht immer die erfolgreiche Amplifikation spezifischer Fragmente gewährleisten.

Neben der Tatsache, dass man auch von ganz kleinen Mengen von Ausgangsmaterial cDNS-Klone herstellen kann, bietet die PCR noch weitere Vorteile. Ein Vergleich der Nukleotid-Sequenzen zeigt deutlich, dass die Homologie der Zysteinprotease-Nukleotid-Sequenzen, die zwischen den konservierten Regionen liegen, manchmal besonders gering ist. Es ist deshalb zu erwarten, dass bei der Suche nach Zysteinprotease-cDNS-Klonen durch 'screening' einer cDNS-Bank mit einer heterologen Zysteinprotease Gen-Sonde, bestimmte cDNS-Klone wegen mangelnder Homologie nicht hybridisieren werden. Bei der PCR mit degenerierten Sequenzen hat der Mangel an Nukleotid-Homologie ausserhalb der konservierten Bereiche keinen Einfluss auf die PCR-Effizienz. Ein weiterer Weg zur Klonierung von Zysteinproteasen könnte darauf beruhen, die Zysteinproteasen zunächst so homogen

wie möglich aufzureinigen, die Aminosäuresequenz zu bestimmen und anhand dieser Information Primer für PCR oder zum 'screening' einer Genbank herzustellen. Die Aminosäurebestimmung könnte unter Umständen, insbesondere angesichts der Tatsache, dass es sich um eine ganze Familie von Zysteinproteasen handelt, schwieriger ausfallen, wie wenn es sich nur um eine einzelne Zysteinprotease handeln würde. Als Alternative könnten auch Antikörper gegen das gereinigte Protein hergestellt werden, die dann für die Suche nach Zysteinproteasen in einer *F. hepatica*-Expressions-cDNS-Bank eingesetzt werden könnten. Auch dieses Verfahren ist aufwendiger und nimmt mehr Zeit in Anspruch.

Bei der beschriebenen Amplifikation mit degenerierten Primern werden nur cDNS-Fragmente erhalten, die innerhalb der verwendeten Primer liegen; die ausserhalb der amplifizierten Region liegenden Bereiche des mRNA fehlen jedoch. Es gibt zwei Strategien um die fehlende Information zu erhalten. Die erste, herkömmliche Methode besteht darin, das zur Verfügung stehende cDNS-Fragment als Sonde zu benutzen, um damit in einer cDNS-Bank nach einer kompletten cDNS zu suchen. Probleme dabei sind die Herstellung einer cDNS-Bank guter Qualität, denn leider isoliert man auf diese Art häufig wiederum nur cDNS-Fragmente. Ausserdem muss die gesuchte cDNS in der hergestellten Bank hinreichend repräsentiert sein, weil sonst die Chance, die komplette cDNS zu finden, gering ist. Obwohl verschiedene Strategien bestehen, um diese Hürden zu umgehen, wie etwa die Anwendung von 'random primern' oder Gen-spezifischen Primern bei der Herstellung einer cDNS-Bank, erlaubt die RACE-PCR eine schnelle Lösung des Problems. Diese Methode macht die langwierige Herstellung einer cDNS-Bank unnötig und kann gleichzeitig mit kleinsten Mengen an cDNS durchgeführt werden. Wie in Material und Methoden und in Abb. 4 beschrieben, wurden dabei das 3'- und das 5'-Ende der Proteasen-cDNS Fcp1 getrennt amplifiziert und isoliert, und dann die erhaltene Information zu einem Molekül verarbeitet.

Die Klonierung durch PCR und die Expression der cDNS-Klone in *E. coli*, ermöglicht die Herstellung von Antikörpern ohne vorherige, oft mühsame und aufwendige Aufreinigung der nativen Proteine aus dem Organismus. Die Klonierung schliesst zusätzlich auch die Kontamination mit anderen Antigenen parasitärer Herkunft aus. Das Anti-GST:Fcp1-Antiserum, das in Kaninchen hergestellt wurde, erkennt mehrere verschiedene Antigene in den Proteinextrakten der Parasitenstadien. Wahrscheinlich handelt es sich bei den detektierten Proteinen um Proteasen mit gemeinsamen oder ähnlichen Epitopen. Bei der weiteren Analyse der stadienspezifischen Genexpression fällt jeweils bei Redien und Zerkarien, Metazerkarien und NEJ und schliesslich nicht-geschlechtsreifen und geschlechtsreifen Parasitenstadien ein ähnliches Proteasenmuster auf. Diese Proteasen müssen aber nicht unbedingt auch funktionell aktiv sein. Es könnten inaktive Vorläufermoleküle in einem Stadium bereit gehalten werden, die dann dem darauffolgenden Stadium gleich zur Verfügung stehen.

Die Entdeckung einer Proteasengenfamilie von *F. hepatica*, die grossen Mengen an gebildeter Proteasen-mRNAs und die starke Expression der Zysteinproteasen unterstützen eine möglicherweise wichtige Bedeutung dieser Enzyme für den Parasiten. Die Entwicklung Zysteinprotease-spezifischer Reagentien und die Herstellung rekombinanter Proteine erlauben es nun, die biologische Funktion der Proteasen und die Immunantwort des Wirtes gegen diese für den Parasiten lebenswichtigen Proteine weiter im Detail zu untersuchen. Schliesslich könnten die Parasitenproteasen auch einen Ansatzpunkt für eine gezielte Chemotherapie bei der Fasciolose von Rindern und Schafen bilden.

Literatur

- Campetella A., Henriksen J., Åslund L., Frascó A. C. C., Pettersson U., Cazzulo J. J. (1992): The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50, 225-234.
- Carmona C., Smith A., Dowd A., Dalton J. P. (1992): A *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase prevents the adherence of eosinophils to newly excysted juveniles. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 86S.
- Chabaudie N., Boulard C. (1992): Effect of hypodermin A, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae), on the bovine immune system. *Vet. Immunol Immunopathol.* 31, 167-177.
- Chapman C. B., Mitchell G. F. (1982): proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 11, 165-178.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Dalton J. P., Heffernan M. (1989): Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35, 161-166.
- Eakin A. E., Bouvier J., Sakanari J. A., Craik C. S., McKerrow, J. H. (1990): Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39, 1-8.
- Frobman, M.A. (1990a): RACE: Rapid amplification of cDNA Ends. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. (Eds.), *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp.28-38.
- Frobman M.A. (1990b): Rapid amplification of cDNA Ends (RACE): user friendly cDNS cloning. *Amplifications* 5 11-15.
- Heussler V. T., Dobbelaere, D. A. E. (1994): Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 11-23
- Howel R. M. (1966): Collagenase activity of immature *Fasciola hepatica*. *Nature* 209, 713-714.
- Klinkert M.-Q., Felleisen R., Link G., Ruppel A., Beck E. (1989): Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 113-122.
- McKerrow J. H., Doenboff M. J. (1988): Schistosome proteases. *Parasitol. Today* 4, 334-340.
- Mottram J. C., North M. J., Barry D. J., Coombs G. H. (1989): A cysteine proteinase cDNS from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 258, 211-215.
- North M. J., Mottram J. C., Coombs G. H. (1990): Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol. Today* 6, 270-275.
- Sakanari J. A., Staunton C. E., Eakin A. E., Craik C. S., McKerrow, J. H. (1989): Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4863-4867.
- Souza A. E., Waugh S., Coombs G. H., Mottram J. C. (1992): Characterisation of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 311, 124-127.
- Tannich E., Scholze, H., Nickel R., Horstmann, R. D. (1991): Homologous cysteine proteases of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. Differences in structure and expression. *J. Biol. Chem.* 266, 4798-4803.

Dank

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Gesuch 31.28712.90) und vom Victor und Erna Hasselbald Foundation, unterstützt. Die Autoren danken Richard Felleisen, Gerrit Hagens und Isabel Roditi für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und für konstruktive Kritik.

Korrespondenzadresse: D. Dobbelaere, Institut für Tierpathologie, Postfach 2735, CH-3001 Bern