

	Abkürzungsverzeichnis	A
	Zusammenfassung	C
	Summary	D
1.	Einleitung	1
1.1.	<i>Caenorhabditis elegans</i> – ein Nematodenmodell	1
1.2.	<i>Acanthocheilonema viteae</i> – ein Filarienmodell	1
1.3.	<i>Eimeria tenella</i>	3
1.4.	Charakterisierung von Serinproteasen	4
1.5.	Charakterisierung von Serinprotease-Inhibitoren	6
1.6.	Bau von Serpinen	7
2.	Ziele der Arbeit	10
3.	Ergebnisse	11
3.1.	Klonierung und Expression von rCe-Serpin und rEt-Serpin	11
3.1.1.	Klonierung eines <i>C. elegans</i> -Serpin	11
3.1.2.	Klonierung eines <i>E. tenella</i> -Serpin	12
3.1.3.	Expression von rCe-Serpin und rEt-Serpin	13
3.2.	Klonierung und Expression eines <i>A. viteae</i> -Serpin	15
3.3.	Aminosäureabgleich der isolierten Sequenzen	23
3.4.	Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften	24
3.5.	Immunologische Untersuchungen	33
3.5.1.	Reaktivität von polyklonalen Antiseren gegen rekombinantes Ce-Serpin und Et-Serpin	33
3.5.2.	Einfluß von rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin auf die Proliferation von Mausmilzzellen	34
3.5.2.1.	Einfluß von rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin auf die Proliferation polyklonal stimulierter Milzzellen von BALB/c- und OVA-Mäusen	35
3.5.2.2.	Einfluß von rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin auf die Proliferation antigenspezifisch stimulierter Milzzellen von BALB/c- und OVA-Mäusen	38
3.5.3.	Einfluß von rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin auf die Zytokinproduktion polyklonal stimulierter Milzzellen von OVA-Mäusen	40
4.	Diskussion	41
4.1.	Struktur- und Funktionsanalyse von Serpinen	42
4.2.	Funktionsstudien zu rCe-Serpin, rAv-Serpin und rEt-Serpin	44
4.2.1.	Wirkung von rCe-Serpin, rAv-Serpin und rEt-Serpin auf Proteasen	44
4.2.2.	Einfluß von rCe-Serpin, rAv-Serpin und rEt-Serpin auf die Proliferation polyklonal und antigenspezifisch stimulierter Mausmilzzellen	48
5.	Schlußfolgerung	52
6.	Methoden	53
6.1.	Gewinnung von Parasitenmaterial	53
6.1.1.	Gewinnung von <i>A. viteae</i> -Mikrofilarien und adulten <i>A. viteae</i> -Würmern	53
6.1.2.	Herstellung von <i>A. viteae</i> -Antigenextrakt	53
6.1.3.	Herstellung von <i>C. elegans</i> -Antigenextrakt	54
6.1.4.	Herstellung von <i>E. tenella</i> -Merozoiten-Antigenextrakt	54
6.2.	Molekularbiologische Methoden	54
6.2.1.	RNA-Isolierung	54
6.2.2.	Reverse Transkription	54
6.2.3.	PCR	55
6.2.4.	RACE-PCR	57
6.2.5.	Inverse PCR	57
6.2.6.	Agarosegelelektrophorese	58
6.2.7.	Isolierung von DNA-Fragmenten	58

6.2.8.	Bestimmung der RNA- und DNA-Konzentrationen	58
6.2.9.	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten und Vektor	59
6.2.10.	Dephosphorylierung von DNA	59
6.2.11.	Ligation in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy	59
6.2.12.	Ligation in den Expressionsvektor pET 28a(+)	60
6.2.13.	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	60
6.2.14.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien mit Plasmid-DNA	60
6.2.15.	Identifizierung positiver bakterieller Transformanten	61
6.2.15.1.	Blau-Weiß-Screening	61
6.2.15.2.	Kolonie-PCR	61
6.2.15.3.	Plasmidpräparation und Restriktionsverdau	61
6.2.16.	Plasmidpräparation	62
6.2.17.	Plaque Screening	62
6.2.17.1.	DNA-Markierung mit Digoxigenin	62
6.2.17.2.	Ausplattieren der Phagenbank	62
6.2.17.3.	Transfer der Phagen-DNA auf Nylonmembran	63
6.2.17.4.	Hybridisierung mit DIG-markierter DNA und immunologische Detektion	63
6.2.18.	<i>In vivo</i> -Exzision	64
6.2.19.	Langzeitlagerung von Bakterien	64
6.2.20.	Sequenzanalyse	65
6.3.	Biochemische Methoden	65
6.3.1.	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	65
6.3.1.1.	Induktion	65
6.3.1.2.	Löslichkeitstest	65
6.3.1.3.	Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie	66
6.3.2.	Aufreinigung von nativem <i>A. viteae</i> -Serpine mittels Gelchromatographie	67
6.3.3.	Aufreinigung von nativem <i>A. viteae</i> -Serpine mittels Trypsin-Sepharose-Affinitätschromatographie	67
6.3.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test	67
6.3.5.	Tests zur inhibitorischen Aktivität der potentiellen Serpine	68
6.3.6.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	68
6.4.	Immunologische Methoden	69
6.4.1.	Western-Blot	69
6.4.2.	Immunisierung von BALB/c-Mäusen	69
6.4.3.	Zytokin-ELISA	70
6.5.	Methoden der Zellkultur	70
6.5.1.	Präparation von Mausmilzzellen	70
6.5.2.	Polyklonale Stimulation	70
6.5.3.	Antigenspezifische Stimulation	71
6.5.4.	Ernten ³ H-Thymidin-markierter Zellen und Szintillationsmessung	71
6.6.	Datenverarbeitung	71
7.	Material	72
7.1.	Laborgeräte	72
7.2.	Verbrauchsmaterial	72
7.3.	Reagenzien	72
7.4.	Enzyme	73
7.5.	Kommerzielle Kits	74
7.6.	Synthetische Oligonukleotide	74
7.7.	Plasmide, cDNA/RNA und <i>E. coli</i> -Stämme	75
7.8.	Puffer und Lösungen	75
7.8.1.	RT-PCR	75
7.8.2.	Agarosegelelektrophorese	75
7.8.3.	Plasmidpräparation	75
7.8.4.	Medien	75
7.8.5.	Antibiotika	76
7.8.6.	SDS-PAGE	76
7.8.7.	Western-Blot	77
7.8.8.	Plaque Screening	77
7.8.9.	Löslichkeitstest von Proteinen	78
7.8.10.	Proteinaufreinigung	78

Inhaltsverzeichnis

7.8.11.	Aktivitätstests	79
7.8.12.	Medien für die Zellkultur	80
7.8.13.	Mikrofilariengewinnung	80
7.9.	Antikörper und Konjugate	80
7.10.	Tiere	81
8.	Literatur	82
9.	Vorträge und Poster	88
10.	Anhang	89
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Selbständigkeitserklärung	