

4. Diskussion

Parasitäre Nematoden persistieren lange in ihren Wirten. Das ist u.a. möglich, indem sie dem Immunsystem des Wirtes ausweichen oder es zu ihren Gunsten verändern. Neben verschiedenen anderen Mechanismen nutzen Filarien Immunmodulatoren, die sie sekretieren. Dazu gehören Phosphorylcholin (Goodridge et al., 2001) und Glutathion-S-Transferase (Liebau et al., 2000), aber auch Zytokin-Homologa, z. B. von TGF- β (Gomez-Escobar et al., 2000) oder MIF (Pastrana et al., 1998), und Protease-Inhibitoren. Hierbei ist für die Cysteinprotease-Inhibitoren bereits gezeigt worden, daß sie sowohl die polyklonale als auch die Antigen-spezifische T-Zell-Proliferation inhibieren. Indem die Cysteinproteasen Cathepsin L und S gehemmt werden, kommt es zu einer Beeinträchtigung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation, was eine Verminderung der Antigen-spezifischen Proliferation bewirkt. Außerdem führen Filarien-Cystatine zu einer Hochregulation von IL-10 und der induzierbaren NO-Synthese (Hartmann et al., 1997; Manoury et al., 2001; Schönemeyer et al., 2001; Hartmann et al., 2002; Pfaff et al., 2002).

Serinprotease-Inhibitoren (SPI) werden von parasitären Nematoden u.a. genutzt, um ihr Überleben im Wirt zu sichern. *Ancylostoma ceylanicum*, der während seines Aufenthaltes im Dünndarm hochaktiven Verdauungsenzymen ausgesetzt ist, sezerniert einen SPI (AceKI-1), der Trypsin, Chymotrypsin und Pankreaselastase inhibiert, aber auch Neutrophilen Elastase, so daß eine Schutzfunktion für den Parasiten im Dünndarm und Immunevasionsaufgaben für den SPI angenommen werden (Milestone et al., 2000; Chu et al., 2003). Ebenso sezerniert der Darmnematode *Ascaris suum* einen SPI, der in der Lage ist, intestinale Proteasen zu neutralisieren (Nguyen et al., 1998). Die in Blut- und Lymphgefäßen lebende Filarie *Brugia malayi* kann mit ihrem Serpin 1 die Blutgerinnung unterdrücken (Yenbutr und Scott, 1995). Der hämatophage Hakenwurm *Ancylostoma caninum* verhindert die Blutgerinnung durch die Hemmung des humanen Gerinnungsfaktors FXa mittels SPI (Capello et al., 1996). Darüberhinaus wurden SPI von parasitären Nematoden als Immunmodulatoren identifiziert. So führt das *Brugia malayi*-Serpin 2 zu einer Hemmung der Antigen-spezifischen T-Zell-Proliferation und inhibiert die Serinproteasen Cathepsin G und Elastase von Neutrophilen. Es wird ausschließlich von den im Blut zirkulierenden Mikrofilarien sezerniert, die sich so gegen die Wirtsabwehr schützen können. Aufgrund seiner evasiven Funktion hat das Bm-SPN-2 eine Schlüsselrolle im Lebenszyklus des Parasiten und stellt somit einen guten Angriffspunkt für die Bekämpfung dieser Filarie dar (Yenbutr und Scott, 1995; Zang et al., 1999; Zang et al.,

2000). *Trichuris suis* exprimiert einen Serinprotease-Inhibitor (TsCEI), der Chymase, Neutrophilen-Elastase und -Cathepsin G hemmt und somit die Mukosa-Immunität des Wirtes supprimiert (Rhoads et al., 2000). Diese SPI greifen in das Immunsystem des Wirtes ein und fördern dadurch die Persistenz des Parasiten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß ein rekombinantes Serpin des Bodennematoden *C. elegans* Trypsin und Cathepsin G sowie die polyklonale und Antigen-spezifische T-Zell-Proliferation hemmt und die Bildung von IL-10 erhöht. Des weiteren ist eine inhibitorische Wirkung eines rekombinanten Serpin des parasitär lebenden Protozoen *E. tenella* auf Trypsin, Chymotrypsin, Pankreaselastase und Cathepsin G sowie die polyklonale T-Zell-Proliferation nachgewiesen worden.

4.1. Struktur- und Funktionsanalyse von Serpinen

Serpine besitzen als reaktives Zentrum eine exponierte mobile Schleife, den Reactive Site Loop (RSL). Dieser hypervariable RSL, der die Substratspezifität bestimmt, wird von zwei konservierten Aminosäurebereichen, dem Serpin-Motiv und der Serpin-Signatur, flankiert (Zang und Maizels, 2001; Silverman et al., 2001; Plotnick et al., 2002). Mit Hilfe des Abgleiches mit anderen Serpinen (Bm-SPN-2, TS11-1) wurde für die in dieser Arbeit isolierten Sequenzen Serpin-Motiv, Serpin-Signatur und RSL bestimmt (Abbildung 5). Eine exakte Zuordnung könnte über eine 3D-Strukturanalyse (Whisstock et al., 2000; Irving et al., 2003) oder durch proteolytische Spaltungsstudien erfolgen (Kaslik et al., 1995; Pak et al., 2004). Das N-terminal vom RSL liegende Serpin-Motiv und der N-terminale Bereich des RSL selbst beinhalten die sogenannte Hinge-Region, die für die Mobilität des RSL verantwortlich ist. Die Konsensus-Sequenz für diese Region ($EX_1GTEAAAX_2T$) sorgt für eine optimale Beweglichkeit des RSL, während Abweichungen von dieser Sequenz zu nicht-inhibitorischen Serpinen mit reiner Substratfunktion führen, da der RSL nicht ausreichend schnell oder gar nicht inseriert wird (Irving et al., 2000; Whisstock et al., 2000). In einer solchen Situation kann sich die Protease nach der Spaltung des RSL vom Serpin lösen und liegt wieder in aktiver Form vor, während das Serpin gespalten und irreversibel inaktiviert ist. Dieser nicht-inhibitorische oder Substrat-Weg der aufgrund ihrer Struktur den Serpinen zugeordneten Proteine dient wahrscheinlich als wichtiger Regulationsmechanismus bei Entzündungen (Irving et al., 2000; Whisstock et al., 2000; Silverman, 2001).

Für Bm-SPN-2, eines der beiden identifizierten Serpine von *Brugia malayi*, konnte gezeigt werden, daß es ein nicht-inhibitorisches Serpin ist. Es besitzt ein für inhibitorische Serpine atypisches reaktives Zentrum, unterliegt keiner Konformationsänderung während des Inhibitionsprozesses und bildet keinen Komplex mit Serpinproteasen incl. HNE und Cathepsin G. Vielmehr stellt es ein sehr effizientes Substrat dieser beiden Serpinproteasen dar und konkurriert mit dem chromogenen Substrat um diese, weshalb Zang et al. (1999) eine inhibitorische Aktivität von Bm-SPN-2 annahmen (Stanley und Stein, 2003). Das rekombinante Serpin von *Entamoeba histolytica* zeigte bei der Inkubation mit Trypsin keine Komplexbildung mit der Serpinprotease, sondern wurde nahe des C-Terminus gespalten, was typisch für den nicht-inhibitorischen Weg ist (Riahi et al., 2004). Dieses Verhalten konnte auch für rEt-Serpin bei der Inkubation mit Trypsin gezeigt werden so wie es für das Bm-SPN-2 nachgewiesen worden ist.

Die Aminosäuresequenz für diesen Bereich von *C. elegans* (EEGTKA₄) und *E. tenella* (EEGTEATAA) stimmen zu 54% und 63% mit der Konsensussequenz überein, Av-Serpin (EEKKLA₃K) dagegen zeigt nur eine Übereinstimmung von 36%, v.a. im Bereich P15 bis P13 treten deutliche Abweichungen auf.

Die C-terminal vom RSL liegende Serpin-Signatur gehört zu den starren Fragmenten des Proteins (Whisstock et al., 2000), die während der Konformationsänderung des Serpins keiner Strukturveränderung unterliegen. Die Übereinstimmung der isolierten Sequenzen von *C. elegans*, *E. tenella* und *A. viteae* mit den Serpinen von *B. malayi* und *T. spiralis* beträgt für die Serpin-Signatur 76% (Ce-Serpin), 45% (Av-Serpin) und 60% (Et-Serpin), so daß Av-Serpin die am wenigsten konservierte Serpin-Signatur der isolierten Sequenzen aufweist.

Der P1-Rest des RSL ist meist für die Substratspezifität verantwortlich. Dabei sollen die Aminosäuren Lysin und Arginin an der P1-Position zu einer bevorzugten Inhibition von Trypsin, die Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin, Leucin und z. T. Methionin zur Inhibition von Chymotrypsin und Valin und Alanin zu einer Hemmung von Elastase führen (Simonet et al., 2002). Für Ce-Serpin kann aufgrund des Aminosäureabgleichs mit den Serpinen von *Brugia malayi* und *Trichinella spiralis* Lysin und somit eine bevorzugte Inhibition von Trypsin und für Et-Serpin aufgrund der Aminosäure Arginin ebenfalls eine starke Tendenz zur Trypsinhemmung angenommen werden. Dies konnte durch die Aktivitätstests (Kapitel 3.4.) bestätigt werden. Da Av-Serpin keine hochkonservierten Aminosäuren im Bereich von Serpin-Motiv und Serpin-Signatur besitzt und bei der angenommenen Zuordnung dieser konservierten Regionen zur Av-Serpin-Sequenz ein verkürzter RSL vorhanden ist, ist die

Bestimmung des P1-Restes mit Hilfe des Aminosäureabgleiches nicht eindeutig möglich, weshalb hier keine theoretische Präferenz für ein Substrat angenommen werden kann.

4.2. Funktionsstudien zu rCe-Serpin, rAv-Serpin und rEt-Serpin

4.2.1. Wirkung von rCe-Serpin, rAv-Serpin und rEt-Serpin auf Proteasen

SPI besitzen vielfältige Funktionen. Durch die Inhibition von Proteasen bieten sie zum einen die Möglichkeit, vom Organismus selbst gebildete Proteasen in ihrer Aktivität zu regulieren und somit zu kontrollieren. Für Protozoen ist bekannt, daß Serinproteasen bei der Zellinvasion eine wichtige Rolle spielen. So ist eine Serinprotease von *Plasmodium falciparum* an der Degradation der Erythrozytenmembran während des Invasionsprozesses beteiligt (Roggwiller et al., 1996). Bei *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria vermiformis* und *Eimeria tenella* sowie *Toxoplasma gondii* konnte mittels SPI die Invasion von Wirtszellen vermindert werden (Adams und Bushell, 1988; Fuller und McDougald, 1990; Forney et al., 1996; Conseil et al., 1998). Bei der aktiven Invasion von *Toxoplasma gondii* ist ein Trypsin-ähnliches Protein an der Induktion der Parasitenbewegung beteiligt (Mondragon et al., 1994). Ein negativer Effekt verschiedener SPI auf Wachstum und Replikation von *Toxoplasma gondii* konnte ebenfalls gezeigt werden (Shaw et al., 2001).

Eine weitere Funktion von SPI besteht darin, daß auch Fremdproteasen gehemmt werden können, was einen Schutz vor Pathogenen bedeuten kann. Extrazelluläre Serinproteasen des Subtilisin-Typs werden von verschiedenen nematophagen Pilzen gebildet und sind als Virulenzfaktoren an der Infektion beteiligt. Sie können durch Proteinabbau die Kutikula oder Eihülle des Nematoden zerstören und so die Penetration durch pathogene Pilze wie *Verticillium suchlasporium*, *Arthrobotrys oligospora* oder *Paecilomyces lilacinus* fördern (Huang et al., 2004). Aus dem Phloem-Exsudat des Kürbis *Cucurbita maxima* wurde ein Serpin isoliert, das *in vivo* die Reproduktions- und Überlebensfähigkeit der Blattlaus auf der Pflanze reduziert (Yoo et al., 2000). Die Kartoffel produziert einen Trypsin-Chymotrypsin-Proteaseinhibitor, dessen antimikrobielle Aktivität nicht nur gegen Pflanzenpathogene (*Rhizoctonia solani*, *Clavibacter michiganense*), sondern auch gegen den humanpathogenen *Candida albicans* gerichtet ist (Kim et al., 2005). Zang und Maizels (2001) nehmen für *C. elegans*-Serpine neben der endogenen Funktion auch eine Schutzfunktion vor Proteasen von pathogenen Mikroorganismen an.

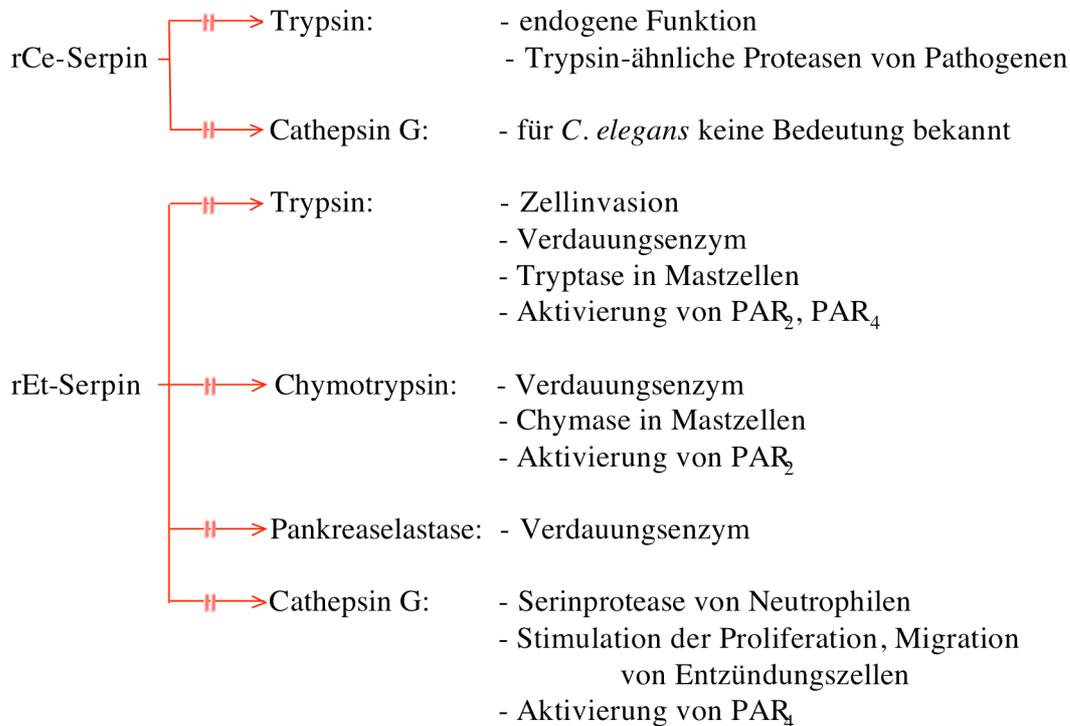
Das *C. elegans*-Genom kodiert für sieben verschiedene Trypsine (www.wormbase.org). Das rCe-Serpin besitzt Trypsinspezifität, es könnte die von Zang und Maizels (2001) beschriebenen Aufgaben wahrnehmen.

Zum anderen können SPI Parasiten vor Wirtsproteasen schützen und dadurch das Überleben im Wirt positiv beeinflussen. SPI von *Anisakis simplex* und *Ascaris suum* sind starke Inhibitoren von porciner Pankreaselastase und humaner Leukozytenelastase (*A. simplex*) bzw. Chymotrypsin (*A. suum*) (Nguyen et al., 1999). Der in der Subkutis von *Ancylostoma ceylanicum* lokalisierte SPI (AcKI) hemmt Trypsin, Chymotrypsin und Pankreaselastase auf der Wurmoberfläche (Milstone et al., 2000; Chu et al., 2003). *Trichuris suis*, der in der Mukosa seines Wirtes parasitiert, sezerniert einen Chymotrypsin- und Pankreaselastase-spezifischen Proteaseinhibitor, der darüberhinaus Neutrophilenelastase, Cathepsin G und die vorrangig von intestinalen Mukosa-Mastzellen sezernierte Chymase inhibiert (Rhoads et al., 2000). Somit konnten bei diesen Parasiten, die den Magen-Darm-Trakt besiedeln oder innerhalb ihres Lebenszyklus passieren, SPI isoliert werden, die u.a. Verdauungsenzyme neutralisieren. Durch die Inhibition von Neutrophilenelastase, Cathepsin G und Chymase besitzen die SPI von *A. simplex*, *A. ceylanicum* und *T. suis* immunmodulatorischen Eigenschaften. Diese Fähigkeiten besitzt auch das stadienspezifisch exprimierte Bm-SPN-2 der *Brugia malayi*-Mikrofilarien, das humane Neutrophilenelastase und Cathepsin G hemmt (Zang et al., 1999). Auch für das rCe-Serpin konnte eine inhibitorische Wirkung auf Cathepsin G nachgewiesen werden.

Parasitäre Protozoen wie *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* und *Eimeria* spp. passieren unbeschädigt den oberen Gastrointestinaltrakt bzw. persistieren sogar dort. Für *T. gondii* konnten bereits mehrere SPI nachgewiesen werden, die sezerniert (TgPI) oder oberflächenassoziiert (TgTI) den Parasiten resistent gegen Verdauungsenzyme machen können. Hierbei konnte für TgPI-2 und TgTI eine inhibitorische Wirkung für Trypsin und für TgPI-1 außerdem für Chymotrypsin, Pankreaselastase, Neutrophilenelastase und Thrombin gezeigt werden. Aufgrund des breiten Proteasespektrums wird für TgPI-1 eine Schlüsselfunktion im Lebenszyklus von *T. gondii* angenommen (Pszenny et al., 2000; Lindh et al., 2001; Morris et al., 2002; Morris und Carruthers, 2003). *N. caninum* verfügt über einen SPI mit inhibitorischer Wirkung gegenüber Trypsin, Chymotrypsin und humaner Neutrophilenelastase und Subtilisin (Bruno et al., 2004). Außer mit Verdauungsenzymen können diese Parasiten durch die Inhibition von humaner Neutrophilenelastase mit Hilfe der SPI somit auch mit dem Immunsystem des Wirtes interagieren und Angriffen der Wirtsabwehr ausweichen. Das rEt-Serpin des intestinalen Parasiten inhibiert sowohl Trypsin,

Chymotrypsin und porcine Pankreaselastase als auch die Neutrophileneelastase und Cathepsin G.

Inhibitorische Eigenschaften



Schema 3: Inhibitorische Eigenschaften von rCe-Serpin und rEt-Serpin. Dargestellt sind die durch rCe-Serpin und rEt-Serpin inhibierten Serinproteasen und ihre bisher bekannte Bedeutung für den Bodennematoden *C. elegans* bzw. den protozoären Parasiten *E. tenella*. Außerdem sind die für die Wechselwirkung der beiden Organismen mit ihrem Habitat (*C. elegans*: v.a. ubiquitäre Mikroorganismen; *E. tenella*: Gastrointestinaltrakt und Effektormechanismen des Immunsystems des Wirtes) bedeutsamen Funktionen der Serinproteasen aufgeführt.

Serinproteasen von Neutrophilen verstärken durch limitierte Proteolyse von CXC-Chemokinen deren Wirkung auf Neutrophile. Beispielsweise bewirkt Cathepsin G durch die Fragmentierung des epithelial cell-derived neutrophil-activating protein-78 (ENA-78) eine Verdopplung seiner Neutrophilen-Chemotaxis und eine Erhöhung seiner Elastase-freisetzenden Aktivität (Nufer et. al., 1998).

Zudem sind Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) beschrieben, die durch bestimmte Serinproteasen aktiviert werden, was zu einer Signaltransduktion und oft zur Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren und Zytokine führt. Durch die Inhibition von Trypsin und

Mastzelltryptase unterbleibt die Aktivierung von PAR₂, für den eine proinflammatorische Wirkung beschrieben ist, die beim Menschen auf einer Degranulation und Steigerung der Superoxid-Bildung der Eosinophilen, einer Förderung der Motilität der Neutrophilen beruht, bei Ratten-Leukozyten werden Rolling, Adhäsion und Migration gesteigert (Vergnolle et al., 2002) und im Maudarm wird eine Infiltration mit Granulozyten, eine erhöhte Wanddicke und die Ausschüttung von Th1-Zytokinen hervorgerufen. PAR₄ werden ebenfalls von Trypsin und außerdem von Cathepsin G aktiviert und haben die gleiche Wirkung auf Ratten-Leukozyten wie PAR₂ (MacFarlane et al., 2001; Steinhoff et al., 2004). Für PAR₂ ist außerdem eine Wirkung auf die Kolonmotilität bei Ratten beschrieben, die auf einem Kalziumanstieg in den Myozyten beruht (Corvera et al., 1997). Hierbei kommt es zu einer verminderten spontanen Kontraktion der Ringmuskulatur und zu Kontraktionen der Längsmuskulatur des Kolons, was zu einer Propulsion führt (Mulè et al., 2002).

Die im Vergleich zum rEt-Serpin acht- bis elfmal geringere inhibitorische Aktivität des rCe-Serpin kann durch die nicht exprimierte potentielle Signalsequenz verursacht sein, die zwar hydrophobe Eigenschaften aufweist und damit die Expression in *E. coli* negativ beeinflusst, aber evtl. wichtige Funktionen beim Aufbau der dreidimensionalen Proteinstruktur und damit der optimalen Funktionsweise des Proteins hat. Für diese Hypothese spricht auch, daß nach Zang und Maizels (2001) Serpine von *C. elegans* aufgrund ihrer hauptsächlich endogenen Funktion gar keine Signalpeptide besitzen. Außerdem kann die Proteinaufreinigung zu einer verminderten Menge an aktivem Serpin führen, so daß nach Ausschluß der potentiellen Signalsequenz als Ursache für die geringere Inhibitionsaktivität des rCe-Serpin eine Optimierung der Proteinaufreinigung (Kühlung des rekombinanten Proteins während der Aufreinigung, Verminderung der Harnstoffmengen in den Puffern, Optimierung der Umpufferung und Dialyse) vorgenommen werden müßte. Sollten diese Veränderungen nicht zu einer höheren inhibitorischen Aktivität führen, muß beim rCe-Serpin von einer geringeren Eigenaktivität ausgegangen werden.

Im Gegensatz zur theoretischen Stöchiometrie von 1:1 wurde bei dem SPI von *N. caninum* bei einem molaren Verhältnis rNcPI-S zu Enzym von 4:1 eine Inhibition von 50% bei Trypsin, von 90% bei Chymotrypsin und von 40% bei humaner Neutrophilenelastase erreicht (Bruno et al., 2003).

C. elegans-Serpin 2 hatte einen SI (Stöchiometrie der Inhibition)-Wert von 1,75 bei Granzym B, von 3 bei Cathepsin V, von 10 bei Cathepsin K und L und nur bei Cathepsin S den Wert 1 (Pak et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde beim rCe-Serpin bei einem molaren Verhältnis von 25:1 (Inhibitor zu Enzym) eine Inhibition von 17% bei Trypsin und bei einem molaren Verhältnis von 20:1 eine Inhibition von 44% bei Cathepsin G erzielt. rEt-Serpin inhibierte jeweils zu 100% das Enzym bei einem molaren Verhältnis von 12,5:1 bei Trypsin, von 25:1 bei Chymotrypsin und porciner Pankreaselastase und von 6:1 bei Cathepsin G.

4.2.2. Einfluß von rCe-Serpin, rAv-Serpin und rEt-Serpin auf die Proliferation polyklonal und antigenspezifisch stimulierten Mausmilzzellen

Ein Hauptfaktor für die z. T. langjährige Persistenz parasitärer Nematoden ist vermutlich ihre aktive Immunevasion. Sie induzieren im Wirt die Bildung von Th2-Zytokinen und supprimieren die zelluläre Reaktivität (Maizels und Yazdanbakhsh, 2003; Maizels et al., 2004).

Bei verschiedenen Filarien wurden Protease-Inhibitoren identifiziert, die die T-Zell-Proliferation *in vitro* hemmen. Cystein-Protease-Inhibitoren (Cystatine) von *O. volvulus*, *Lithomosomoides sigmodontis* und *A. viteae* sind in der Lage, die Proliferation von T-Zellen *in vitro* zu hemmen (Hartmann et al., 1997; Schönemeyer et al., 2001; Pfaff et al. 2002). Bei *A. viteae*- und *O. volvulus*-Cystatinen konnte außerdem eine Hochregulation der IL-10-Bildung und eine Verminderung der MHC II-Expression durch eine Hemmung der an der Antigen-Prozessierung beteiligten Cystein-Proteasen (u.a. Cathepsin L und S) festgestellt werden (Nakagawa und Rudensky, 1999; Schönemeyer et al., 2001). Für die Cystatine des freilebenden *C. elegans* konnte weder eine Inhibition der T-Zell-Proliferation noch eine vermehrte IL-10-Bildung gezeigt werden. Im Gegenteil, diese Cystatine verstärken die Bildung der Th1-Zytokine IL-12 und IFN- γ . Die Tatsache, daß die *C. elegans*-Cystatine die Antigen-Präsentation nicht hemmen, sondern fördern und statt einer Th2- eine Th1-Antwort induzieren, spricht dafür, daß es sich bei den Immunevasionsmechanismen der Filarien mittels Cystatinen um spezifische Anpassungen an die parasitäre Lebensweise handelt (Schierack et al., 2003).

Auch für ein Serpin der Filarie *B. malayi* wurde bereits eine proliferationshemmende Wirkung auf T-Zellen nachgewiesen. Hierzu wurden Zellen der Popliteallymphknoten von Antigen-immunisierten Mäusen mit Bm-SPN-2 stimuliert. Bei hohen Konzentrationen an Bm-SPN-2 konnte eine starke Suppression der T-Zell-Proliferation gezeigt werden. Außerdem kam es zu einer erhöhten IFN- γ -Bildung (Zang et al., 2000).

Die Injektion des frei lebenden Nematoden *C. elegans in toto* bewirkt bei Mäusen - im Unterschied zu den Cystatinen von *C. elegans* - eine Th2-Antwort (Maizels und Yazdanbakhsh, 2003), was hinsichtlich der parasitären Lebensweise einen Vorteil für Nematoden im Sinne einer Präadaptation bedeuten könnte.

Ob diese Eigenschaft der Filarienserpine eine Adaptation an den Parasitismus darstellt wie bei den Cystatinen, wurde mittels rCe-Serpin und rAv-Serpin anhand von Mausmilzzellen *in vitro* untersucht. Dabei zeigte sich eine suppressive Wirkung von rCe-Serpin auf die Proliferation von Mausmilzzellen bei polyklonaler und Antigen-spezifischer Stimulation. Gleichzeitig wurde die IL-10-Induktion konzentrationsabhängig verstärkt.

IL-10 wird von Monozyten, Makrophagen, T- und B-Zellen und epithelialen Zellen synthetisiert. Dabei konnten Loke et al. zeigen, daß nicht Zytokin-, sondern nur Rezeptor-vermittelt aktivierte T-Zellen zu einer Induktion der IL-10-Produktion durch Monozyten führen. Diese Interaktion zwischen Monozyten und aktivierten Lymphozyten erfolgt durch Zell-zu-Zell-Kontakt (Loke et al. 2000) unter maßgeblicher Beteiligung von TNF α und CD40 Ligand/CD40. Die IL-10-Bildung bei Gewebsmakrophagen wird ebenfalls durch CD40 Ligand-T-Zellen induziert (Foey et al., 2001).

IL-10 hemmt die Bildung von Zytokinen der Th1- und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), u.a. IFN γ , IL-12, IL-18, und führt dadurch zu einer Veränderung der Immunantwort vom Th1-zum Th2-Typ sowie zur Inhibition der IFN- γ -induzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediären und NO durch Makrophagen. Durch eine verminderte Expression von MHC II- und Adhäsionsmolekülen durch Monozyten und Makrophagen kommt es zu einer IL-10-bedingten Beeinträchtigung der Antigenpräsentation und Adhäsion dieser Zellen und somit zu einer Inhibition der T-Zell-Proliferation (Hamblin, 1993; Hall und Hall, 1994). IL-10 als Hauptfaktor für die T-Zell-Suppression wurde für Filariencystatine beschrieben (Hartmann et al., 1997). *C. elegans*-Cystatine, die nicht zu einer erhöhten IL-10-Ausschüttung führen, induzieren auch keine zelluläre Hyporeaktivität (Schierack et al., 2003). Bei *L. sigmodontis*-Infektionen konnte jedoch bei Neutralisation von IL-10-Rezeptoren *in vitro* kein Einfluß von IL-10 auf die Th2-Antwort oder auf die T-Zell-Reaktivität beobachtet werden; vielmehr wird regulatorischen T-Zellen im Zusammenhang mit GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene) eine wichtige Rolle bei der Suppression der schützenden Immunität bei Filarieninfektionen zugesprochen (Taylor et al., 2005).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß ein rCe-Serpin sowohl eine T-Zell-Suppression als auch eine erhöhte IL-10-Bildung induziert, so daß von einer IL-10-induzierten T-Zell-Suppression ausgegangen werden kann. Ein Einfluß von GITR muß überprüft werden.

rCe-Serpin inhibiert Cathepsin G. Uehara et al. (2003) konnten für die Neutrophilen-Serinproteasen Cathepsin G und humane Leukozytenelastase zeigen, daß sie PAR₂-vermittelt humane Gingiva-Fibroblasten aktivieren, IL-8 und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) zu bilden. Während IL-8 ein wichtiges Chemokin für die Aktivierung von Neutrophilen und die Migration von Neutrophilen und T-Zellen ist (Baggiolini et al., 1994), spielt MCP-1 eine wichtige Rolle bei der Induktion von Th1- und Th2-Antworten durch die Beeinflussung der Aktivierung und Migration von Monozyten, T-Zellen und NK-Zellen (Gu et al., 2000; Huang et al., 2001), so daß eine zelluläre Hyporeaktivität und die Induktion einer Th2-Antwort durch rCe-Serpin über Cathepsin G denkbar wäre.

Auch bei Protozoeninfektionen kommt es zu einer Immunsuppression beim Wirt. Sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen *T. gondii*-Infektion tritt eine Proliferationshemmung Mitogen- und Antigen-spezifisch stimulierter Mausmilzzellen auf, die mit einem Anstieg der reaktiven Stickstoffintermediäre korreliert (Candolfi et al., 1994). Mitogen-stimulierte humane Blutlymphozyten werden in der akuten Phase der *T. gondii*-Infektion ebenfalls in ihrer Proliferation gehemmt. Dies wird durch lösliche Faktoren (SF) verursacht, die beim Kontakt von Monozyten mit *T. gondii* frei werden. Eine Komponente dieser SF ist IFN γ , wogegen IL-10, NO oder TGF β nicht enthalten sind (Channon und Kasper, 1996). Für *T. gondii* wurde nachgewiesen, daß protozoäre Parasiten sowohl die klassische, IFN γ -abhängige Makrophagenaktivierung mit NO-bedingter Inhibition der Milzzellproliferation als auch die alternative, IFN γ -unabhängige Aktivierung von Makrophagen mit Th2-Zytokinbildung induzieren (Candolfi et al., 1994; Channon und Kasper, 1996).

Für das in dieser Arbeit untersuchte Serpin von *E. tenella* konnte bei Mitogen-Stimulation eine Inhibition der Proliferation von Mausmilzzellen gezeigt werden. Die IL-10-Bildung ist dabei tendenziell erhöht, wobei aufgrund der insgesamt niedrigen Werte dieses Zytokin-ELISA eine Überprüfung des Ergebnisses notwendig ist. Durch rEt-Serpin wird allerdings kaum eine Inhibition der Antigen-spezifisch stimulierten Milzzellproliferation bewirkt, so daß es nicht zu einer Hemmung der Antigen-Präsentation kommt.

Diese im Mausmodell ermittelte proliferationshemmende Wirkung von rEt-Serpin stellt einen Ansatz dar, der für *E. tenella* am Huhn zu verifizieren ist und die Überprüfung weiterer protozoärer Serpine (*T. gondii*, *N. caninum*) hinsichtlich dieser Funktion impliziert.

Das rAv-Serpin ist aufgrund der Strukturanalyse und der Funktionsstudien vermutlich kein Serpin. Wegen der relativ großen Variabilität der Aminosäuresequenzen von Serpinen selbst

in den konservierten Bereichen Serpin-Motiv und Serpin-Signatur (siehe Anhang 1), sind die Nukleinsäuresequenzen von Serpinen z.T. sehr unterschiedlich. Deshalb kann die Isolierung eines Serpins ausschließlich mit Hilfe konservierter Bereiche innerhalb der Nukleinsäuresequenz bei einem nicht vollständig sequenzierten Organismus wie *A. viteae* fehlerhaft oder erfolglos sein. Die Isolierung von Serpinen aufgrund ihrer inhibitorischen Eigenschaften ist deshalb vorzuziehen. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß die Funktionen der Serpine bei *A. viteae* durch andere Proteine übernommen wurden, und somit keine Serpine durch *A. viteae* gebildet werden.