

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung und Expression von rCe-Serpin und rEt-Serpin

3.1.1. Klonierung eines *C. elegans*-Serpin

Basierend auf der Nukleinsäuresequenz des *C. elegans*-Serpin 7 aus der NCBI-Datenbank (Locus tag="F20D6.4") wurden spezifische Primer synthetisiert, mit denen die Serpinsequenz mittels PCR aus der cDNA von *C. elegans* amplifiziert werden konnte. Die mit dem HUSAR-Programm mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,0 vorhergesagte Signalsequenz wurde dabei nicht berücksichtigt. Das 989 bp große PCR-Produkt wurde nach der Ligation in den T-overhang Vektor pGEM-T Easy durch die Firma AGOWA sequenziert. Die amplifizierte Sequenz (Abbildung 4) stimmte mit der in der Datenbank veröffentlichten überein.

Um das Serpin zu exprimieren, wurde das Insert mit *Not* I aus dem Klonierungsvektor pGEM herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Not* I geschnittenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pET 28a(+) ligiert.

```

1  ATGGCACTACTTCTCCAATCGGAGACTGATTTGGTCTGGGACTTCTTCGTCAACAGAATATTTCCGAATCTCTCGCATTCTCCACTTTCCATTGCCT
1  M A L L L Q S E T D F G L G L L R Q Q N I S E S L A F S P L S I A

101 TAGCTCTATCTCTGGTTCATGTAGCGGCAAAAGGAGAAACTCGTGATCAGATTCGTGAAGCTCTCGTAAAAGGATCCACCGATGAACAGCTCGAACAGCA
34 L A L S L V H V A A K G E T R D Q I R E A L V K G S T D E Q L E Q H

201 TTTTGCAAAACATCTCCGCTGCACTATTGGCGGCTGAAAGAGGAACCGAAGTAAAACCTGCGAATCATGTCTTCACTAGAGCCGGATTAAATCAAGCAA
68 F A N I S A A L L A A E R G T E V K L A N H V F T R A G F K I K Q

301 TCGTACTTAGATGATGTCAAGAACTTTACAACGCTGGCGCAAGTTCAGTTGATTTTGACAATAAGGAAGCTACGGCCGAAGCGATCAATAATTTGTTC
102 S Y L D D V K K L Y N A G A S S L D F D N K E A T A E A I N N F V

401 GTGAAAATACAGGAGATCATATCAAGAAGATTATTGGATCGGACAGTATCAACTCAGATCTCGTCGCTGTTCTCACCAATGCTCTCTACTTCAAGGCTGA
135 R E N T G D H I K K I I G S D S I N S D L V A V L T N A L Y F K A D

501 TTGGCAAAACAAATTCAAAAAGGATTCTACATTCAAGAGCGAATTCTTCAGTTCAGCTGATTCGAAACGAGAAATCGATTTCTCCATGCCTCCAGTGTC
169 W Q N K F K K D S T F K S E F F S S A D S K R E I D F L H A S S V

601 TCGAGAGATTACGCCGAAAATGATCAATTCCAAGTTCAGTCTTCCATATAAGGACAACACATTTGCACTCACAATTTCCCTTCAAAAACCCGTTTCG
202 S R D Y A E N D Q F Q V L S L P Y K D N T F A L T I F L P K T R F

701 GATTGACCGAGTCGCTCAAACTCTGGATTCTGCAACTATTCAACACCTTCTATCAAATGTCTCCAGTACTTCGGTTAATGTTCAAATCCAAAGTGGAA
235 G L T E S L K T L D S A T I Q H L L S N V S S T S V N V Q I P K W K

801 GATTGAGACAAAGTTGGGACTCGAAGAAGCTCTTCAATCGCTCGGAATTA AAAAGCGTTTCGATAATGATGCAGATCTTGGAAATATGGCAGATGGCCTC
269 I E T K L G L E E A L Q S L G I K K A F D N D A D L G N M A D G L

901 TACGTTTCAAAGTCACTCACAAGCTCTCATTGAGGTTGACGAAGAAGAACCAAGCCGCTGCAGCTACTACTGTATCAATTTGCTCAAGTCAGCCA
302 Y V S K V T H K A L I E V D E E G T K A A A A T T V S I S L K S A

1001 TGTTTCGTAATGGAAGGCCAAAAGATTTACAGCCGACCATCCATTTCTTTTCGTTCTGTCAAAGATAACCACCTCTTTTTCGCGCCTTCATCATTAG
235 M F V M E E P K D F T A D H P F F F V L S K D N H P L F V G L H H *>

```

Abbildung 4: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Ce-Serpin. Die hydrophobe potentielle Signalsequenz ist kursiv gedruckt und die Primersequenzen sind unterstrichen. Die Aminosäurebereiche mit Homologien zu den konservierten Regionen im aktiven Zentrum der Serpine sind fett gedruckt.

3.1.2. Klonierung eines *E. tenella*-Serpin

Mit Hilfe der von Christian Klotz bereits teilweise amplifizierte Nukleinsäuresequenz und der Datenbank sind spezifische Primer für das *E. tenella*-SERPIN 1 – nachfolgend Et-Serpin genannt - synthetisiert worden, denen zusätzlich die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*H I (Forward-Primer) und *Xho* I (Reverse-Primer) hinzugefügt worden sind. Mit diesen Primern wurde die 1248 bp lange Sequenz ohne Signalsequenz (Abbildung 5) über PCR aus *E. tenella*-Oocysten-cDNA isoliert, mit *Bam*H I und *Xho* I geschnitten und in den ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pET 28a(+) ligiert. Die nachfolgende Sequenzierung ergab eine Übereinstimmung der amplifizierten Sequenz mit der in der Datenbank.

```

1 ATGGCTCTGTTGAGTAAGCTAAAAGCGTCTATTTGGCCTTGCTATAGCCGGTGCCTTTCCCTTCACTTCCATGACAAGCGCAATGGAGCGTTCAACAA
1 M A L L S K L K G V Y L A F A I A G A F P F T S M T S A M E R S T

101 TCACCGCGGAGCGCCTGTATGGCAAAATCGCAGGCGCTAGCATTCGCGGCAAGCCAACTTCGTCTTTCCCTTTCAGCATTTTAGCGTTTTTCATGC
134 I T A E R L Y G K I A G A S I A A K P N F V F S P F S I F S V F H A

201 CGCGCAAAAGGAGCAGCGGGGCAAACTAAGGCACAGATGGACGCACTGGTCGGTCCCAATGAAACGTTGAAATTCCTGAGCTGATACGCCACCACGA
168 A Q K G A A G Q T K A Q M D A L V G P N E T F E I P E L I Q P P R

301 AAAGACGGCGCGTCACTGTGCATGTGGCCAACCGGCTCTACGTGCATCCTGGCCTGGAAAATAATAAGCAGTTCAACAAGTTTAAAGAAGCAGCTTGAGG
201 K D G A V T V D V A N R L Y V H P G L E N N K Q F N K F K K Q L E

401 ATGAAAAACACGAGGCGGAGACCATCGATTTTCGGACGGCGCGGCTGCCTGCAGAGAAAATAATGCATTTGTTGCCACCACACGCGACCATATTA
234 D E K H E A E T I D F S D G A A A A E K I N A F V A T T T R D H I K

501 GAACCTTGTGAGTCCATCAGCGCTTGGAGCGCAGACGCGCCTTGTCTTGGTCAACGCCTTGTACTTCAAAGCGCCTTGGCTCACCCAGTTCAGTGTGCT
268 N L V S P S A L G A Q T R L V L V N A L Y F K A P W L T Q F S A A

601 GGTACCTCAAAGGTGCTTCTCTACACCCGCTGGACCGAAGCAGTTATGTTTCATGAGGGGGAAGCTGGATAAGGCCCCCTTTGGTCACTATGAAGA
301 G T S K G V F S T P A G P K Q V M F M R G K L D K A P L L V T M K

701 AGGAATTCCTTGTGTTGGCCTGCCATACTCGGACGCCCGCCTCCGTCTGTACTTCTTTCATGCCAGACGACTTGGCAAGCTTCGAGAAGCCATGGTCGA
334 K E F L A V G L P Y S D A R L R L Y F F M P D D L A S F E K A M V D

801 CGACCCTCAGCTAATTGAGACCGCGATTTCTGACATGGAGTCCAGCGCCAACGACAGGAGTTTCGAAGAAGAAATGTACTCTACTGTGCCCAAGTTC AAG
368 D P Q L I E T A I S D M E S S A N D R S F E E E M Y L T V P K F K

901 TTGTCCGACGACACAACAAGTCGATCTCACCGAGATCTTTGGAAGCATGGGTGCCACGGACATGTTTCAGAGTGGACAAGGCGGACTTCTCAGAGATGA
401 L S A D D N K V D L T E I F G S M G A T D M F R V D K A D F S E M

1001 CGGGCGATCGTGACCTGTTTGTCTTCTTTTGTTCACCAGGCGAGACATCGACGTCAACGAAGAAGGGACAGAGGCAACAGCTGCGTCTGCAATGATCAT
434 T G D R D L F V S S F V H Q A D I D V N E E G T E A T A A S A M I M

1101 GATGCTTCGTGCAATGCCAATGCCAAGACACCTATAAACGTTATCATTGACAAGCCTTTTGTCTTCCAGCTGCGCTTCGTAGATGGAGACCAACTTA
468 M L R A M P M P K T P I N V I I D K P F V F Q L R F V D G D T N L

1201 ACCCTCTTAGTGGCCGCGTGGCAGACCCGGCAGCAGCACAGCAGTAA
501 T L F S G R V A D P A A A Q Q *

```

Abbildung 5: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Et-Serpin. Die Primersequenzen sind unterstrichen. Die Aminosäurebereiche mit Homologie zu den konservierten Regionen im aktiven Zentrum der Serpine sind fett gedruckt.

3.1.3. Expression von rCe-Serpin und rEt-Serpin

Die Expression des 329 Aminosäuren langen rekombinanten *C. elegans*-Serpin 7 – nachfolgend Ce-Serpin genannt - und des 416 Aminosäuren umfassenden rEt-Serpin erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) nach Induktion mit 1 mM IPTG für 2 Stunden.

Für die sich anschließende Aufreinigung der exprimierten Proteine wurde ihre Löslichkeit in verschiedenen Puffern geprüft. Dabei wurde zuerst unter nicht denaturierenden Bedingungen mit unterschiedlichen Detergenzien gearbeitet (Puffer I/II/III).

Weil sich die Proteine in diesen Puffern nicht lösen ließen, wurde ein denaturierender Puffer mit 8 M Harnstoff (Puffer IV) verwendet. Die Proteinaufreinigung erfolgte mit Hilfe des N-terminalen 6 x Histidin-Tag über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Auf der Säule wurde eine Umpufferung von 8 M Harnstoff auf 0 M Harnstoff während des Waschens vorgenommen. Aus diesem Grund konnte gegen PBS dialysiert werden.

Die dialysierten Fraktionen wurden in der SDS-PAGE (Abbildung 6A, 7A) und im Western Blot mit Maus Anti-6 x His-Antikörper (Abbildung 6B, 7B) überprüft. Sowohl im SDS-PAGE als auch im Western Blot zeigte sich auf einer Höhe von 40 kDa (*C. elegans*) und 49 kDa (*E. tenella*) eine Bande, was dem theoretischen Molekulargewicht des rCe-Serpin von 36,5 kDa und des rEt-Serpin von 45,5 kDa zuzüglich 3,5 kDa Vektorsequenz incl. 6 x Histidin-Tag entspricht. rEt-Serpin reagierte in der induzierten Bakterienkultur nur schwach mit dem Maus Anti-6 x His-Antikörper, nach der Aufreinigung jedoch zeigte sich eine deutliche Antigen-Antikörper-Reaktion.

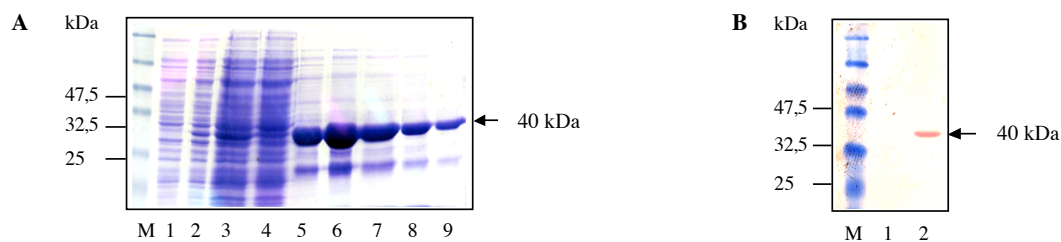


Abbildung 6: Expression und Aufreinigung von rCe-Serpin.

A: **SDS-Polyacrylamidgel** zur Überprüfung der Expression in BL21(DE3) und Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

M – Marker; **1** – Bakterienkultur vor der Induktion; **2** – Bakterienkultur nach 2 Stunden Induktion mit IPTG; **3** – Solubilisat der Bakterienkultur; **4** – Durchfluß von der Ni-NTA-Säule; **5-9** – Elutionsfraktionen 1-5.

B: **Western Blot** zur Überprüfung der Expression. Detektion des N-terminalen 6 x His-Tag des rekombinanten Proteins mit einem Maus Anti-6 x His-Antikörper.

M – Marker; **1** – Bakterienkultur vor der Induktion; **2** – Bakterienkultur nach 2 Stunden Induktion mit IPTG

Die Pfeile zeigen das rCe-Serpin mit einem MG von 40 kDa.



Abbildung 7: Expression und Aufreinigung von rEt-Serpin.

A: **SDS-Polyacrylamidgel** zur Überprüfung der Expression in BL21(DE3) und Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

M – Marker; **1** – Bakterienkultur vor der Induktion; **2** – Bakterienkultur nach 2 Stunden Induktion mit IPTG; **3** – Elutionsfraktionen 1-3.

B: **Western Blot** zur Überprüfung der Expression. Detektion des N-terminalen 6 x His-Tag des rekombinanten Proteins mit einem Maus Anti-6 x His-Antikörper.

M – Marker; **1** – Bakterienkultur vor der Induktion; **2** – Bakterienkultur nach 2 Stunden Induktion mit IPTG; **3** - Elutionsfraktion

Die Pfeile zeigen das rEt-Serpin mit einem MG von 49 kDa.

3.2. Klonierung und Expression eines *A. viteae*-Serpins

Zur Isolierung eines Serpins aus *A. viteae* wurde Gesamtantigen weiblicher Würmer mittels Gelchromatographie entsprechend dem Molekulargewicht aufgetrennt. Von den einzelnen Fraktionen dieser Auftrennung wurden je 170 μ l auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber der Prototyp-Zielprotease Chymotrypsin getestet, da diese in den Aktivitätstests eine höhere Affinität gegenüber dem pNA-gekoppelten Substrat aufwies als Trypsin (siehe 3.4.). Dabei zeigten die Fraktionen 8 bis 10 eine deutliche Inhibition, während die übrigen Fraktionen eine höhere hydrolytische Aktivität besaßen als reines Chymotrypsin, was auf das Vorhandensein weiterer Proteasen schließen lässt (Abbildung 8B). In der SDS-PAGE sind in den Fraktionen 8 bis 10 Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 28 und 34 kDa prominent (Abbildung 8A), die in anderen Fraktionen weniger vertreten sind.

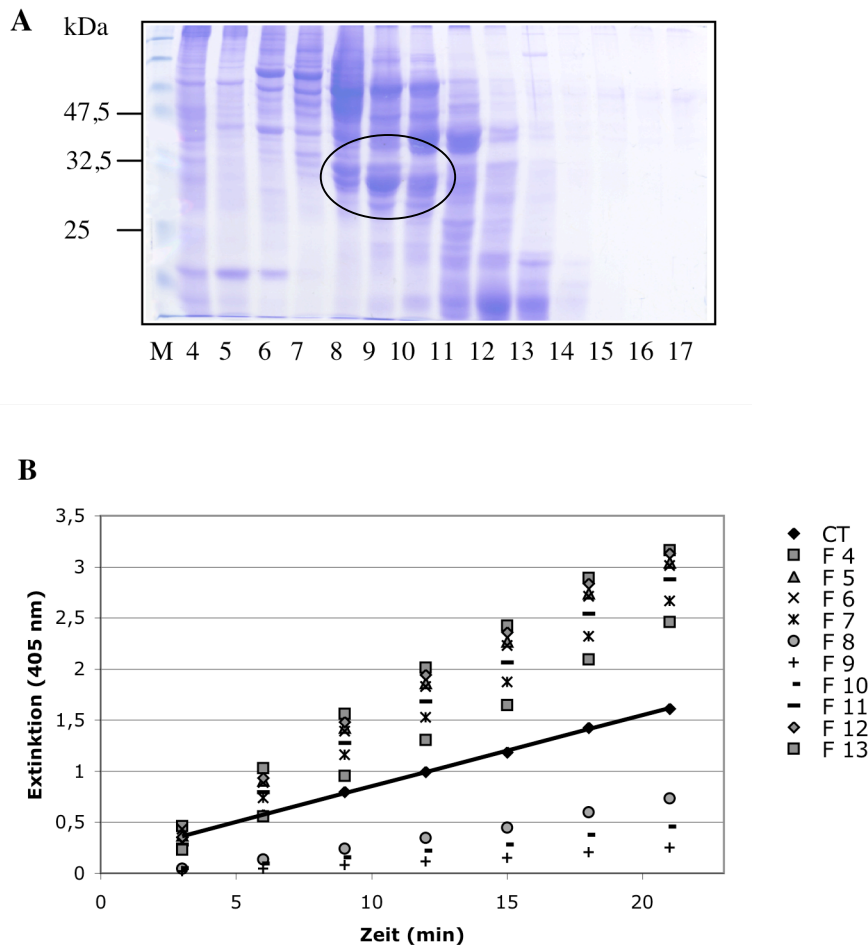


Abbildung 8: Isolierung von Serpin aus *A. viteae*-Weibchen-Gesamtantigenen.

A: SDS-Polyacrylamidgel der Gelchromatographie. M – Marker; 4-17 – Fraktionen 4-17. Eingekreist sind die in den Fraktionen 8 bis 10 prominenten Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 28 und 34 kDa.

B: Inhibition von Chymotrypsin durch *A. viteae*-Weibchen-Gesamtantigen-Fraktionen.

Die Aktivität von Chymotrypsin (2 nM, durchgezogene Linie) nach einer dreißigminütigen Inkubation mit je 170 μ l der Fraktionen 4-13 der Gelchromatographie von *A. viteae*-Weibchen-Gesamtantigenen bei 37°C wurde über 23 Minuten kolorimetrisch bestimmt. Das chromogene Substrat Succ-AAPF-pNA wurde in einer Konzentration von 560 μ M eingesetzt. Die graphische Darstellung zeigt das freigesetzte chromogene pNA, gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

Nachfolgend stand die Eigenschaft von Serpinen im Vordergrund, an ihre Prototyp-Zielprotease Trypsin zu binden. Indem Trypsin an eine Sepharosesäule gekoppelt wurde, sollte natives Serpin aus *A. viteae*-Weibchen-Gesamtantigenen durch Binden an dieses Trypsin aufgereinigt werden. Bei der Elution mittels pH-Wechsel konnte in Fraktion 20 ein Protein mit einem Molekulargewicht von 47,5 kDa im SDS-Gel (Abbildung 9) nachgewiesen werden. Bei der Sequenzierung wurde es allerdings als Aktin identifiziert.

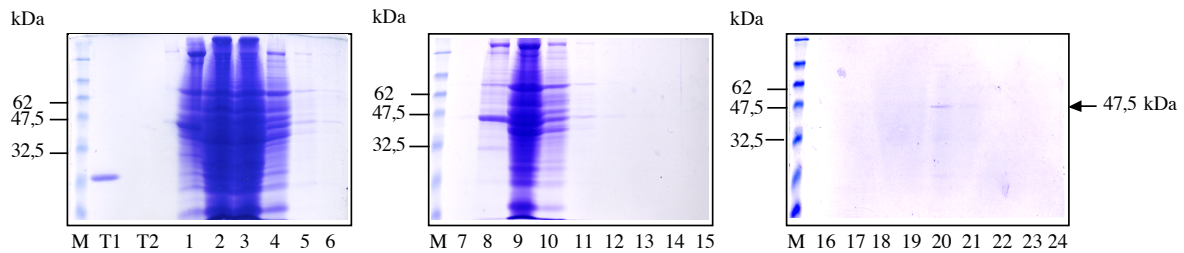


Abbildung 9: SDS-Polyacrylamidgel der Aufreinigung von nativem *A. viteae*-Serpin mittels Trypsin-Sepharosesäule. M – Marker; T1 – Trypsinlösung vor dem Beladen der Sepharosesäule; T2 – Trypsinlösung nach dem Beladen der Sepharosesäule; 1-24 – Fraktionen 1-24. In den Fraktionen 1-15 ist der Anteil des *A. viteae*-Weibchen-Gesamtantigens zu sehen, der nicht an die Säule gebunden hatte und deshalb beim Waschvorgang fraktioniert wurde. Mit dem Elutionspuffer wurden die Fraktionen 16-24 gewonnen. Der Pfeil zeigt das in Fraktion 20 eluierte Protein von 47,5 kDa an, das als Aktin identifiziert wurde.

Da für die Aufreinigung von nativem Serpin nicht mehr genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, wurde mit der Isolierung auf DNA-Ebene fortgefahren.

Es wurde mit einer λ ZAP-Phagenbank gearbeitet, in dessen Phagemidvektor pBluescript II SK *A. viteae*-Weibchen-cDNA ligiert worden war (Ralf Adam).

Da die Multiple Cloning Site des Vektors von T3- und T7-Promotoren flankiert wird, bestand die Primerkombination zur Amplifikation eines *A. viteae*-Serpins aus je einem Vektor-spezifischen Primer (T3/T7) und einem Serpin-spezifischen Primer, dessen Sequenz der konservierten Serpin-Signatur entsprach (SerpSig 1 forward/reverse). Mit der T3- und SerpSig 1 reverse-Primer-Paarung konnte eine Sequenz (Abbildung 10) amplifiziert werden, die die typische Serpin-Signatur aufwies. Diese Sequenz konnte mit spezifischen Primern (AvKlon1 Forward-Primer 1/SerpSig 1 reverse) auch direkt aus *A. viteae*-Weibchen- und – Mikrofilarien-cDNA isoliert werden.

```

1  CAGTCGTCGATGCTAACCAATCCGGAACGGAAGATCTCGAACGACAATTACTTTCGATA
1  <Q S S M L T N P E T E D L E R Q L L S I

61  AAAAAACGGGCTGGCGCAAGATCATTGGTTCATGAAAGCAAATAATTTTGAAAATTTT
21  K K R A G A R S F G S M K A N N F E N F

121  TTCTACCCGAGCATTAAACGACATCAAGCATTCTCGCCGTACTATTACTATCAACAACCTG
41  F Y P S I K R H Q A F S P Y Y Y Y Q Q L

181  AAACGTGGCGGTGGACATCCCTTCCTTTATGCAATC
61  K R G G G H P F L Y A I>

```

Abbildung 10: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des mittels PCR amplifizierten AvKlon 1. Die Primersequenz ist unterstrichen. Die potentielle Serpin-Signatur ist fett gedruckt.

Um einen „full length“-Klon zu ermitteln, wurde mit dem Plaque Screening-Verfahren fortgefahren. Dabei wurde die amplifizierte Sequenz als DIG-markierte Sonde eingesetzt und $5,2 \times 10^6$ Phagen der *A. viteae*-Weibchen-cDNA-Bank überprüft. Die zwei Reklonierungen führten zu einer Vereinzlung der Phagen und dadurch zur Isolierung von 6 positiven Einzelphagen. Die Phagemidvektoren mit der entsprechenden cDNA wurden über die *in vivo*-Exzision in SOLR-Bakterien transformiert und die cDNA sequenziert. Nur eine Sequenz zeigte einen offenen Leserahmen und Ähnlichkeiten mit den konservierten Serpinbereichen (Abbildung 11), beim Vergleich mit der Sequenz des als Sonde verwendeten AvKlon 1 ergab sich in den entsprechenden Bereichen allerdings nur eine Übereinstimmung von 13%.

Da zu den konservierten Serpinregionen Serpin-Motiv und Serpin-Signatur homologe Bereiche enthalten waren (Abbildung 11: Serpin-Motiv – Aminosäuren 108 bis 112, Serpin-Signatur – Aminosäuren 126 bis 133), sollte über die Testung der inhibitorischen Aktivität des rekombinanten Proteins, eine eventuelle Zugehörigkeit zu der Familie der Serpine festgestellt werden. Die 729 bp lange Nukleinsäuresequenz wurde mit dem Programm SignalP predictions auf das Vorkommen einer Signalsequenz geprüft. Es wurde von SignalP-HMM (hidden Markov models) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,872 ein Signalpeptid bis zur Aminosäure 27 vorhergesagt, weshalb dieser Bereich im Folgenden ausgespart wurde. Aufgrund der Signalsequenz am Beginn und der poly-A-Sequenz am Ende der isolierten Nukleinsäuresequenz von *A. viteae* handelte es sich um ein vollständiges Gen. Mit spezifischen Primern, die die Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen *EcoR* I (Av-Serpin Forward-Primer) und *Xho* I (Av-Serpin Reverse-Primer) besaßen, wurde mittels PCR die Sequenz aus dem aufgereinigten pBluescript-Vektor isoliert, mit den erwähnten Restriktionsenzymen geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelten und dephosphorylierten Expressionsvektor pET 28a(+) ligiert. Im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) wurde das 184 Aminosäuren große Protein nach Induktion mit 1 mM IPTG für 2 Stunden exprimiert. Um das rekombinante Protein aus dem Bakterienpellet zu lösen, wurden verschiedene nicht denaturierende Puffer getestet, die die Detergenzien Triton X-100, CTAB und Imidazol enthielten (Puffer I/II/III). Das beste Ergebnis wurde mit dem Imidazol-haltigen Puffer erreicht. Die Aufreinigung erfolgte aufgrund des N-terminalen 6 x Histidin-Tag des rAv-Serpin über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Es wurde mehrmals gegen PBS dialysiert. Das 28,4 kDa große rAv-Serpin konnte im SDS-Gel und im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 12).


```

1 CTGAATTCGGCAGGAGTTTACAGCAGCAAGTTATCATGCCACCATTCAGAGAAATACCGATGATGGCCGTGAGCACAGCACCAGCATCACTACAATTCC
1 E F G T S L Q Q Q V I M P P L Q R I P M M A V S T A P A S L Q L P

101 CCAAGTATCAGTGGCTTACCCGCGACTACACCCGACCATGCTTGTTCACCTCAGATGCAGATGGAAATAGCTGCTGCAGCACAATCACCTCGCAGC
34 Q V S V A S P A T T P R P M L V P P Q M Q M E I A A A A Q S P R T

201 TCTTCCATTTGGTACTACTAGTGATATTTGGTCAGAGCAGACAGCATCTGATGGACGTGTATATTATTAATAAAGTAAACAAGCAGTCTTCATGGCAGA
67 S S I G T T S D I W S E H T A S D G R V Y Y Y N K V T K Q S S W Q

301 AACCGGATGAGTTAAAAAGTCCCGAGGAGAAAAAATTAGCTGCTGCAAAGCTGTGGCCGTGAGTACAAAACACCGGAGGACGACCTTATTATTATAAT
100 K P D E L K S P E E K K L A A A K L W R E Y K T P E G R P Y Y Y N I

401 CGAAACTAAGGAGACCACTTGGATTTGTCCAAAAGATTTCGATCCTGCAGTTGTGACAAAAGTAAAAATGGCGTGAATTAAGGGAGTGATACATCG
134 E T K E T T W I C P K D F D P A V V T K V K N G V E L K G S D T S

501 AAAATAGAACCACAGGGTAGCGGAGAATCTGAATTGGAAAAGCAATGCTGGCGACACTGAAATCACTCGAACAACCTAATGAGCAAGCAGGAAGTACAA
167 K I E P Q G S G E S E L E K A M L A T L K S L E Q P N E Q A G S T

601 AAGAAGCAGATGCGGAAGATGGAAGAAGAGAAAGATCTAAAAAGAGAAAAGAAATAAAGAAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
200 K E A D A E D G K E E K D L K K K R I K K R K K K K K K K K K K K K K K

701 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
234 K K K K K K K K K >
    
```

Abbildung 11: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von Av-Serpin. Die hydrophobe potentielle Signalsequenz ist kursiv gedruckt und die Primersequenzen sind unterstrichen. Die Aminosäurebereiche mit Homologien zu den konservierten Serpinregionen sind fett gedruckt.

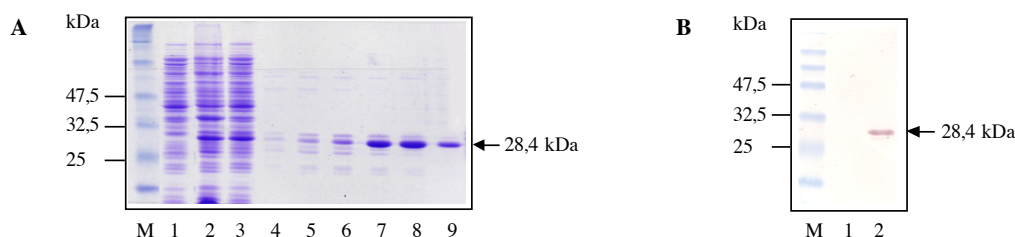


Abbildung 12: Expression und Aufreinigung von rAv-Serpin.

- A:** SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Expression in BL21(DE3) und Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie.
M – Marker; **1** – Bakterienkultur vor der Induktion; **2** – Bakterienkultur nach 2 Stunden Induktion mit IPTG; **3** – Solubilisat der Bakterienkultur; **4-6** – Elution mit PBS, pH 4; **7-9** – Elution mit PBS, pH 3.
- B:** Western Blot zur Überprüfung der Expression. Detektion des N-terminalen 6 x His-Tag des rekombinanten Proteins mit einem Maus Anti-6 x His-Antikörper.
M – Marker; **1** – Bakterienkultur vor der Induktion; **2** – Bakterienkultur nach 2 Stunden Induktion mit IPTG

Die Pfeile zeigen das rAv-Serpin mit einem MG von 28,4 kDa.

Parallel wurde versucht, mittels PCR durch Kombination verschiedener Primer (Abbildung 13) Serpinsequenzen aus *A. viteae*-cDNA zu isolieren. Die Primer bestanden aus den konservierten Serpinbereichen Motiv und Signatur, der bei Nematoden hoch konservierten Spliced Leader (SL)-Sequenz und einer Oligo(dT)-Sequenz. Als Template wurde zum einen *A. viteae*-Weibchen- und -Mikrofilarien-cDNA, zum anderen cDNA verwendet, die vermehrt SL- und Oligo(dT)-Sequenzen enthielt. Letztere wurde durch eine PCR mit SL- und Oligo(dT)-Primern gewonnen, bei der jeweils *A. viteae*-Weibchen- und -Mikrofilarien-cDNA als Template eingesetzt wurden (Programmablauf siehe 6.2.3.). Dadurch kam es zu einer Anreicherung von cDNA mit SL- und Oligo(dT)-Sequenzen, was die Bindungsmöglichkeiten der SL- und Oligo(dT)-Primer bei der nachfolgenden PCR erhöhen und somit zur Amplifizierung des 5'- bzw. 3'-Endes führen sollte. Außerdem wurde versucht, einen „full length“-Klon der bereits isolierten Sequenz (AvKlon1) zu amplifizieren, indem die SL- und Oligo(dT)-Primer jeweils mit internen Primern des AvKlon1 bei der PCR eingesetzt wurden. Als Template diente auch hier *A. viteae*-Weibchen- und -Mikrofilarien-cDNA und cDNA mit vermehrten SL-/Oligo(dT)-Sequenzen. Durch diese PCR-Ansätze konnten keine weiteren Sequenzen isoliert werden.

Deshalb wurde mit der inversen PCR fortgefahren (Abbildung 14). Durch den Verdau der doppelsträngigen cDNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden unterschiedliche Schnittstellen innerhalb der cDNA erzeugt. Bei der anschließenden Ligation zu ringförmiger doppelsträngiger cDNA standen somit verschiedene Sequenzbereiche als Template für die PCR zur Verfügung. Mit Hilfe der Primer aus dem konservierten Signatur-Bereich der Serpine und internen Primern des AvKlon1 wurde versucht, Sequenzbereiche in Richtung 5'- und 3'-Ende zu amplifizieren. Bei der Reamplifizierung der inversen PCR wurden nur bei den internen Primern mehrere Banden im Agarosegel sichtbar (Abbildung 15), die aber weder eine Sequenz des AvKlon1 noch eine andere Serpinsequenz ergaben.

Ansatz zur Amplifizierung eines *A. viteae*-Serpins

Template:

- 1) *A. viteae*-Weibchen -cDNA 2) *A. viteae*-Mf-cDNA 3) SL/Oligo(dT) cDNA

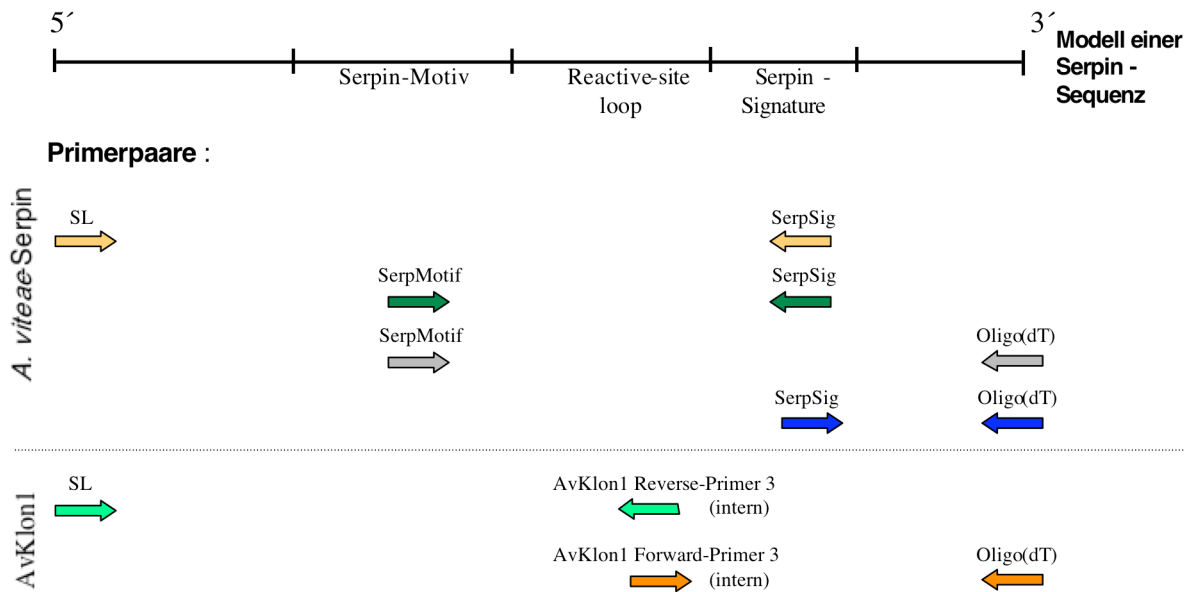


Abbildung 13: Schematische Darstellung der eingesetzten Primerkombinationen zur Amplifizierung eines *A. viteae*-Serpins.

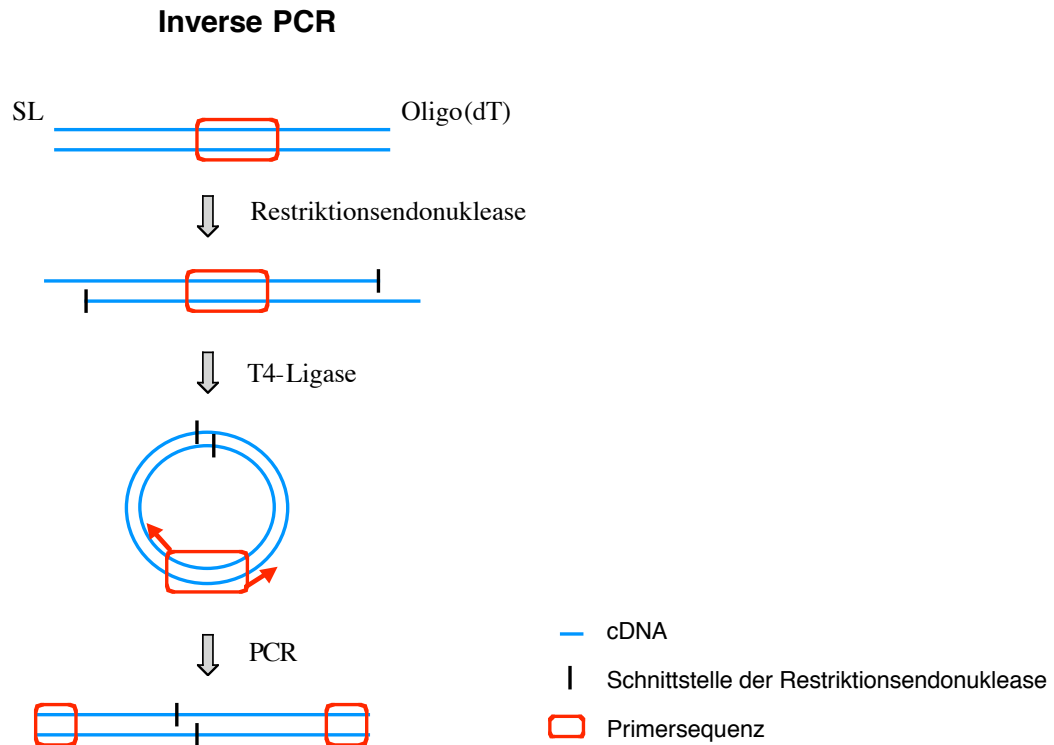


Abbildung 14: Schematische Darstellung der inversen PCR zur Amplifikation eines *A. viteae*-Serpins.

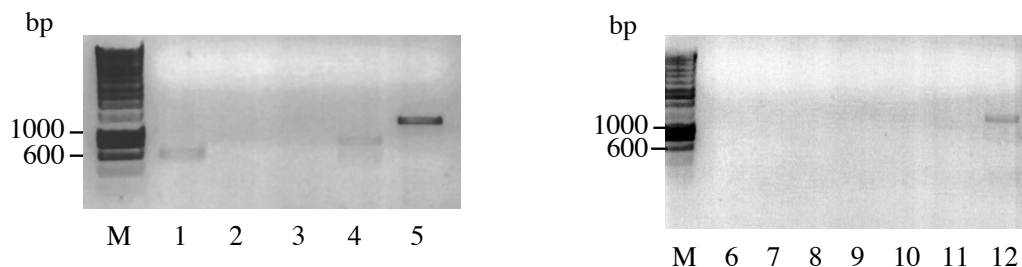


Abbildung 15: Inverse PCR mit *A. viteae*-Weibchen-cDNA. Agarosegel der reamplifizierten inversen PCR mit internen Primern des AvKlon 1 (Forward-/Reverse-Primer 3). **M** – Marker; **1-12** - cDNA geschnitten mit **1** - *Alu* I; **2** - *Bam*H I; **3** - *Eco*R I; **4** - *Eco*R V; **5** - *Hae* III; **6** - *Hind* III; **7** - *Nde* I; **8** - *Not* I; **9** - *Pst* I; **10** - *Sac* I; **11** - *Xba* I; **12** - *Xho* I.

Als weitere Methode zur Isolierung der vollständigen Sequenz des AvKlon1 wurde die RACE-PCR angewendet. Bei der 5'-RACE-PCR konnte aus der cDNA von *A. viteae*-Weibchen mit Hilfe des Universal Primer Mix (UPM) und einem internen Primer (AvKlon1 Reverse-Primer 2) keine Sequenz amplifiziert werden. Die bei der 3'-RACE-PCR isolierte Sequenz von 131 bp Länge bis zum ersten Stopcodon (Abbildung 16) zeigte Unterschiede zu

der zuvor amplifizierten Sequenz des AvKlon1 in drei Bereichen, was zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz im Bereich der potentiellen Serpin-Signatur (von HPFLYAI nach HPFYAY) und dadurch zu einer geringeren Homologie mit der konservierten Serpin-Signatur führte. Da die zuerst isolierte Sequenz des AvKlon1 mit einem aus der Serpin-Signatur bestehenden Primer (SerpSig 1 reverse) amplifiziert wurde, ist es wahrscheinlicher, daß die bei der 3'-RACE-PCR mit einem internen Primer (AvKlon1 Forward-Primer 2) und dem am 3'-Ende der cDNA bindenden UPM erhaltene Sequenz die eigentliche Nukleinsäuresequenz darstellt, und es durch den Serpin-Signatur-Primer zuvor zu Sequenzveränderungen gekommen war. Diese Abweichung von der Serpin-Signatur sowie die fehlende Homologie zum konservierten Serpin-Motiv machen es eher unwahrscheinlich, daß es sich beim AvKlon1 um ein Serpin handelt, weshalb mit diesem Klon nicht weiter gearbeitet wurde.

```

1  ATTAAACGACATCAAGCAATCTCGCGTACTATTACTATCAACAACCTGAAACGTGGCGGT
1  I K R H Q A I S P Y Y Y Q Q L K R G G
      ↓
61  GGACATCCCTTCTATGC TTATTGGAGTCCATCAAGCGGAGCGACATTCATCGAAGATTCT
21  G H P F Y A Y W S P S S A S D I H R R F

121  CCATTTTATAAAAAGCGTTCAGTACCGCATGATTCTGATGATTACATT]
41  S I L *

```

Abbildung 16: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des mittels 3'-RACE-PCR amplifizierten AvKlon 1R. Die Primersequenz ist unterstrichen. Die vom AvKlon 1 abweichenden Nukleotide und Aminosäuren sind kursiv gedruckt. Der Pfeil zeigt an, wo im Vergleich zur Nukleotidsequenz von AvKlon 1 die Nukleotide CTT und damit die Aminosäure Leucin (L) fehlen. Die veränderte potentielle Serpin-Signatur ist dick gedruckt.

3.3. Aminosäureabgleich der isolierten Sequenzen

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der isolierten Klone wurden mittels NCBI blastx mit der Proteindatenbank verglichen.

Bei der Eingabe der Sequenz von Av-Serpin wurde eine Homologie von 57% mit dem Formin-bindenden Protein 3 des Zebrafisches *Danio rerio* und eine Homologie von 52% mit einem Formin-bindenden Protein 3-ähnlichen Protein von *C. elegans* festgestellt.

Für den *C.elegans*-Klon wurde eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Ce-Serpin ermittelt.

Beim Abgleich der *E. tenella*-Sequenz wurde u.a. eine Homologie zum Serpin B6 des Menschen und einem Serin-Protease-Inhibitor der Ratte (*Rattus norvegicus*) von 51% und zu einem Serpin-ähnlichen Protease-Inhibitor von *Echinococcus multilocularis* von 50% angezeigt.

Beim Aminosäureabgleich von Av-Serpin, Ce-Serpin und Et-Serpin mit dem Serpin 1 von *B. malayi* und dem *T. spiralis*-Serpin sind Übereinstimmungen mit den konservierten Bereichen Serpin-Motiv und Serpin-Signatur zu erkennen (Abbildung 17).

			10		20		30																												
Av-Serpin.	S	P	E	E	K	K	L	A	A	A	-	-	K	L	W	R	E	Y	K	T	-	-	-	P	E	-	-	-	-						
Ce-Serpin	V	D	E	E	G	T	K	A	A	A	A	T	T	V	S	I	S	L	K	S	A	M	F	V	M	E	E	P	K	D					
Et-Serpin	V	N	E	E	G	T	E	A	T	A	A	S	A	M	I	M	M	L	R	A	M	P	M	P	K	-	T	P	I	N					
Bm-SPN-1	V	N	E	K	G	T	E	S	A	A	A	T	I	I	E	L	E	D	R	M	G	S	S	R	N	-	-	-	-	-					
TS 11-1.	F	N	E	E	G	T	E	A	A	A	A	T	A	V	R	I	V	P	M	S	G	V	M	Y	E	D	S	F	-	E					
	V	N	E	E	G	T	E	A	A	A	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P					
	Serpin-Motiv																																		
				40		50		60																											
Av-Serpin.	-	-	G	R	P	Y	Y	N	I	E	T	K	-	-	-	E	T	T	W	I	C	P	K	D	F	D	P								
Ce-Serpin	F	T	A	D	H	P	F	F	F	V	L	S	K	D	-	-	-	N	H	P	L	F	V	G	L	H	H	*							
Et-Serpin	V	I	I	D	K	P	F	V	F	Q	L	R	F	V	D	G	D	T	N	L	T	L	F	S	G	R	V	A	D	P					
Bm-SPN-1	F	N	A	D	Q	P	F	L	F	A	I	V	K	D	-	-	-	L	K	T	V	L	F	L	G	Q	Y	V	K						
TS 11-1.	F	V	A	D	H	P	F	L	F	F	I	F	D	S	R	-	-	S	K	A	I	L	F	I	G	R	F	S	G	N					
	F	A	D	-	P	F	-	F	I							G	D					L	F	-	G	-				P					
	Serpin-Signatur																																		

Abbildung 17: Aminosäureabgleich von Av-Serpin, Ce-Serpin und Et-Serpin mit Serpinen von *B. malayi* (Bm-SPN-1) und *T. spiralis* (TS 11-1). Identische Aminosäuren sind dunkelgrau, ähnliche Aminosäuren hellgrau unterlegt. Die konservierten Bereiche Serpin-Motiv und Serpin-Signatur sind eingerahmt und entsprechend bezeichnet.

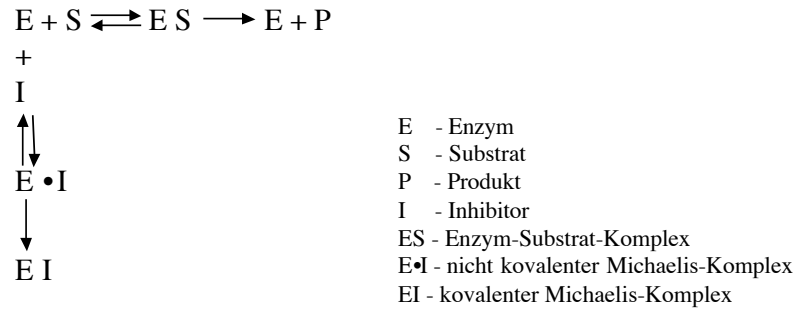
3.4. Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften

Bei der Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften war zu klären, ob die aufgereinigten Proteine aktive Serpine waren. Dazu wurden die Prototyp-Serpinproteasen dieser Inhibitorenklasse verwendet: Trypsin und Chymotrypsin.

Eine eventuelle Zuordnung der potentiellen Serpine zu der Gruppe der cross-class-Inhibitoren wurde mit der Cysteinprotease Papain analysiert.

Eine mögliche Inhibition der porcine Pankreaselastase (PPE) war v.a. beim rEt-Serpin im Hinblick auf die Lokalisation des Parasiten im Gastrointestinaltrakt von Interesse. Vergleichend wurden rAv-Serpin und rCe-Serpin eingesetzt.

Der Einsatz von humaner Neutrophilenelektase (HNE) und Cathepsin G sollte Aufschluß darüber geben, ob die Proteine in der Lage sind, in Entzündungsprozesse einzugreifen.



Schema 1: Schematische Darstellung der Enzymreaktionen.

Die eingesetzten chromogenen Substrate bestehen aus einer Enzym-spezifischen Peptidsequenz, die an das chromogene pNA gekoppelt ist. Die Proteasen setzen den pNA-Rest durch hydrolytische Spaltung frei, was zu einer quantifizierbaren Gelbfärbung führt. Serpine konkurrieren mit dem Substrat um die Protease, wobei sie diese nach der Bindung im Allgemeinen irreversibel hemmen (Schema 1). Diese Inhibition wurde zeit- und konzentrationsabhängig über die Farbänderung mit dem ELISA Reader gemessen.

Die Graphen (Abbildung 18A, 19A, 20A, 21A, 22A, 23A) zeigen deutlich, daß der über das Plaque Screening einer *A. viteae*-Weibchen-cDNA-Bank isolierte Klon Av-Serpin keinerlei inhibitorische Aktivität bezüglich der verwendeten Proteasen zeigte.

Das rCe-Serpin inhibiert die Serinproteasen Trypsin und Cathepsin G (Abbildung 18B, 19B, 20B, 21B, 22B, 23B). Im Vergleich zum rekombinanten Serpin von *E. tenella* sind jedoch wesentlich höhere Konzentrationen notwendig.

Bis auf die Serinprotease HNE und die Cysteinprotease Papain ist das rEt-Serpin in der Lage, alle eingesetzten Serinproteasen zu hemmen (Abbildung 18C, 19C, 20C, 21C, 22C, 23C). Teilweise trat sogar eine vollständige Inhibition auf; das molare Verhältnis von Serinprotease zu Serinprotease-Inhibitor lag dabei im Fall von Trypsin bei 1:12,5 (Trypsin:rEt-Serpin), Chymotrypsin und PPE bei 1:25 (Chymotrypsin/PPE:rEt-Serpin) und Cathepsin G bei 1:6 (Cathepsin G:rEt-Serpin). Um eine exakte Stöchiometrie aufzustellen, müßte die Menge an *E. tenella*-Serpin, die gerade zu einer vollständigen Inhibition führt, austitriert werden.

	rAv-Serpin	rCe-Serpin	rEt-Serpin
Trypsin	-	+	+
Chymotrypsin	-	-	+
Cathepsin G	-	+	+
PPE	-	-	+
HNE	-	-	-
Papain	-	-	-

Schema 2: Schematische Darstellung der inhibitorischen Aktivität von rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin.

Die z. T. höhere proteolytische Aktivität von Proben mit Serpin als von Proben ohne Serpin (Abbildung 19 A/B, 21 A/B, 23 A-C) beruht auf einer geringgradigen hydrolytischen Eigenaktivität der eingesetzten Proteine (Daten nicht gezeigt). Eine stabilisierende Wirkung auf die Proteasestruktur sowie eine Intensivierung der Färbung durch die potentiellen Serpine kann nicht ausgeschlossen werden.

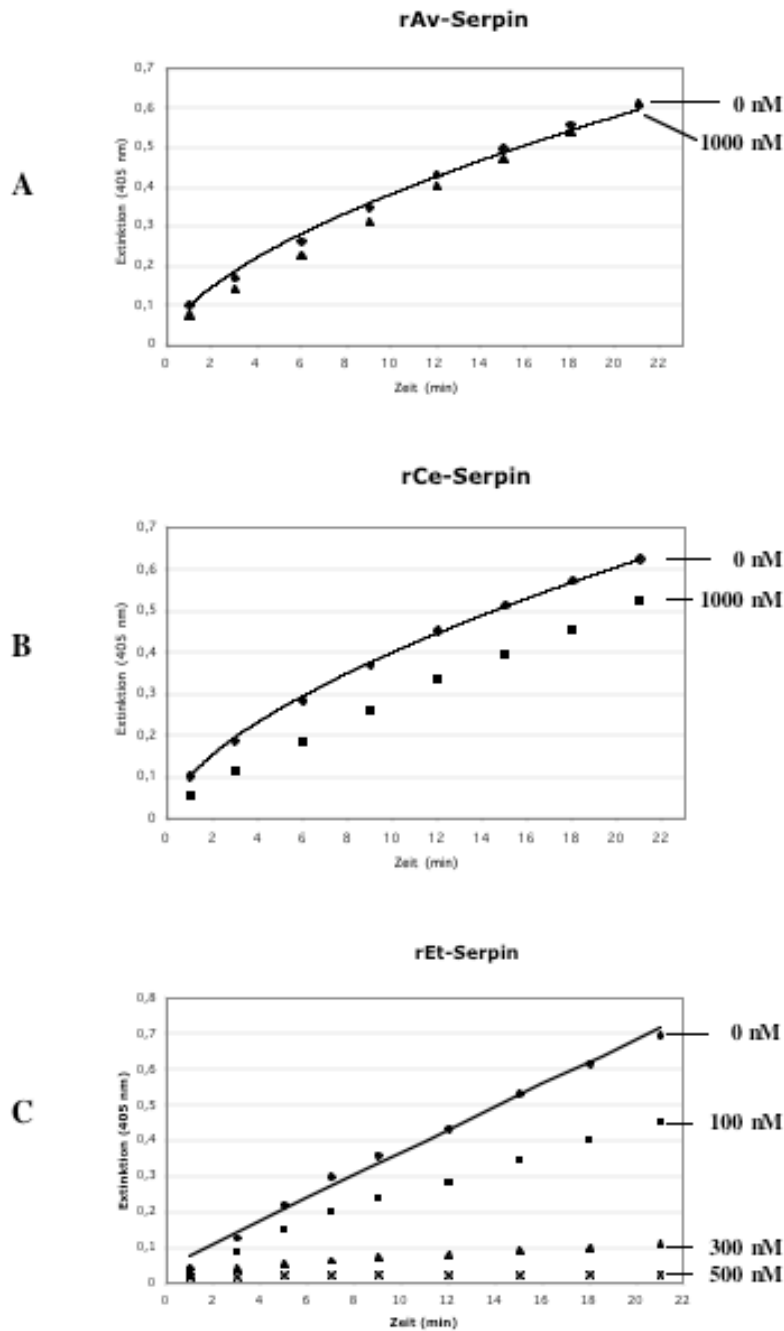


Abbildung 18: Inhibition von Trypsin durch rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C). Die Aktivität von Trypsin (40 nM) nach einer dreißigminütigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (wie angegeben) von rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C) bei 37°C wurde über 20 Minuten kolorimetrisch bestimmt. Das chromogene Substrat BAPNA wurde in einer Konzentration von 92 μM eingesetzt. Die graphische Darstellung zeigt das freigesetzte chromogene pNA, gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

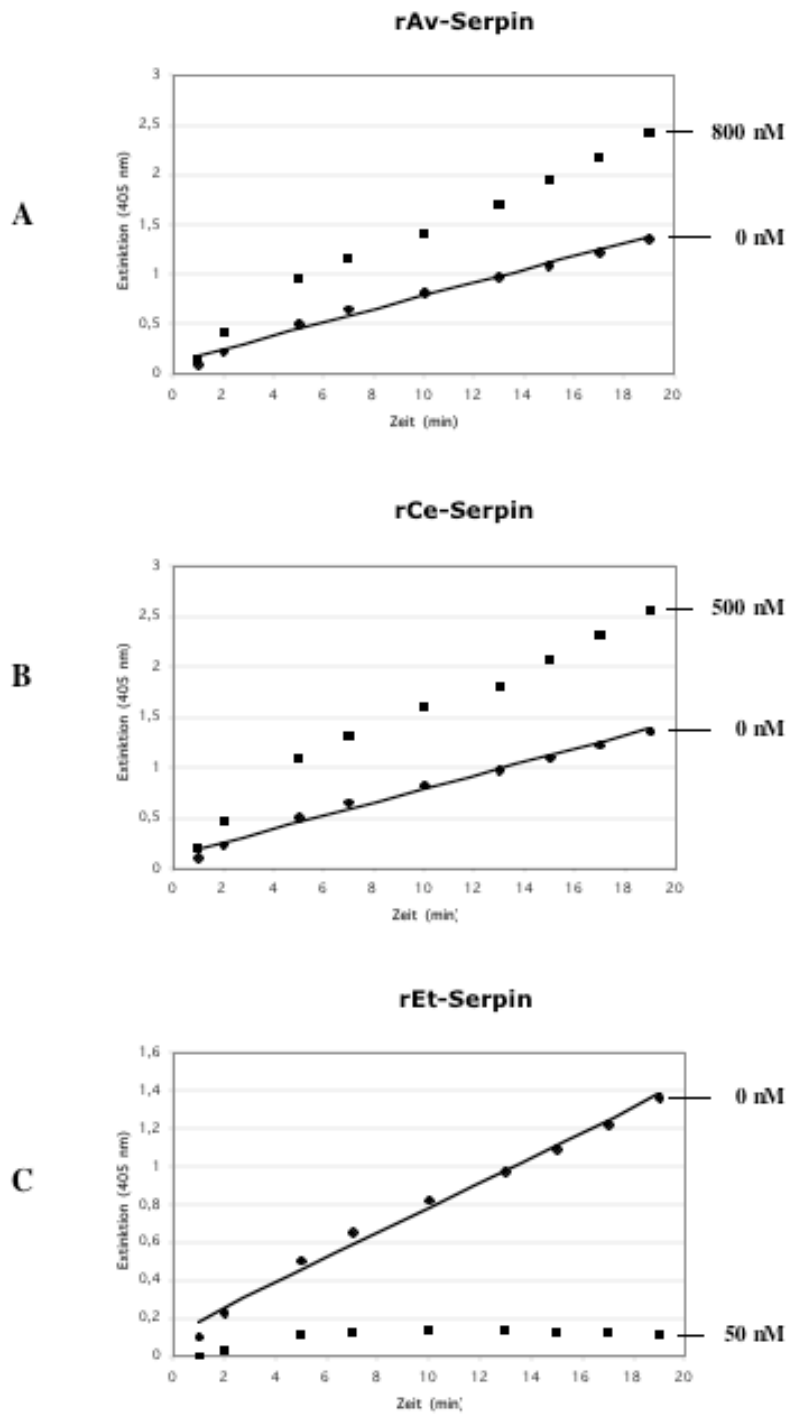


Abbildung 19: Inhibition von Chymotrypsin durch rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C). Die Aktivität von Chymotrypsin (2 nM) nach einer dreißigminütigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (wie angegeben) von rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C) bei 37°C wurde über 20 Minuten kolorimetrisch bestimmt. Das chromogene Substrat Succ-AAPF-pNA wurde in einer Konzentration von 560 μ M eingesetzt. Die graphische Darstellung zeigt das freigesetzte chromogene pNA, gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

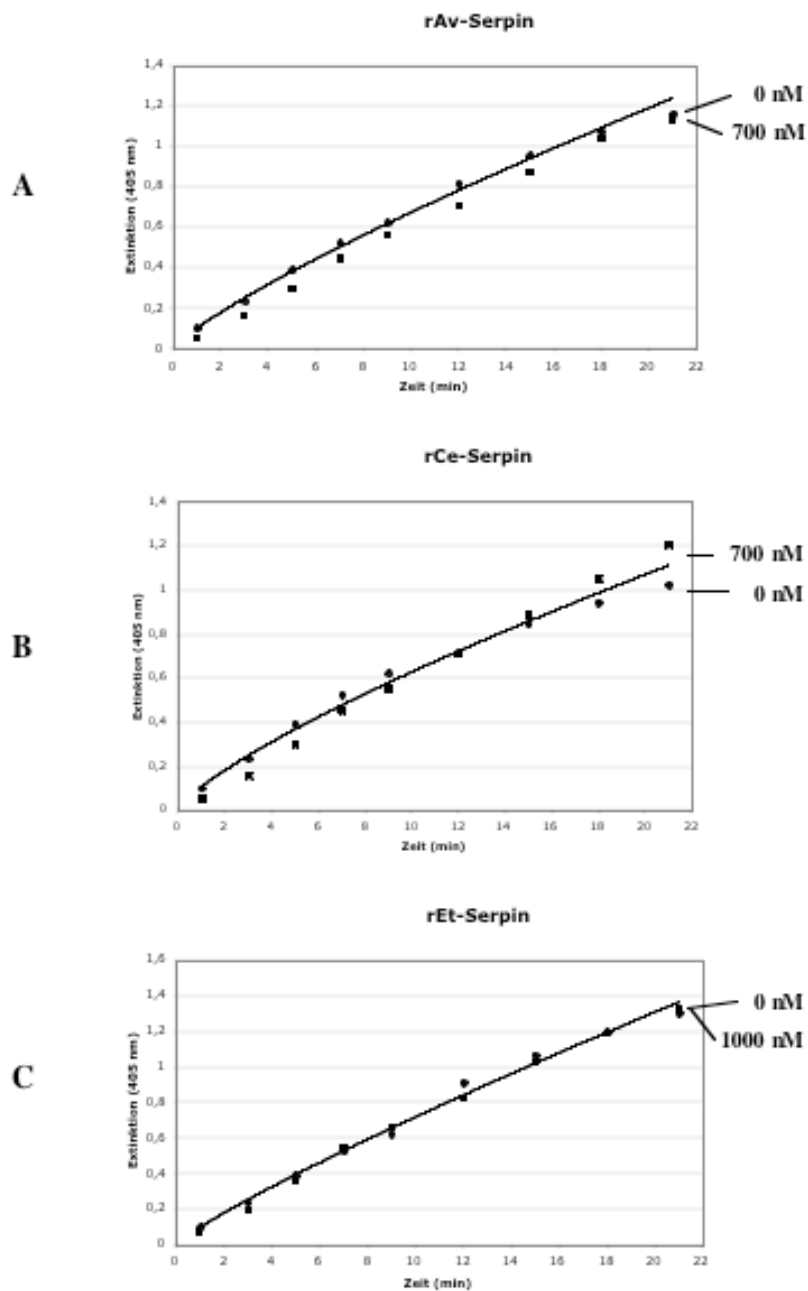


Abbildung 20: Inhibition von Papain durch rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C). Die Aktivität von Papain ($2,4 \mu\text{M}$) nach einer dreißigminütigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (wie angegeben) von rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C) bei 37°C wurde über 20 Minuten kolorimetrisch bestimmt. Das chromogene Substrat BAPNA wurde in einer Konzentration von $92 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die graphische Darstellung zeigt das freigesetzte chromogene pNA, gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

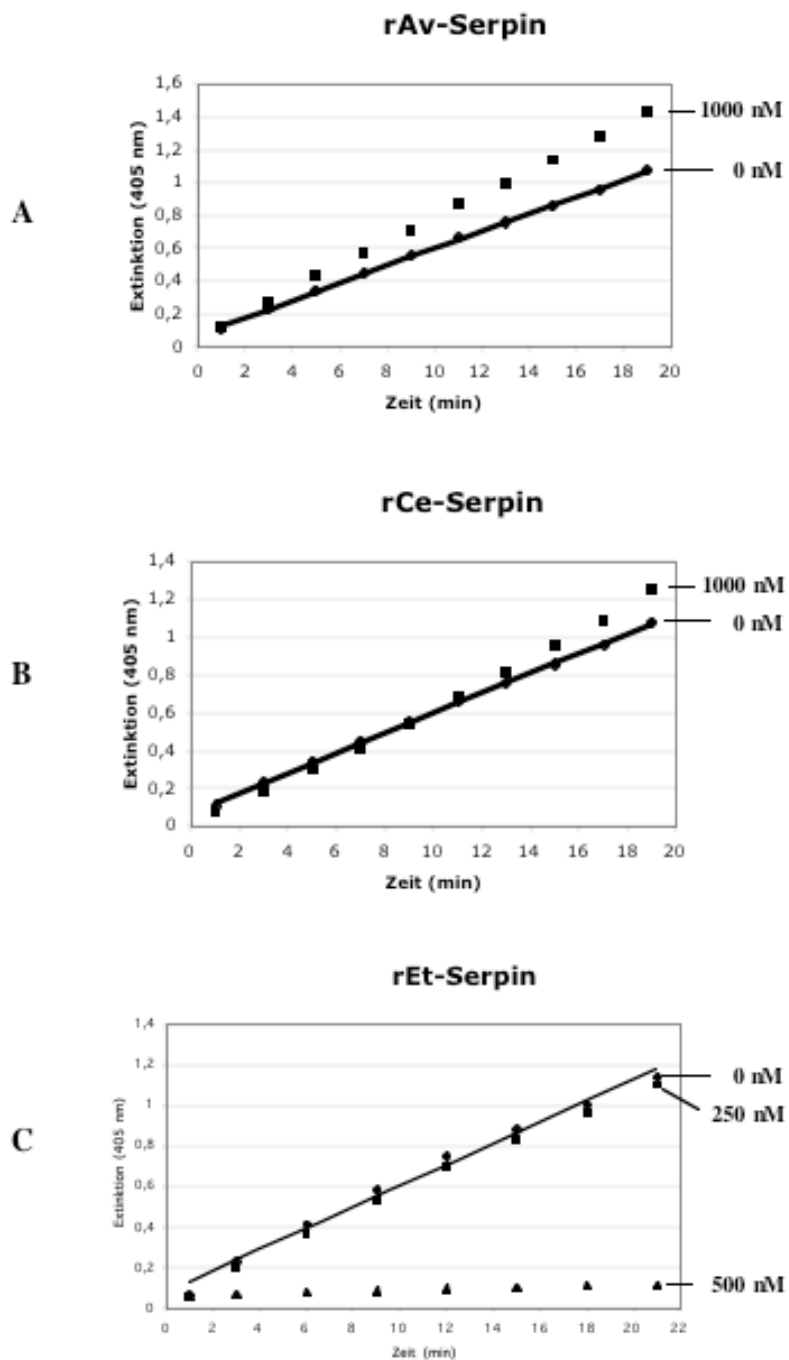


Abbildung 21: Inhibition von PPE durch rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C). Die Aktivität von PPE (20 nM) nach einer dreißigminütigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (wie angegeben) von rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C) bei 37°C wurde über 20 Minuten kolorimetrisch bestimmt. Das chromogene Substrat Succ-AAA-pNA wurde in einer Konzentration von 177 μ M eingesetzt. Die graphische Darstellung zeigt das freigesetzte chromogene pNA, gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

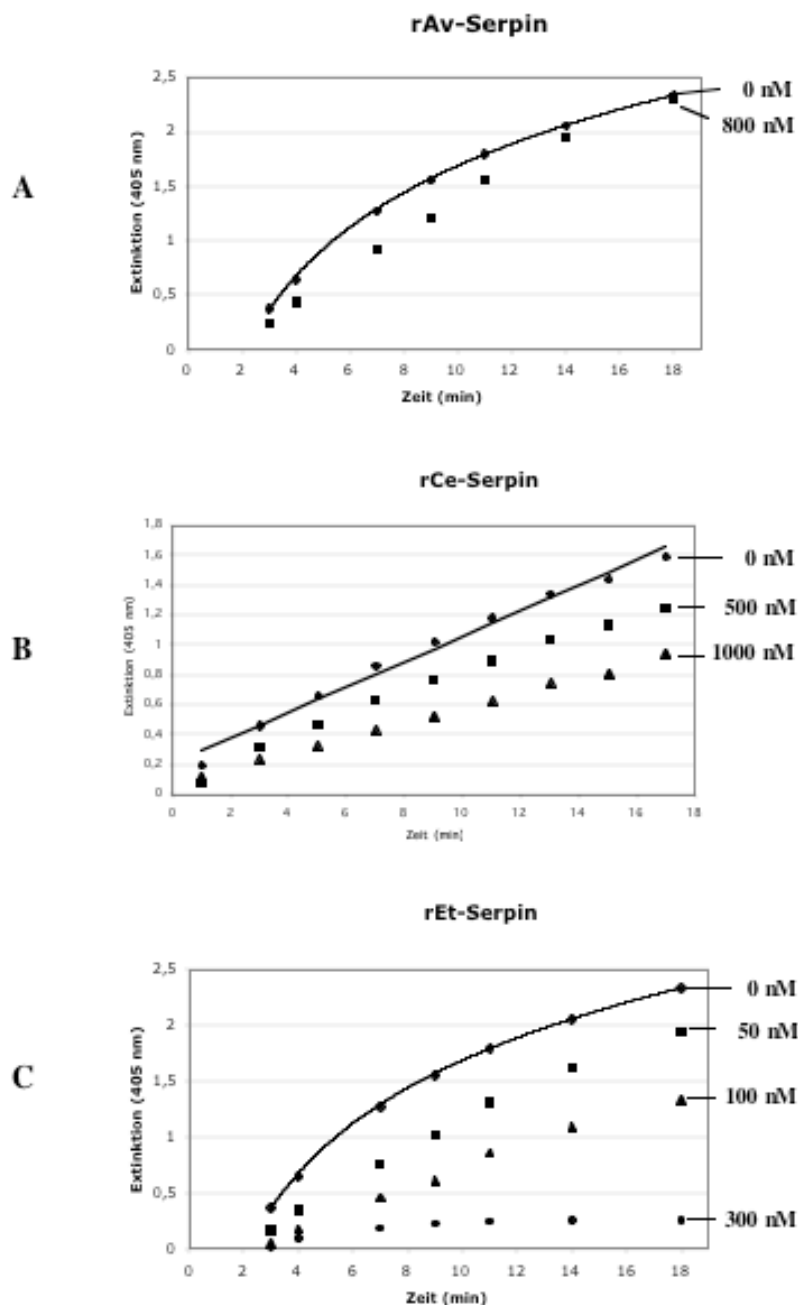


Abbildung 22: Inhibition von Cathepsin G durch rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C). Die Aktivität von Cathepsin G (50 nM) nach einer dreißigminütigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (wie angegeben) von rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C) bei 37°C wurde über 20 Minuten kolorimetrisch bestimmt. Das chromogene Substrat Succ-AAPF-pNA wurde in einer Konzentration von 560 μ M eingesetzt. Die graphische Darstellung zeigt das freigesetzte chromogene pNA, gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

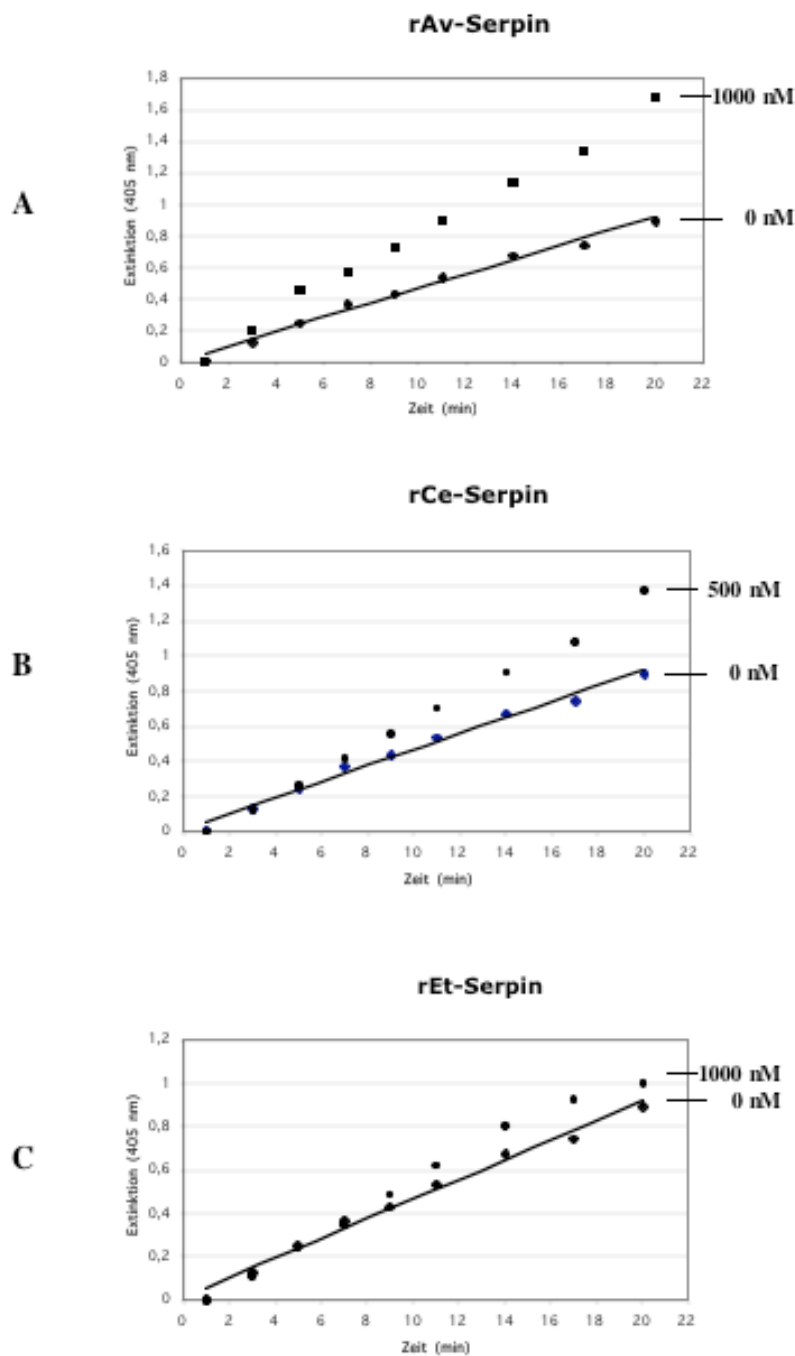


Abbildung 23: Inhibition von HNE durch rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C). Die Aktivität von HNE (20 nM) nach einer dreißigminütigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen (wie angegeben) von rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C) bei 37°C wurde über 20 Minuten kolorimetrisch bestimmt. Das chromogene Substrat Succ-AAV-pNA wurde in einer Konzentration von 833 μ M eingesetzt. Die graphische Darstellung zeigt das freigesetzte chromogene pNA, gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Inhibition der Protease durch das Serpin kann auf inhibitorischen Weg erfolgen oder auf dem sog. Substratweg. Nach der Inkubation von rEt-Serpin mit Trypsin konnten im Western-Blot zwei Banden mit rEt-Serpin-Antiserum detektiert werden, die beide schwächer waren als die Ausgangsbande. Die obere Bande von 49 kDa ist das ungespaltene Serpin, die untere Bande von ca. 44 kDa entspricht der Größe des am P1-Rest gespaltenen Serpin ohne den C-terminalen Teil von ca. 5 kDa. Ein Trypsin-Serpin-Komplex in Form einer Bande bei 73 kDa ist nicht nachweisbar. Dies spricht für eine nicht-inhibitorische Hemmung von Trypsin durch das rEt-Serpin, bei dem das Serpin eine ausschließliche Substratfunktion übernimmt und die Serinprotease nicht in einem inhibitorischen Komplex binden und inaktivieren kann, so daß es zu keiner irreversiblen Hemmung der Serinprotease kommt (Abbildung 24).

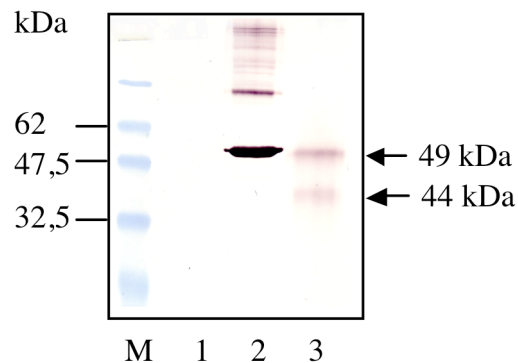


Abbildung 24: Western Blot mit polyklonalem Mausantiserum gegen rEt-Serpin. M – Marker; 1 – Trypsin (2 μ g); 2 – rEt-Serpin (2 μ g); 3 – rEt-Serpin (2 μ g) und Trypsin (2 μ g) nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C. Die Pfeile zeigen das rEt-Serpin mit einem MG von 49 kDa und das gespaltene rEt-Serpin mit einem MG 44 kDa.

3.5. Immunologische Untersuchungen

3.5.1. Reaktivität von polyklonalen Antiseren gegen rekombinantes Ce-Serpin und Et-Serpin

Mit polyklonalen Mausantisera gegen rCe-Serpin und rEt-Serpin wurde die Kreuzreaktivität der einzelnen Antiseren mit rekombinantem und nativem Ce-Serpin bzw. Et-Serpin im Western-Blot getestet.

Die Antiseren kreuzreagierten nicht mit den verschiedenen rekombinanten Proteinen. Aufgrund der geringen Gesamthomologie der Serpine ist die Anzahl gemeinsamer Epitope sehr begrenzt, so daß die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktion gering ist.

Nur das rEt-Serpin-Antiserum war in der Lage, natives Serpin aus *E. tenella*-Merozoiten-Gesamtantigen zu detektieren (Abbildung 25). Die Bande des rekombinanten Et-Serpin ist im SDS-Gel höher als die des nativen, da beim rekombinanten Protein 3,5 kDa Vektorsequenz incl. 6 x Histidin-Tag hinzukommen. Die Antikörper im rCe-Serpin-Antiserum sind gegen Epitope gerichtet, die bei rekombinantem und nativem Ce-Serpin unterschiedlich und somit wahrscheinlich *E. coli*-eigen sind.

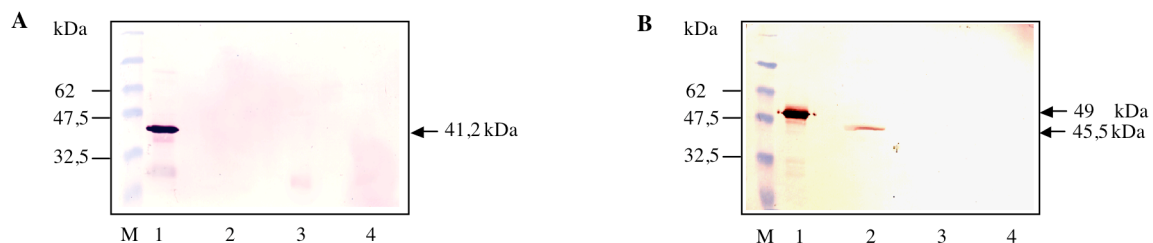


Abbildung 25: Western Blot mit polyklonalen Mausantiseren.

A Polyklonales Mausantiserum gegen rCe-Serpin.

M – Marker; **1** – rCe-Serpin (1 μ g); **2** – *C. elegans*-Gesamtantigen (50 μ g); **3** – rEt-Serpin (1 μ g);
4 – rAv-Serpin (1 μ g)

Der Pfeil zeigt das rCe-Serpin mit einem MG von 41,2 kDa.

B Polyklonales Mausantiserum gegen rEt-Serpin.

M – Marker; **1** – rEt-Serpin (1 μ g); **2** – *E. tenella*-Merozoiten-Gesamtantigen (1 x 10⁷);
3 – rCe-Serpin (1 μ g); **4** – rAv-Serpin (1 μ g)

Die Pfeile zeigen das rEt-Serpin mit einem MG von 49 kDa und das native Et-Serpin mit einem MG 45,5 kDa.

3.5.2. Einfluß von rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin auf die Proliferation von Mausmilzzellen

Für mehrere Protease-Inhibitoren ist bekannt, daß sie die T-Zell-Proliferation hemmen (Breit et al., 1983; Leid et al., 1986; Hartmann et al., 1997), darunter auch das Serpin Bm-SPN-2 von *B. malayi* (Zang et al., 2000). Inwiefern diese Eigenschaft auf das rCe-Serpin und rEt-Serpin zutrifft, wurde an Mausmilzzellen untersucht.

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

Für die ConA-Stimulation wurden je Ansatz $3,5 \times 10^5$ Milzzellen eingesetzt und mit verschiedenen Mengen rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin für 68 Stunden inkubiert.

Die Proliferation der Milzzellen von BALB/c-Mäusen wird im Vergleich zur ConA-Kontrolle durch rCe-Serpin bei einer Proteinkonzentration von $1 \mu\text{M}$ um durchschnittlich 29%, durch rEt-Serpin bei gleicher Proteinkonzentration um durchschnittlich 33% und durch $1 \mu\text{M}$ rAv-Serpin um 11% gehemmt (Abbildung 26).

Ein stärkerer inhibitorischer Effekt auf die T-Zell-Proliferation durch rCe-Serpin und rEt-Serpin tritt bei der Inkubation mit OVA-Mausmilzzellen auf, die zuvor ebenfalls mit dem Mitogen ConA stimuliert wurden. Hier hemmt $1 \mu\text{M}$ rCe-Serpin die Proliferation um 47% und $1 \mu\text{M}$ rEt-Serpin um 61%. Die gleiche Konzentration rAv-Serpin beeinflusst die T-Zell-Proliferation nicht (Abbildung 27).

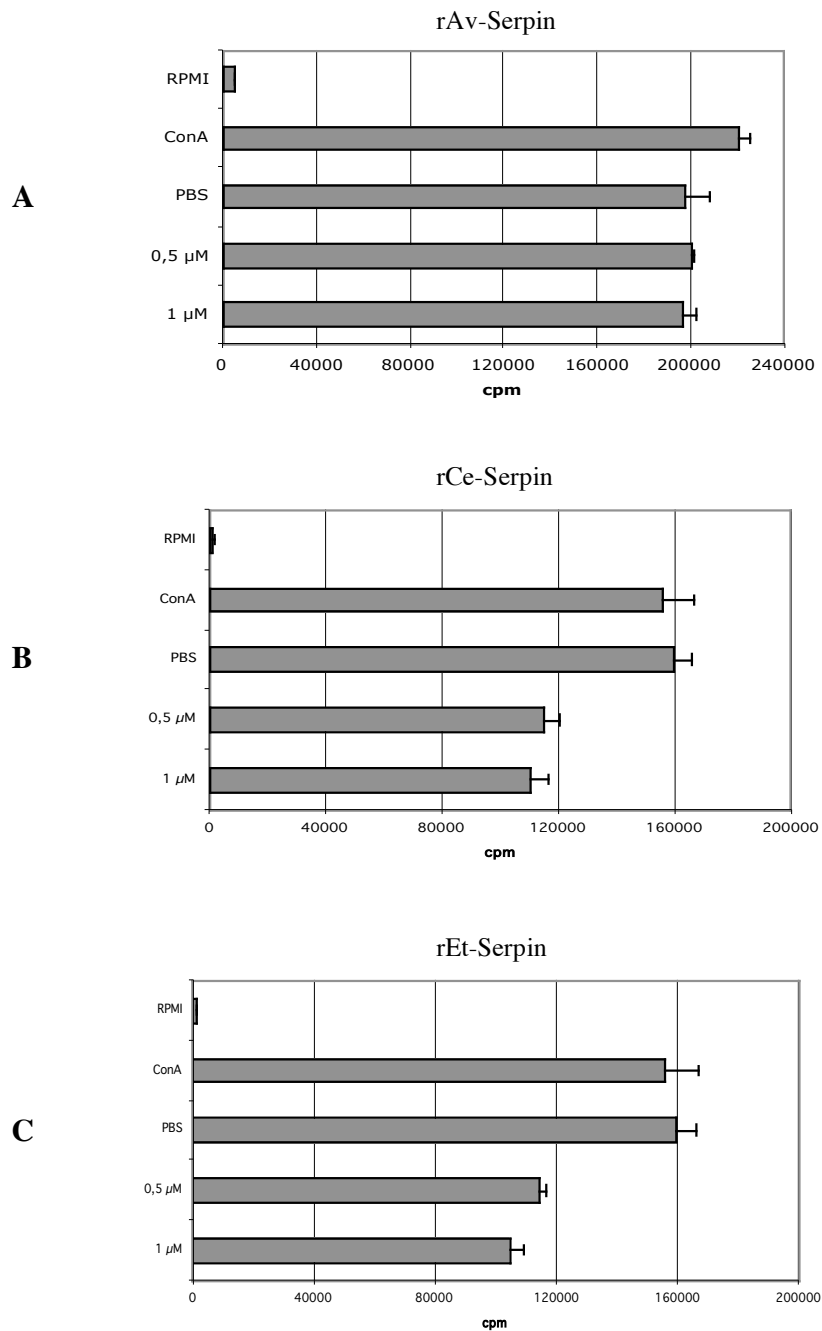


Abbildung 26: ConA-stimulierte Proliferation von Milzzellen von BALB/c-Mäusen in Anwesenheit von rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C).

BALB/c-Milzzellen wurden *in vitro* mit 2 μ g/ml ConA stimuliert und mit 0,5 μ M und 1 μ M rekombinanten Av-Serpin (A), Ce-Serpin (B) und Et-Serpin (C) für 68 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte über den Einbau von 3 H-Thymidin in die Zell-DNA, das für die letzten 20 Stunden zugegeben wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, die aus den dreifach bestimmten Proliferationswerten berechnet wurden. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von gepoolten Milzzellen von mindestens zwei Tieren.

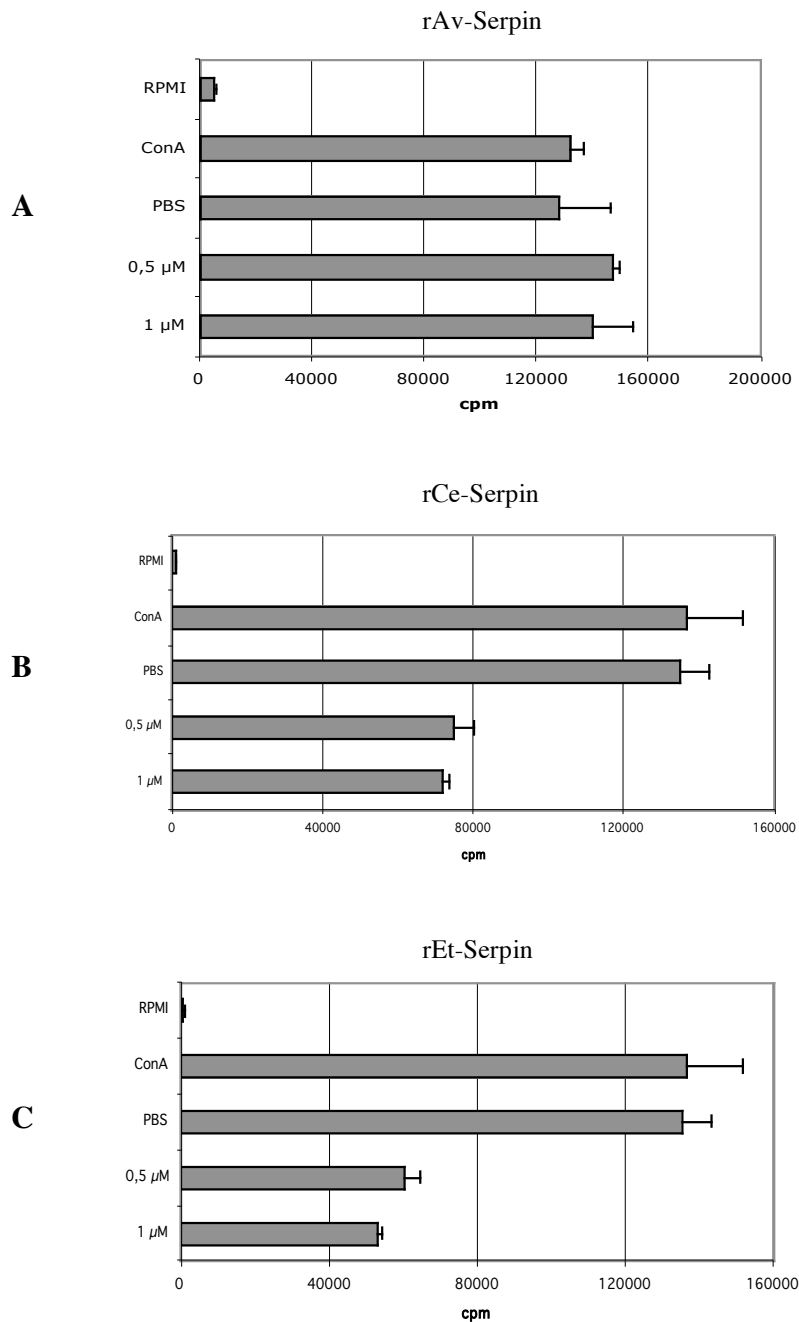


Abbildung 27: ConA-stimulierte Proliferation von Milzzellen von OVA-Mäusen in Anwesenheit von rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C).

OVA-Milzzellen wurden *in vitro* mit 2 µg/ml ConA stimuliert und mit 0,5 µM und 1 µM rekombinanten Av-Serpin (A), Ce-Serpin (B) und Et-Serpin (C) für 68 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte über den Einbau von ³H-Thymidin in die Zell-DNA, das für die letzten 20 Stunden zugegeben wurde. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung, die aus den dreifach bestimmten Proliferationswerten berechnet wurden. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von gepoolten Milzzellen von mindestens zwei Tieren.

3.5.2.2. Einfluß von rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin auf die Proliferation antigenspezifisch stimulierter Milzzellen von OVA-Mäusen

Um den Einfluß von rCe-Serpin, rEt-Serpin und rAv-Serpin auf die Proliferation von T-Zellen zu untersuchen, die antigenspezifisch stimuliert worden sind, wurden je Ansatz $3,5 \times 10^5$ Milzzellen von Ovalbuminrezeptor-transgenen Mäusen mit dem Antigen Ovalbumin stimuliert und mit $0,5 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ der rekombinanten Proteine für 92 Stunden inkubiert. Bei einer Proteinkonzentration von $1 \mu\text{M}$ induziert rCe-Serpin eine Inhibition von 23%, rEt-Serpin von nur 13% und rAv-Serpin hat mit 3% Proliferationssuppression kaum Einfluß (Abbildung 28).

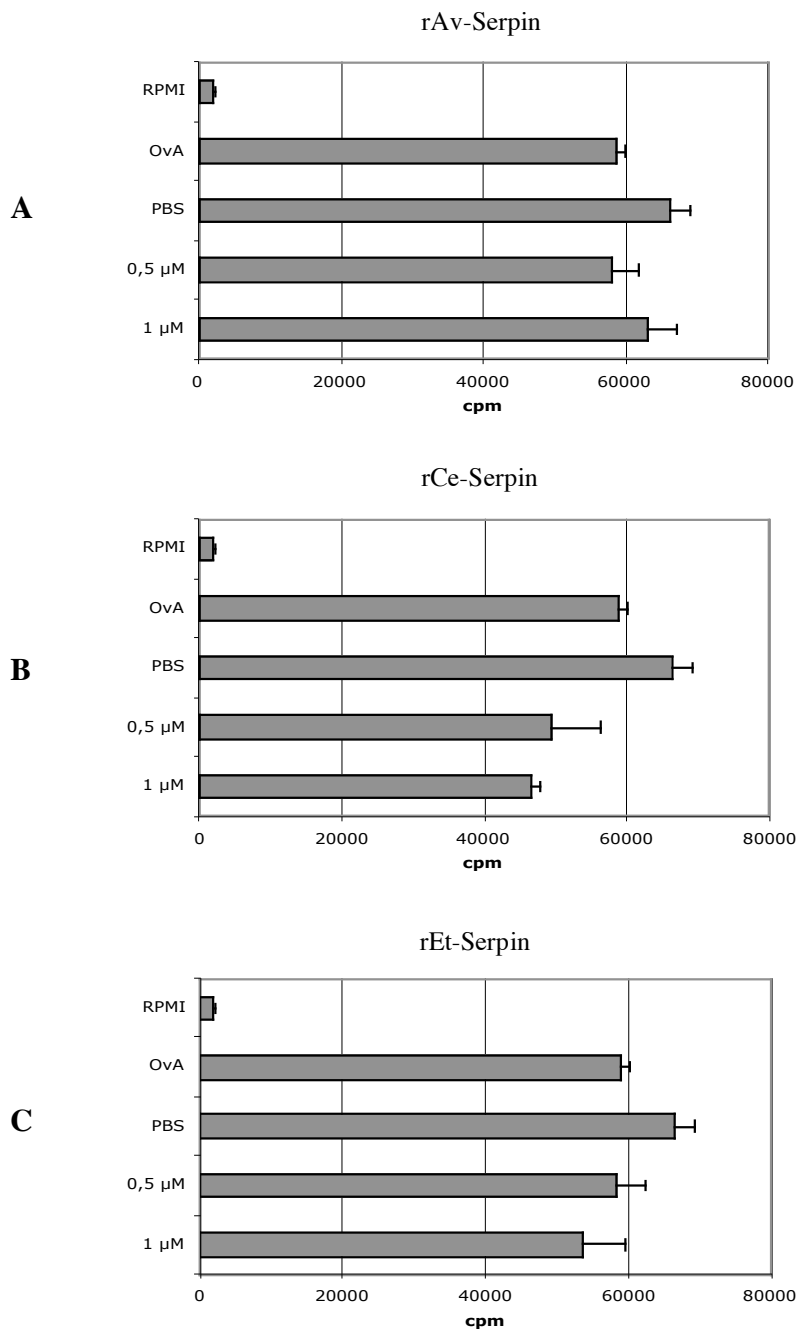


Abbildung 28: OVA-stimulierte Proliferation von Milzzellen von OVA-Mäusen in Anwesenheit von rAv-Serpin (A), rCe-Serpin (B) und rEt-Serpin (C).

OVA-Milzzellen wurden *in vitro* mit 1 μ M OVA stimuliert und mit 0,5 μ M und 1 μ M rekombinanten Av-Serpin (A), Ce-Serpin (B) und Et-Serpin (C) für 92 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte über den Einbau von ^3H -Thymidin in die Zell-DNA, das für die letzten 20 Stunden zugegeben wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, die aus den dreifach bestimmten Proliferationswerten berechnet wurden. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von gepoolten Milzzellen von mindestens zwei Tieren.

3.5.3. Einfluß von rAv-Serpin, rCe-Serpin und rEt-Serpin auf die Zytokinproduktion polyklonal stimulierter Milzzellen von OVA-Mäusen

Der stärkste inhibitorische Effekt von rCe-Serpin und rEt-Serpin auf die T-Zell-Proliferation tritt bei polyklonal stimulierten OVA-Mausmilzzellen auf. Da beim Cystatin Av17 von *A. viteae* die Inhibition der polyklonal stimulierten T-Zell-Proliferation mit einer erhöhten IL-10 Produktion assoziiert ist (Hartmann et al., 1997), sollte dieses Zytokin in diesem Zusammenhang überprüft werden.

rCe-Serpin führt zu einer dosisabhängigen Verstärkung der IL-10-Produktion, die, auf die ConA-Kontrolle bezogen, um das 6 (0,5 μM rCe-Serpin) bis 7,3fache (1,5 μM rCe-Serpin) erhöht ist. Auch rEt-Serpin zeigt eine dosisabhängige Erhöhung der IL-10-Bildung um das 2,6 (0,5 μM rEt-Serpin) bis 3,6fache (1,5 μM rEt-Serpin) bezüglich der ConA-Kontrolle. Da die Werte des ELISA insgesamt relativ niedrig sind, kann das Ergebnis für das rEt-Serpin nur als Tendenz gewertet werden und muß in einem weiteren Test bestätigt werden (Abbildung 29).

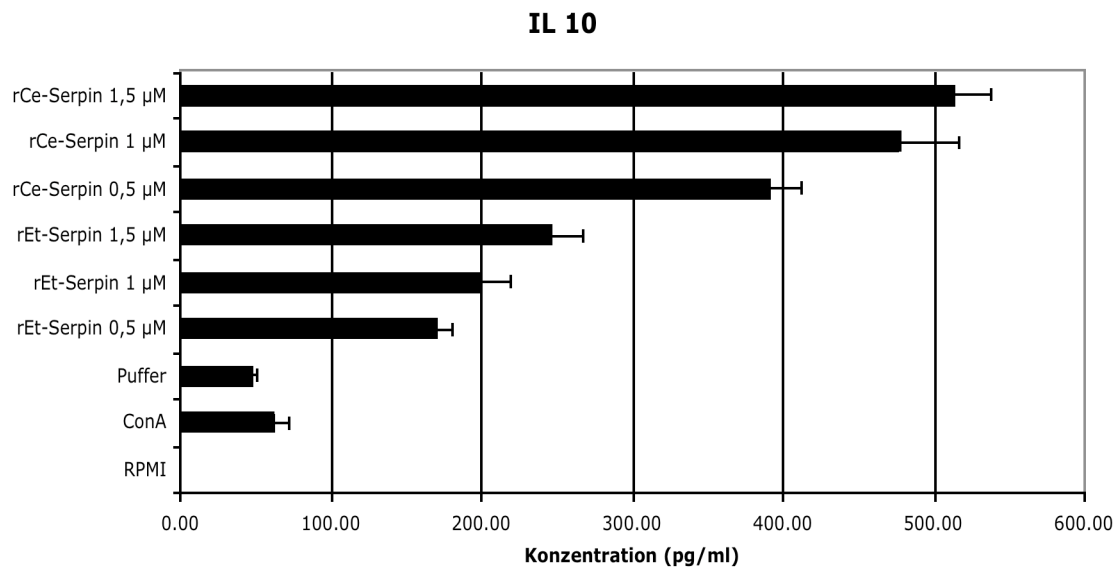


Abbildung 29: Zytokin-Produktion von Milzzellen von OVA-Mäusen in Anwesenheit von rCe-Serpin und rEt-Serpin.

OVA-Milzzellen wurden *in vitro* mit 2 $\mu\text{g/ml}$ ConA stimuliert und mit 0,5 μM , 1 μM und 1,5 μM Ce-Serpin und Et-Serpin für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände abgenommen und im ELISA eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, die aus den dreifach bestimmten IL-10-Konzentrationen berechnet wurden. Es wurden gepoolten Milzzellen von mindestens zwei Tieren verwendet.