

**Untersuchungen  
zur *in vitro* Kultivierung  
und  
Charakterisierung von  
MAP-Kinase-Kaskade-Komponenten  
des Fuchsbandwurmes  
*Echinococcus multilocularis***

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Markus Spiliotis  
aus Ulm

Würzburg, Februar 2006

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Summary.....	2
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Der kleine Fuchsbandwurm: Echinococcus multilocularis.....	3
2.1.1 Phylogenie, Verbreitung und allgemeine Biologie der Echinokokken.....	3
2.1.2 Die alveoläre Echinokokkose.....	6
2.2 Echinococcus multilocularis im Labor.....	7
2.3 Wirt-Parasit-Interaktion .....	9
2.4 EGF - Signaling und MAP-Kinase-Kaskade.....	11
2.5 EGF - Wachstumsfaktor.....	13
2.6 EGF- Rezeptor .....	13
2.7 GTPasen der Ras-Familie (Ras, Rap1, Rap2, Ral).....	15
2.7.1 RAS.....	16
2.7.2 RAP1/2.....	16
2.7.3 RAL.....	17
2.8 Raf (MKKK).....	17
2.9 14-3-3-Proteine.....	19
2.10 MEK (MKK):.....	19
2.11 ERK (MAPK):.....	20
2.12 Ziele dieser Arbeit.....	22
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
3.1 EmER.....	23
3.1.1 emer - molekularbiologische Charakterisierung des chromosomalen Locus.....	23
3.1.2 emer - Echinokokkenspezifität.....	24
3.1.3 emer - Expression in verschiedenen Larvenstadien.....	24
3.2 EmRas.....	27
3.2.1 emras - cDNA und genomischer Locus.....	27
3.2.2 emras - Echinokokkenspezifität.....	29
3.2.3 emras - Expression in verschiedenen Larvenstadien von E. multilocularis.....	29
3.2.4 EmRas - Nachweis in verschiedenen E. multilocularis Larvenstadien.....	30
3.2.5 EmRas bindet GTP.....	31
3.2.6 EmRas ist farnesyliert.....	32
3.2.7 emras - Funktionelle Komplementation einer Hefen-Ras2-Mutante .....	32
3.2.8 EmRas - in vivo Interaktionsstudien mit EmRaf über Yeast-2-Hybrid.....	33
3.3 EmRal.....	34
3.3.1 emral - cDNA und genomischer Locus.....	34
3.3.2 emral - Echinokokkenspezifität.....	36
3.3.3 emral - Expression in verschiedenen Larvenstadien von E. multilocularis.....	37

3.3.4 EmRal bindet GTP.....	38
3.3.5 EmRal ist geranylgeranyliert.....	38
3.3.6 EmRal- in vivo Interaktionsstudien mit EmRaf über Yeast-2-Hybrid.....	39
3.4 EmRap1.....	40
3.4.1 emrap1 - cDNA und genomischer Locus.....	40
3.4.2 emrap1 - Echinokokkenspezifität.....	42
3.4.3 emrap1 - Expression in verschiedenen Larvenstadien von E. multilocularis.....	42
3.4.4 EmRap1 - Nachweis in verschiedenen E. multilocularis Larvenstadien.....	42
3.4.5 EmRap1 ist farnesyliert.....	43
3.4.6 EmRap1 bindet GTP.....	44
3.4.7 EmRap1 - in vivo Interaktionsstudien mit EmRaf über Yeast-2-Hybrid.....	44
3.5 EmRap2.....	46
3.5.1 emrap2 - cDNA und genomischer Locus.....	46
3.5.2 emrap2 - Echinokokkenspezifität.....	48
3.5.3 emrap2 - Expression in verschiedenen Larvenstadien von E. multilocularis.....	48
3.5.4 EmRap2 bindet kein GTP.....	48
3.5.5 EmRap2 ist farnesyliert und geranyl-geranyliert.....	49
3.5.6 EmRap2- in vivo Interaktionsstudien mit EmRaf über Yeast-2-Hybrid.....	50
3.6 EmRaf.....	51
3.6.1 emraf - Charakterisierung der cDNA.....	51
3.6.2 emraf - Charakterisierung des chromosomalen Locus und Southern-Blot.....	54
3.6.3 emraf - Echinokokkenspezifität.....	56
3.6.4 emraf - Expression in verschiedenen Larvenstadien von E. multilocularis.....	56
3.6.5 EmRaf - In vivo Interaktionen mit verschiedenen E. multilocularis-Faktoren.....	57
3.7 Em14-3-3.2.....	59
3.7.1 em14-3-3.2 - cDNA und genomischer Locus.....	59
3.7.2 Em14-3-3.2 - in vivo Interaktionsstudien über Yeast-2-Hybrid-Experimente.....	60
3.8 EmMKK-A/B.....	61
3.8.1 emmkk - Charakterisierung der cDNA.....	61
3.8.2 emmkk - Charakterisierung des chromosomalen Locus und Southern-Blot-Analysen.....	63
3.8.3 emmkk - differentielles Spleißen führt zu zwei cDNA-Varianten.....	64
3.8.4 emmkk - Echinokokkenspezifität.....	64
3.8.5 emmkk - Expression in verschiedenen Larvenstadien von E. multilocularis.....	65
3.8.6 EmMKK - in vivo Interaktionen mit EmRaf und EmERK (Yeast-Two-Hybrid).....	65
3.9 EmERK-A/B/C.....	67
3.9.1 emerck - Charakterisierung der cDNA und differentielles Spleißen.....	67
3.9.2 emerck - Charakterisierung des chromosomalen Locus und Southern-Blot.....	69
3.9.3 emerck - Echinokokkenspezifität.....	70
3.9.4 emerck - Expression in verschiedenen Larvenstadien von E. multilocularis.....	71
3.9.5 emerck - differentielles Spleißen führt zu drei cDNA-Varianten.....	71

3.9.6 EmERK - Proteinexpression.....	73
3.9.7 EmERK - in vivo Phosphorylierungsassays.....	76
3.9.8 EmERK - Kinaseaktivität.....	77
3.9.9 EmERK - in vivo Interaktionen mit EmMKK (Yeast-Two-Hybrid).....	78
3.10 Optimierung der in vitro Co-Kultivierung von Echinokokken-Metacestodenvesikeln.....	79
3.11 Differenzierung von sterilen Adultwürmern.....	80
3.12 Axenisches Kultursystem.....	82
3.12.1 Axenisches Kultursystem: Auswahl und Entfernung der Fütterzellen.....	84
3.12.2 Axenisches Kultursystem: ideale Wachstumsbedingungen.....	84
3.12.2.1 Einfluß reduzierender Bedingungen.....	86
3.12.2.2 Auswirkung von Sauerstoff im Medium und in der Gasphase.....	86
3.12.2.3 Auswirkung der Medienwechselhäufigkeit.....	87
3.12.2.4 Auswirkungen des pH-Wertes.....	88
3.12.3 Verwendung verschieden konditionierter RH- Medien (cMEM).....	90
3.12.4 Ax. Kultursystem: Konditionierte Medien verschiedener Zelllinien.....	91
3.12.5 Axenisches Kultursystem: Einfluß von Wachstumsfaktoren .....	92
3.12.5.1 Einfluß von Insulin auf axenisch kultivierte Metacestodenvesikel.....	93
3.12.5.2 Einfluß von BMP2 auf axenisch kultivierte Metacestodenvesikel.....	94
3.12.5.3 Einfluß von EGF auf axenisch kultivierte H95-Metacestodenvesikel.....	96
3.12.6 Axenisches Kultursystem: verschiedene Echinokokken-Isolate.....	97
3.12.7 Axenisches Kultursystem: Beobachtung der Differenzierung.....	98
3.12.8 Axenisches Kultursystem: Übertragung der Brutkapselbildung.....	99
3.13 Isolation von <i>E. multilocularis</i> -Primärzellen.....	101
3.14 Genetische Manipulation von <i>E. multilocularis</i> .....	107
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>110</b>
4.1 MAP-Kinase-Kaskade.....	110
4.1.1 EmER.....	111
4.1.2 GTPasen der Ras-Familie.....	111
4.1.3 EmRaf.....	112
4.1.4 EmMKK.....	113
4.1.5 EmERK.....	114
4.2 in vitro Kultursysteme.....	116
4.2.1 Co-Kultur.....	116
4.2.2 axenisches Kultursystem.....	117
4.2.3 Einfluß von Wachstumsfaktoren auf Metacestodenvesikel.....	118
4.2.4 Übertragung der Brutkapselbildung in Metacestodenvesikeln.....	120
4.2.5 Kultivierung von Echinokokken-Primärzellen.....	120
4.2.6 Genetische Manipulation von <i>E. multilocularis</i> .....	121
<b>5 Material und Methoden.....</b>	<b>123</b>
5.1 Material.....	123

5.1.1 Geräte.....	123
5.1.2 Verbrauchsmaterial.....	123
5.1.3 Enzyme, Reaktionskits und zusätzliche Chemikalien.....	124
5.2 Arbeiten mit Nucleinsäuren.....	125
5.2.1 Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration.....	125
5.3 Arbeiten mit RNA.....	125
5.3.1 Isolierung von RNA.....	125
5.3.2 Aufreinigung von RNA.....	126
5.3.3 Gelelektrophorese RNA.....	126
5.3.4 T7 RNA – Transkription (in vitro).....	127
5.3.5 Herstellung von cDNA.....	127
5.3.6 Identifizierung von vollständigen mRNAs über 3'-RACE und 5'-RACE.....	128
5.3.7 Northern-Blot (RNA).....	128
5.4 Arbeiten mit DNA.....	129
5.4.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus eukaryontischem Material.....	129
5.4.2 Isolierung von Plasmid DNA aus E.coli .....	129
5.4.3 Gelelektrophorese DNA.....	130
5.4.4 Aufreinigung von DNA aus Gelen, PCR – und Restriktionsverdau- Ansätzen.....	130
5.4.5 DNA-Fällung.....	130
5.4.6 PCR.....	130
5.4.7 degenerative PCR.....	131
5.4.8 RT-PCR.....	132
5.4.9 kompetitive PCR.....	132
5.4.10 Klontest – PCR (E.coli und Hefen).....	132
5.4.11 PCR-basierte Mutagenese.....	133
5.4.12 Herstellung von Proteinchimären über PCR.....	134
5.4.13 DNA Sequenzierung.....	134
5.4.14 Enzymatischer Verdau von DNA.....	134
5.4.15 Ligation.....	135
5.4.16 TA-Klonierung und Topo-TA-Klonierung (Invitrogen).....	135
5.4.17 Southern-Blot (chr DNA).....	136
5.4.18 virtueller Northern-Blot (cDNA).....	137
5.5 Arbeiten mit Proteinen.....	138
5.5.1 Gelelektrophorese mit Proteinen.....	138
5.5.2 Färbung eines Protein-PAA-Gels mit Coomassie-Blue.....	139
5.5.3 Nachweis von Proteinen über Western – Blot.....	139
5.5.4 Herstellung von proteinhaltigen Lysaten.....	140
5.5.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	141
5.5.6 Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine.....	141
5.5.7 Dialyse.....	142

5.5.8 Konzentration von Proteinen.....	142
5.5.9 Immunopräzipitation .....	143
5.5.10 GTP – Bindungsassay.....	143
5.5.11 Kinaseassay – EmERK und Emp38.....	144
5.5.12 In vitro Translation mit rabbit – Reticulocytenlysat .....	144
5.5.13 Prenylierung kleiner GTP-bindender Proteine.....	144
5.6 Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	146
5.6.1 Stämme.....	146
5.6.2 Medien und Zusätze.....	146
5.6.3 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> .....	146
5.6.4 Transformation.....	147
5.6.5 Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i> .....	147
5.7 Arbeiten mit Hefen.....	148
5.7.1 Material.....	148
5.7.2 Transformation von Hefen.....	148
5.7.3 Yeast 2 Hybrid.....	149
5.8 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen.....	150
5.8.1 Medien und Medienzusätze.....	150
5.8.2 verwendete Zelllinien.....	150
5.8.3 Kultivierung von Zellen.....	150
5.8.4 Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen.....	151
5.8.5 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen (S2-Zellen).....	151
5.9 Arbeiten mit <i>E. multilocularis</i> Parasitenmaterial.....	152
5.9.1 In vivo Kultursystem von <i>E. multilocularis</i> (Passagieren von PM).....	152
5.9.2 verschiedene <i>E. multilocularis</i> -Isolate.....	152
5.9.3 Isolierung und Verarbeitung von in vivo kultivierten Parasitenmaterial.....	152
5.9.4 Herstellung von Gesamtlarvenantigen.....	153
5.9.5 Herstellung von Echinokokkenlysat .....	153
5.9.6 Isolation von CA-Körperchen, Protoscolices und deren Aktivierung.....	153
5.10 In vitro Co – Kultivierung von <i>E. multilocularis</i> .....	154
5.10.1 Co-Kultivierung von Metacestodenvesikeln mit Fütterzellen.....	154
5.10.2 sterile Adultstadien von <i>E. multilocularis</i> .....	155
5.11 Axenische Kultivierung von <i>E. multilocularis</i> .....	155
5.11.1 Medien für die axenische Kultivierung.....	156
5.11.2 Herstellung und Umgang mit axenischen Metacestodenvesikeln.....	156
5.11.3 Aufbau eines axenischen Versuchs.....	157
5.11.4 Die „richtigen“ Metacestodenvesikel.....	157
5.11.5 Versuchsablauf.....	158
5.11.6 Auswertung von Wachstum und Differenzierung.....	159
5.11.7 Axenische Kultur: Kurzanleitung.....	159

5.12 Herstellung von Echinokokken-Primärzellen.....	160
5.13 Vektorsequenzen.....	161
5.13.1 pSecTag2/Hygro A,B,C (Invitrogen).....	161
5.13.2 pMT/BiP/V5-His A,B,C (Invitrogen).....	162
5.13.3 pB3385 und pB3386 Hefevektoren (Hum, ATCC 77106).....	162
5.13.4 pCS2 + MT.....	163
5.13.5 pGADT7 und pGBKT7 (Clontech).....	164
5.13.6 VEKTOR Ig4-5.....	166
5.13.7 pBAD /pBAD ThioFusion (Invitrogen) .....	166
5.13.8 pCR 2.1 TOPO (Invitrogen).....	167
5.14 EmER.....	168
5.14.1 EmER - Material und Methoden.....	168
5.14.2 emer (cDNA).....	169
5.14.3 EmER (Proteinsequenz).....	170
5.14.4 emer (Map).....	171
5.14.5 emer (Oligonucleotide).....	175
5.14.6 EmER - Sequenzanalysen.....	179
5.15 EmERK-A/B/C.....	182
5.15.1 EmERK: Material und Methoden.....	182
5.15.2 emer-A (cDNA).....	185
5.15.3 emer-B (cDNA).....	186
5.15.4 emer-C (cDNA).....	186
5.15.5 EmERK-A/B/C (Proteinsequenzen).....	187
5.15.6 emer-A/B/C (chromosomaler Locus).....	187
5.15.7 emer-A (Map).....	189
5.15.8 emer-B (Map).....	190
5.15.9 emer-C (Map).....	191
5.15.10 emer-A/B/C (Oligonucleotide).....	192
5.16 EmMKK-A/B.....	194
5.16.1 EmMKK: Material und Methoden.....	194
5.16.2 emmkk-B (cDNA).....	195
5.16.3 EmMKK-B (Proteinsequenz).....	195
5.16.4 emmkk-A (cDNA).....	196
5.16.5 EmMKK-A (Proteinsequenz).....	196
5.16.6 emmkk-A/B (chromosomaler Locus).....	196
5.16.7 emmkk-A (Map).....	199
5.16.8 emmkk-B (Map).....	200
5.16.9 emmkk-A/B (Oligonucleotide).....	201
5.17 EmRaf.....	203
5.17.1 EmRaf: Material und Methoden.....	203

5.17.2 emraf (cDNA).....	205
5.17.3 EmRaf (Proteinsequenz) .....	206
5.17.4 emraf (chromosomaler Locus).....	206
5.17.5 emraf (MAP).....	208
5.17.6 emraf (Oligonucleotide).....	210
5.18 EmRal .....	213
5.18.1 EmRal: Material und Methoden.....	213
5.18.2 emral (cDNA).....	215
5.18.3 EmRal (Proteinsequenz).....	215
5.18.4 emral (chromosomaler Locus).....	216
5.18.5 emral (Map).....	217
5.18.6 emral (Oligonucleotide).....	218
5.19 EmRap1.....	219
5.19.1 EmRap1: Material und Methoden.....	219
5.19.2 emrap1 (cDNA).....	221
5.19.3 EmRap1 (Proteinsequenz).....	221
5.19.4 emrap1 (chromosomaler Locus).....	222
5.19.5 emrap1 (Map).....	223
5.19.6 emrap1 (Oligonucleotide).....	224
5.20 EmRap2.....	225
5.20.1 EmRap2: Material und Methoden.....	225
5.20.2 emrap2 (cDNA).....	227
5.20.3 EmRap2 (Proteinsequenz).....	227
5.20.4 emrap2 (chromosomaler Locus).....	228
5.20.5 EmRap2 (Oligonucleotide).....	228
5.20.6 emrap2 (Map).....	230
5.21 EmRas.....	231
5.21.1 EmRas: Material und Methoden.....	231
5.21.2 emras (cDNA).....	234
5.21.3 EmRas (Proteinsequenz).....	234
5.21.4 emras (chromosomaler Locus).....	234
5.21.5 emras (Map).....	235
5.21.6 emras (Oligonucleotide).....	236
5.22 Em1433-2.....	237
5.22.1 Em1433-2: Material und Methoden.....	237
5.22.2 em1433-2 (cDNA).....	238
5.22.3 Em1433-2 (Proteinsequenz).....	238
5.22.4 em1433-2 (chromosomaler Locus).....	239
5.22.5 em1433-2 (Oligonucleotide).....	239
5.22.6 em1433-2 (Map).....	240



<b>6 Literatur</b> .....	<b>241</b>
<b>7 Publikationen</b> .....	<b>258</b>
7.1 Originalarbeiten in Peer Review Journalen.....	258
7.2 Übersichtsartikel in Peer Review Journalen.....	258
7.3 Kongreßbeiträge.....	259

**Untersuchungen  
zur in vitro Kultivierung  
und  
Charakterisierung von  
MAP-Kinase-Kaskade-Komponenten  
des Fuchsbandwurmes  
*Echinococcus multilocularis***

---

# 1 Zusammenfassung

---

Es wird angenommen, dass die invasiven Stadien parasitärer Helminthen zur Organfindung und zur Weiterentwicklung auf die Sensierung spezifischer Wirts-Signale angewiesen sind, wobei die molekulare Natur dieser Signale bislang weitgehend ungeklärt ist. Vorangegangene Untersuchungen am Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis*, dem Erreger der alveolären Echinokokkose, hatten bereits ergeben, dass dessen Metacestoden-Larvenstadium zur Weiterentwicklung kleine, lösliche Wirtsmoleküle benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein axenisches (Wirtszell-freies) Kultursystem für das Metacestoden-Stadium entwickelt, mittels dessen sich diese Fragestellungen *in vitro* angehen lassen. Mit Hilfe dieses Kultursystems konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die drei Wirts-Hormone/Zytokine, Insulin, *epidermal growth factor* (EGF) und *bone morphogenic protein 2* (BMP2), einen Einfluss auf die Proliferation und die Differenzierung von *E. multilocularis* haben. Während für Insulin und EGF Wachstumsstimulierende Effekte gezeigt werden konnten, förderte BMP2 die Differenzierung des Metacestoden zum nächsten Larvenstadium, dem Protoscolex.

In Modellorganismen wie Säugern, *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* verlaufen die durch Insulin- und EGF-ähnlichen Zytokine induzierten Signalmechanismen über die sogenannte *mitogen activated protein* (MAP)-Kinase-Kaskade. Um zu untersuchen, ob die externe Zugabe von Wirts-Insulin bzw. -EGF in einer Stimulierung der MAPK-Kaskade des Parasiten führt, wurden in dieser Arbeit zunächst die Komponenten dieses Signalweges bei *E. multilocularis* auf molekular-genetischer und biochemischer Ebene charakterisiert. Die Arbeiten umfassten Studien zu kleinen GTPasen des Parasiten (EmRas, EmRap1, EmRap2, EmRal), zu einem Orthologen der Kinase Raf (EmRaf), sowie Orthologen der Kinasen MEK (EmMKK) und ERK (EmERK). Es konnte gezeigt werden, dass diese Faktoren in *E. multilocularis* Teil einer MAP-Kinase-Kaskade sind. Zudem wurde nachgewiesen, dass diese Faktoren stromabwärts eines EGF-Rezeptor-Orthologen (EmER) des Parasiten fungieren, welches ebenfalls in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde. Damit wurden die Voraussetzungen geschaffen, den Einfluss exogen zugegebenen Insulins bzw. EGFs auf die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade im Parasiten zu untersuchen. Erste Analysen zeigten bereits, dass die zentrale Komponente dieser Kaskade, EmERK, durch die genannten Wirts-Zytokine aktiviert wird. Dies legt nahe, dass Wirt-Parasit-Kommunikationsmechanismen über evolutionsgeschichtlich konservierte Signalsysteme eine wichtige Rolle im Infektionsgeschehen der alveolären Echinokokkose spielen.

Aufbauend auf dem axenischen Kultursystem ist es in dieser Arbeit auch erstmals gelungen, Primärzellkulturen für *E. multilocularis* anzulegen und die Parasitenzellen zur *in vitro* Neubildung von Metacestoden-Vesikeln anzuregen. Erste Experimente zur genetischen Manipulation dieser Primärzellen konnten erfolgreich durchgeführt werden. Aufbauend auf der hier vorgestellten Methodik sollte es in künftigen Untersuchungen möglich sein, stabil transfizierte *Echinococcus*-Zellen zu generieren und diese zur Herstellung vollständig transgener Parasiten-Stadien zu nutzen. Dies würde die zur Untersuchung der *E. multilocularis*-Entwicklung und der Wirt-Parasit-Interaktionsmechanismen bei einer Infektion zur Verfügung stehenden Methoden entscheidend erweitern und könnte u.a. zur weiteren biochemischen Analyse der in dieser Arbeit dargestellten Signalmechanismen des Parasiten herangezogen werden.

## 1.1 Summary

It is assumed that the invasive stages of parasitary helminths are reliant on the sensing of specific host signals for organ targeting and development. The molecular nature of these signals is still mostly unsettled. Previous studies on the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*, the causative organism of alveolar echinococcosis showed that the metacestode larval stage requires small, soluble host molecules to develop further. For the first time, in this study an axenic (without host cells) culture system for the metacestode stage was developed which allows to address these questions *in vitro*. Using this culture system it could be shown that the three host hormones/zytokines, insulin, *epidermal growth factor* (EGF) and *bone morphogeneic protein 2* (BMP2) have influence on proliferation and differentiation of *E. multilocularis*. While insulin and EGF had growth-stimulating effects, BMP2 results in metacestode differentiation to the next larval stage, the protoscolex.

In model organisms such as mammals, *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* the signals induced by insulin and EGF-related zytokines are transferred by the so-called *mitogen activated protein* (MAP) kinase cascade. In order to determine whether external addition of host insulin or host EGF leads to a stimulation of the MAPK cascade of the parasite, initially the components of the signal path of *E. multilocularis* were characterized on the molecular genetic and biochemical level. The research comprised studies on small GTPases of the parasite (EmRas, EmRap1, EmRap2, EmRal) and an orthologue of the Raf Kinase (EmRaf) as well as orthologues of the MEK kinase (EmMKK) and ERK kinase (EmERK). It could be shown that the mentioned factors are part of a MAP kinase cascade in *E. multilocularis*. Furthermore it could be demonstrated that these factors act downstream of an EGF-receptor orthologue (EmER) of the parasite, which was also analysed in this study. Thereby a base was provided to investigate the influence of exogenic added insulin or EGF on the activation of the MAP kinase cascade in the parasite. First analyses showed that the mentioned host cytokines activate EmERK, the central component of this cascade. This suggests that host-parasite communication via evolutionary conserved signal systems play an important role in the infection scenario of the alveolar echinococcosis.

Based on the axenic culture system, for the first time primary cells for *E. multilocularis* could be cultured and *in vitro* regeneration of metacestode vesicles could be excited in the parasite cells. First experiments on genetic manipulation on the primary cells were effected successfully. On this basis it should be possible to generate stable transfected *Echinococcus* cells and use these to generate completely transgenic parasite stages in future studies. This would be a critical extension of the set of methods available for research of the development of *E. multilocularis* and the host-parasite interaction mechanisms in an infection and could be drawn on for further biochemical analyses of the signal mechanisms of the parasites presented in this study.

## 2 Einleitung

### 2.1 Der kleine Fuchsbandwurm: *Echinococcus multilocularis*

#### 2.1.1 Phylogenie, Verbreitung und allgemeine Biologie der Echinokokken

Der kleine Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* ist ein endoparasitisch lebender Vertreter der Bandwürmer (Cestoden), der in der nördlichen Hemisphäre weit verbreitet und Auslöser der humanen alveolären Echinokokkose, einer sehr schweren, häufig zum Tod führenden Parasitose ist.

Der letzte gemeinsame Vorfahre aller heute lebenden Bilateria lebte vor über 600 Millionen Jahren (Abbildung:1). Zu dieser Zeit spaltete sich das Tierreich in die Gruppe der Deuterostomier (Neumünder), die auch uns Menschen mit einschließt, und die Gruppe der Protostomier (Urmünder), auf. Die Protostomier wiederum bilden die zwei großen Tiergruppen der Lophotrochozoen und der Ecdysozoen. Im Verwandtschaftsverhältnis stehen die Lophotrochozoen zwischen den Deuterostomiern und den Ecdysozoen und setzen sich unter anderem aus den Tierstämmen der Plathelminthes (Plattwürmer), Mollusken (Weichtiere, z.B. Schnecken) und Anneliden (Ringelwürmer) zusammen, während zu den Ecdysozoen zum Beispiel die Tierstämme der Nematoden (Fadenwürmer) und Arthropoden (Gliederfüßer, z.B. Insekten) gezählt werden.

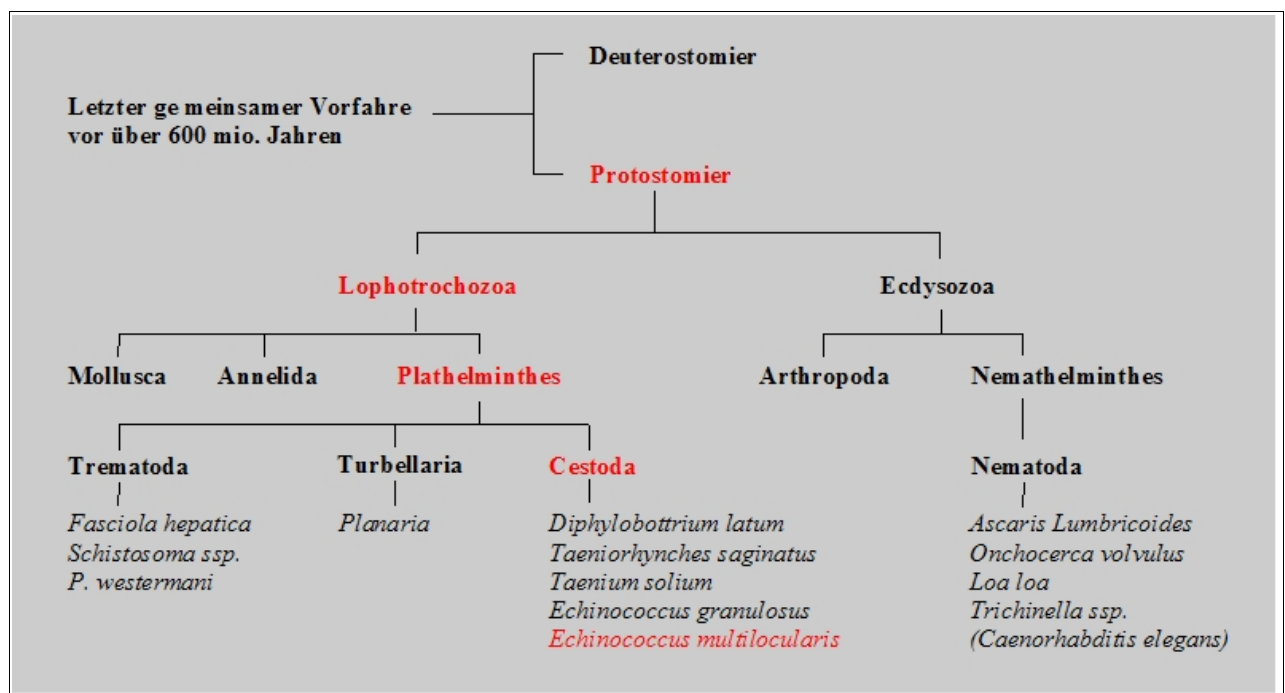


Abb. 1: Stammbaum parasitärer Helminthen

Gezeigt sind parasitäre Helminthen (Ausnahme: *C. elegans* ist apathogen) verschiedener Tiergruppen. Rot markiert sind von oben nach unten die Stammgruppe, der Überstamm, der Stamm, und die Klasse des Fuchsbandwurmes *E. multilocularis*.

Alle parasitär lebenden Wurmarten werden als Helminthen bezeichnet, rekrutieren sich aber aus den zwei verschiedenen Tierstämmen der Plathelminthes (Plattwürmer) und Nemathelminthes (Schlauchwürmer). Wichtige Vertreter der Nemathelminthes sind der, auch den Menschen befallende, Schweinespulwurm (*Ascaris lumbricoides*) und der apathogene, aber für die Wissenschaft enorm bedeutungsvolle Bodenbewohner *Caenorhabditis elegans*. Der Stamm der Plathelminthes wird unter anderem aus den drei Klassen der Trematoden (Saugwürmer) mit den Schisto-

somen als humanpathogen wichtigsten Vertretern, den apathogenen Turbellarien (Strudelwürmer) und den Cestoden (Bandwürmer) gebildet. Der Fuchsbandwurm *E. multilocularis* gehört phylogenetisch wie die vier weiteren bekannten Echinokokkenarten *E. granulosus* (Hundebandwurm), *E. oligarthus*, *E. vogeli* und *E. shiquicus* dem Stamm der Plathelminthes (Plattwürmer), der Klasse der Cestoda (Bandwürmer) und der Unterklasse der Eucestoda (echte Bandwürmer) an, in der sie gemeinsam mit weiteren Vertretern wie zum Beispiel dem Rinderbandwurm *Taenia saginata* und dem Schweinebandwurm *Taenia solium* die Familie der Taeniidae bilden (Abbildung:1).

Allen Bandwürmern ist gemein, dass sie in ihrer Entwicklung bis zum Adultstadium einen komplizierten, mit Wirtswechseln verbundenen, Lebenszyklus durchlaufen. Dies ist auch ein Grund dafür, dass die einzelnen Echinokokkenarten verschiedene Verbreitungsgebiete haben. Die Unterscheidung der jeweiligen Spezies erfolgt aufgrund bestimmter Charakteristika im Hinblick auf ihr Adult- und Larvenstadium, ihre End- und Zwischenwirte sowie der Morphologie und Lokalisation ihrer Larven im Zwischenwirt [313, 185]. Im tibetischen Hochland wurde erst vor kurzem *E. shiquicus* identifiziert [340]. *E. oligarthus* und *E. vogeli* treten ausschließlich in Süd- und Mittelamerika auf, wo sie sich in Wildtierzyklen vermehren. Sie sind die Erreger der polycystischen Echinokokkose und von humanmedizinisch geringer Bedeutung [87]. Von relevanter medizinischer und auch ökonomischer Bedeutung sind dagegen *E. multilocularis* und *E. granulosus* aufgrund ihrer weiten geographischen Verbreitung und der Schwere der von ihnen verursachten Infektionen. Das Adultstadium des Hundebandwurms *E. granulosus* parasitiert im Darm von Hunden und infiziert mit seinen Larven, die die cystische Echinokokkose hervorrufen, vor allem pflanzenfressende Paarhufer wie Rinder, Schafe, Ziegen, Schweine und Kamele, aber auch Menschen [207]. Die Unterscheidung der einzelnen Unterarten des Hundebandwurms richtet sich nach dessen jeweiligem Zwischenwirt. Das Hauptverbreitungsgebiet des Fuchsbandwurmes steht in direktem Zusammenhang mit dessen Endwirten, hauptsächlich Rot- und Polarfüchsen, aber auch Marderhunden und beschränkt sich damit auf die nördliche Hemisphäre [87, 350]. In Europa ist *E. multilocularis* in nahezu allen mitteleuropäischen Ländern nachgewiesen worden. Hochendemisch zeigen sich Gebiete in der Schweiz, Österreich, Ostfrankreich sowie Süddeutschland, wo vor allem auf der Schwäbischen Alb und in Oberbayern Befallsraten der Füchse von über 50% auftreten [172]. Seine Larven infizieren vorrangig kleine Nager, die eine natürliche Beute kleinerer Caniden darstellen, gelegentlich aber auch Menschen. Das von ihnen ausgelöste Krankheitsbild ist die alveoläre Echinokokkose [87, 207].

Die Abbildung 7 zeigt schematisch den komplexen Lebenszyklus des Fuchsbandwurmes. Die adulten zwitterigen Bandwürmer haben eine Länge von etwa 5 mm und leben im Dünndarm ihrer Endwirte, meistens Füchsen, aber auch Marderhunden und gewöhnlichen Haushunden (gelegentlich auch Katzen, in welchen sie allerdings nur selten die Geschlechtsreife erreichen). Morphologisch wird das Adultstadium in drei Abschnitte gegliedert: den Kopfteil (Scolex) an dem vier Saugnäpfen sowie ein doppelter Hakenkranz für die Verankerung in der Darmwand des Wirts lokalisiert sind, eine Proliferationszone in der die Neubildung von Bandwurmgliedern (Proglottiden) erfolgt und einer Gliederkette (Strobila), die charakteristischerweise aus 3-5 abgeflachten Gliedern besteht. In der endständigen (graviden) Proglottide bilden sich nach einer Selbstbesamung befruchtete Eier, die das mehrzellige, bewegliche und mit 6 Haken ausgestattete 1. Larvenstadium des Parasiten, die Oncosphäre (Sechshakenlarve), enthalten [92, 128]. Über den Kot des Endwirts werden die infektiösen Eier, die in feuchter Umgebung und bei niedrigen Temperaturen über ein Jahr überleben können [77, 87], in die Umwelt ausgeschieden, wo sie von kleinen Nagern, die als Zwischenwirt dienen, oral mit der Nahrung aufgenommen werden. [312]. Während der Magenpassage löst sich die Eihülle, worauf die Oncosphäre im alkalischen Milieu des Darmes schlüpft, das Darmepithel penetriert und in einem bislang ungeklärten Vorgang über das Blut- und Lymphsystem zum Zielorgan gelangt, das in 95% aller Fälle die Leber ist [172]. Dort entwickelt sich die Oncosphäre zum 2. Larvenstadium, dem Metacestoden (Finne), morphologisch einem flüssigkeitsge-

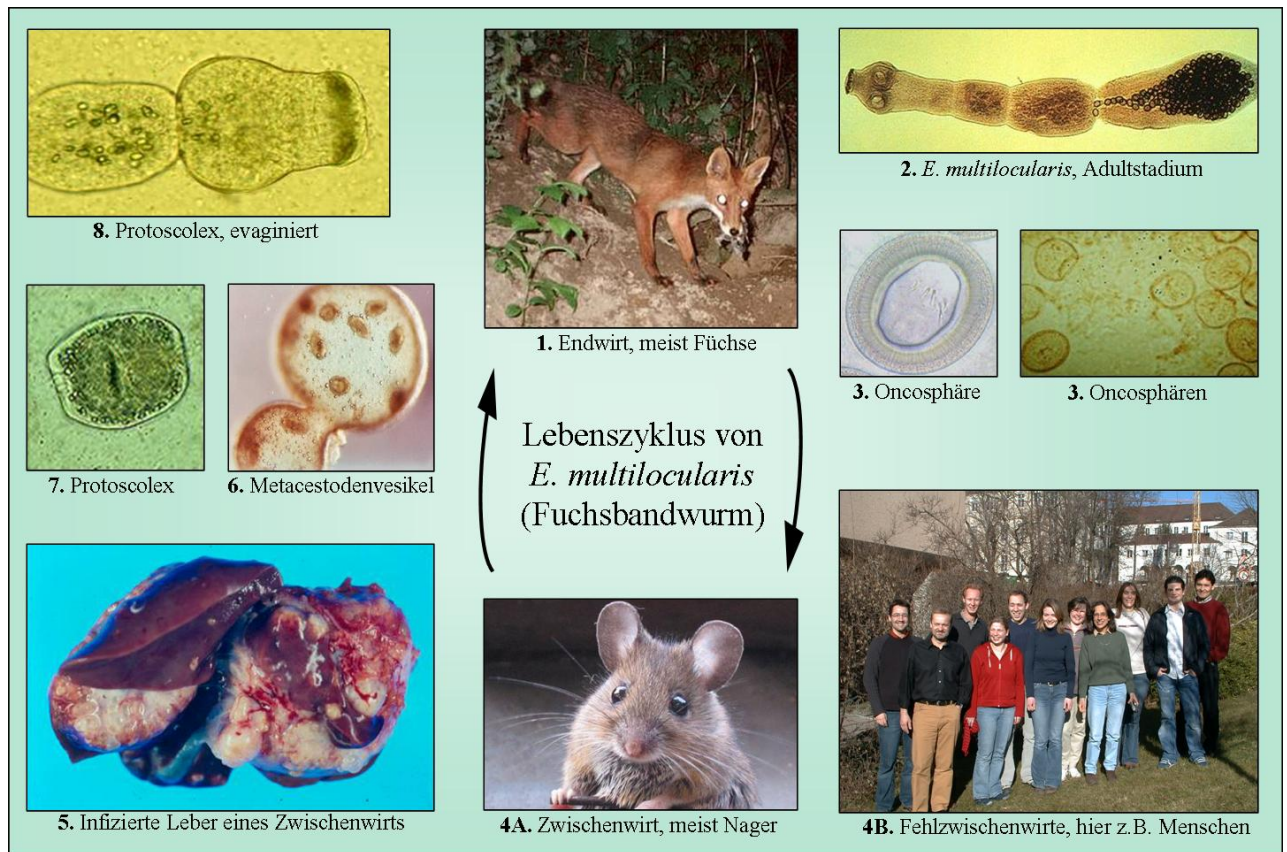


Abb. 2: Lebenszyklus des Fuchsbandwurmes *Echinococcus multilocularis*.

Im Darm des Endwirts, meist Füchsen (1) parasitieren die adulten Würmer, in deren endständiger Proglottide infektiöse Eier heranreifen (2). Diese Eier werden Oncosphären genannt und enthalte das mehrzellige, mit sechs Haken ausgestattete erste Larvenstadium des Fuchsbandwurmes (3). Im natürlichen Lebenszyklus werden die Oncosphären von kleinen Nagern, die als Zwischenwirt fungieren (4A) oral aufgenommen. Im Darm des Zwischenwirts penetrieren sie das Darmpithel und gelangen über das Blut- und Lymphsystem zum Zielorgan, das in 95% der Fälle die Leber ist. Dort entwickeln sie sich zum zweiten Larvenstadium, dem Metacestoden, einem multivesikulärem schwammartigen Gewebe, das einem malignen Tumor gleich infiltrativ in das umliegende Wirtsgewebe wächst (5). Das durch das Metacestodenstadium von *E. multilocularis* ausgelöste Krankheitsbild ist die alveoläre Echinokokkose. Das Metacestodengewebe besteht zu einem Großteil aus kleinen flüssigkeitsgefüllten Metacestodenvesikeln, in welchen Protoscolices heranreifen (6). der Protoscolex ist das dritte Larvenstadium des Fuchsbandwurmes und liegt im Zwischenwirt invaginiert vor (7). Wenn der infizierte Zwischenwirt von einem Fuchs gerissen wird, überleben die Protoscolices, evaginieren (8) und setzen sich dann im Darm des Fuchses fest, wo sie innerhalb von 6 Wochen zu adulten Würmern heranwachsen (2). Menschen infizieren sich selten mit dem Fuchsbandwurm. Da sie im natürlichen Lebenszyklus des Fuchsbandwurmes nicht vorkommen (Füchse fressen keine Menschen) sind sie Fehlzwisehwirte (4B).

füllten Bläschen (hydatide Zyste), das aus einer inneren zellulären Germinalschicht und einer äußeren azellulären Laminatschicht besteht. Die Laminatschicht, die aus Proteinen und Polysacchariden besteht verleiht dem Metacestoden strukturelle Festigkeit und ist am Schutz des Parasiten vor dem Immunsystem des Wirts beteiligt [92, 128]. Das Metacestodenstadium vermehrt sich durch asexuelle Sprossung, wobei ausgehend von der inneren Germinalschicht Tochterzysten nach außen abgegeben werden. Mit fortschreitendem Wachstum bildet sich so ein multivesikuläres, schwammartiges Gewebe, das einem malignen Tumor gleich infiltrativ in das umliegende Wirtsgewebe wächst [312, 207]. In den Metacestodenvesikeln bilden sich ausgehend von der Germinalschicht nach wenigen Monaten Brutkapseln, die sich zum 3. Larvenstadium des Fuchsbandwurms, dem Protoscolex, ausdifferenzieren. Der Protoscolex ist eine Vorform des Adultstadiums und morphologisch ein Scolex mit 4 Saugnäpfen und zwei Hakenkränzen jedoch ohne Proliferationszone. Im Metacestoden sind die Protoscolices eingestülpt (invaginiert) und von einer Membran umgeben an den Innenwänden der Vesikel lokalisiert. Die starke Expansion des Parasiten führt nach und nach zum Funktionsverlust des infizierten Organs und dadurch zu einer Schwächung des Zwischenwirts, der jetzt eine leichte Beute für den Fuchs wird. Wenn der Zwischenwirt durch einen Fuchs gerissen wird, überleben die Protoscolices die Magenpassage, evaginieren und gelangen im Dünndarm in ein geeignetes Milieu, wo sie sich innerhalb von 20 - 35 Tagen zum Adultwurm

entwickeln und so den Lebenszyklus schließen [312, 207, 284]. Wie die Metamorphose der einzelnen Larvenstadien induziert wird und welche Faktoren bei der Entwicklung eine Rolle spielen konnte bisher noch nicht geklärt werden. Durch die Aufnahme infektiöser Eier kann auch der Mensch an die Stelle der natürlichen Zwischenwirte treten, er stellt für den Fuchsbandwurm jedoch einen Fehlwirt dar. Auch in diesem Fall entwickelt sich das Metacestodenstadium in der Leber mit dem Krankheitsbild der alveolären Echinokokkose, interessanterweise bleibt aber bis auf Ausnahmen die Differenzierung zum Protoscolex aus, die bei Hundebandwurminfektionen beobachtet werden kann [284,125].

### 2.1.2 Die alveoläre Echinokokkose

**Infektion:** Die Infektion mit der alveolären Echinokokkose (AE) erfolgt über die orale Aufnahme infektiöser Eier des Fuchsbandwurmes und ist daher auf Gebiete mit infizierten Füchsen oder anderen Endwirten beschränkt. Ein erhöhtes Infektionsrisiko besteht für Menschen, die mit diesen infizierten Endwirten direkt in Kontakt geraten, als Beispiel seien hier Jäger genannt. Für den Nichtjäger stellen Hunde oder andere mäusefressende Haustiere ein Infektionsrisiko dar, da der Parasit über diesen Weg ins Haus gelangen und dann über den Kot übertragen werden kann. Während ein erhöhtes Risiko durch die orale Aufnahme von ungewaschenem oder ungekochtem Gemüse, Obst, Salat, von Beeren, Kräutern und Pilzen nicht nachgewiesen werden konnte und die Aufnahme der infizierten Eier über Trinkwasser noch diskutiert wird [172], scheint eine Korrelation zwischen dem Auftreten der AE und ländlichen Gebieten zu bestehen, mit der Folge, dass die Nähe zu infizierten Tieren sowie kontaminierten Pflanzen und Böden ein erhöhtes Infektionsrisiko darzustellen scheint [87]. Die Inzidenz der alveolären Echinokokkose steht im Zusammenhang mit der Zahl der befallenen Füchse [126] und beträgt in den Endemiegebieten 0,14 bis 0,7 Infektionen pro 100000 Einwohner und Jahr [333]. Interessanterweise sind 90% aller Menschen genetisch bedingt resistent gegen eine Infektion mit dem Fuchsbandwurm [127].

**Krankheitsbild:** Nach der Infektion eines Menschen verhält sich *E. multilocularis* wie im natürlichen Zwischenwirt. Durch das, vom Immunsystem des Wirts nicht zu kontrollierende, Wachstum des Metacestoden manifestiert sich das Krankheitsbild der alveolären Echinokokkose, der gefährlichsten Parasitose der nördlichen Hemisphäre [255]. Ausgehend von einem Vesikel mit wenigen Millimetern Größe wächst das Metacestodenstadium des Parasiten, bevorzugt in der Leber bis zu einem Durchmesser von 15 - 20 cm heran und verursacht durch die starke Raumforderung und das infiltrative Wuchern in der Leber und dem umliegenden Gewebe einen allmählich eintretenden Funktionsverlust der Organe [87]. Die Läsionen werden in einigen Fällen nekrotisch oder kalzifizieren und im späten Stadium der Krankheit können sich metastatische Absiedlungen in Lunge, Knochen und Gehirn bilden [210, 128]. Die Symptome der alveolären Echinokokkose gleichen einem in der Leber wachsenden Tumor (Leberneoplastie): mit Lebervergrößerung (Hepatomegalie), Gallenstau (Cholestase), Oberbauchschmerzen, Gelbsucht, Anämie, Gewichtsverlust und manchmal auch Fieber [210].

**Diagnostik:** Der Infektionsweg kann aufgrund des langsamen Wachstums des Parasiten bei der Diagnosestellung oft nicht mehr zurückverfolgt werden, da zwischen der Infektion und dem Auftreten der ersten Symptome 10 - 15 Jahre vergehen können [324]. Die zur Verfügung stehenden diagnostischen Mittel sind neben anamnestischen und klinischen Untersuchungen bildgebende und serologische Verfahren [136, 70], der Nachweis über PCR ist zwar beschrieben [87] aber von untergeordneter Bedeutung [48]. Als Screeningmethode wird dabei die Sonographie verwendet, Computertomographie und Kernspinnresonanztomographie bestätigen die Diagnose [136, 70]. Da im Routinelabor keine spezifischen Veränderungen nachweisbar sind [55], stützt sich die serologische Diagnostik neben Immunfluoreszenstests (IFT) und indirekter Hämagglutination (IHA) hauptsächlich auf antigenspezifische ELISA-Tests, mit deren Hilfe eine Infektion in cystische und



alveoläre Echinokokkose differenziert und sogar schon wenige Monate nach der Ansteckung nachgewiesen werden kann [172, 128]. Als Antigene werden dafür neben Gesamtlarvenprotein und Hydatidenflüssigkeit rekombinant exprimierte *E. multilocularis*-Antigene wie Em2 [128], EM10 [110], EM13 [109], EM16 und EM18 [162] verwendet, mit welchen die Differentialdiagnostik möglich ist.

**Therapie:** Eine Heilung ist nur durch eine Radikaloperation mit einer vollständigen Entfernung des gesamten Parasitengewebes möglich, aber nur in 20 - 30% der Fälle durchführbar. Auch Teilresektionen [12] oder Lebertransplantationen haben sich nicht bewährt [48]. Die momentan bei der Behandlung der alveolären Echinokokkose eingesetzten Chemotherapeutika mit parasitostatischer Wirkung können das Parasitenwachstum nur einschränken, ihn aber nicht abtöten und müssen daher lebenslang eingenommen werden. Verwendet werden für gewöhnlich antihelminthisch wirkende Benzimidazole, wie Mebendazol und Albendazol [14], die an helminthenspezifische Regionen in  $\beta$ -Tubulinen binden [168, 48]. Im Zusammenhang mit der alveolären Echinokokkose ist die parasitostatische Wirkung auch für Amphotericin-B, einem Antimykotikum, beschrieben [258] und im Tierversuch konnte die stark parasitozide Wirkung von Nitazoxanid in Verbindung mit Albendazol nachgewiesen werden [301]. Unbehandelt führt die alveoläre Echinokokkose in 90% aller Fälle innerhalb von 10 Jahren nach Auftreten der ersten Symptome zum Tod [276, 15]. Durch intensive Betreuung und Chemotherapie kann die 10-Jahresüberlebensrate der Erkrankten aber von 10% auf 90% gesteigert werden [15].

## 2.2 *Echinococcus multilocularis* im Labor

**Kultivierung von *E. multilocularis*:** Für die Arbeit im Labor ist es äußerst wichtig, dass der zu untersuchende Organismus leicht zugänglich und einfach zu handhaben ist, was für *E. multilocularis* zutrifft, da man ihn unter Laborbedingungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* kultivieren kann. Obwohl der natürliche Lebenszyklus, Fuchs - Zwischenwirt - Fuchs, vermutlich nachgestellt werden könnte, werden aus verschiedenen Gründen, wie zum Beispiel der hohen Ansteckungsgefahr durch die infektiösen Eier oder der Schwierigkeit Füchse zu halten, im Labor meistens nur die Protoscolices und das Metacestodenstadium verwendet.

Für die *in vivo* Kultivierung des Metacestodenstadiums von *E. multilocularis* wird Metacestodengewebe aus einem infizierten Zwischenwirt (Gerbil) operativ entfernt, zerkleinert und in die Bauchhöhlen uninfizierter Rennmäuse injiziert, wo es innerhalb weniger Monate zu großen Geweblöcken heranwächst, die ein Drittel des Gewichtes eines Gerbils ausmachen können. Durch wiederholtes Passagieren kann so ein bestimmtes Echinokokken-Isolat über viele Jahre lebend erhalten werden. Ausgehend von diesen *in vivo* Kulturen oder auch frischen Isolaten konnten verschiedene *in vitro* Kultursysteme entwickelt werden, in welchen in serumhaltigem Medium entweder kleine, Metacestodenvesikel-abschnürende Geweblöcke [145] kultiviert werden oder zerkleinertes Metacestodengewebe in Co-Kultur mit Hepatocyten zwischen zwei Lagen aus Kollagen wächst [169]. Beide Methoden haben neben der geringen Ausbeute an Metacestodenvesikeln den Nachteil, dass sie mit Wirtszellen oder Hepatocyten versetzt sind, die für das Wachstum der Echinokokken-Kulturen essentielle Wachstumsfaktoren ins Medium abgeben [169]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Weglassen der Kollagenschichten die Co-Kultivierung von Metacestodenvesikeln mit Hepatocyten in ihrer Handhabung stark vereinfacht und die Ausbeute extrem gesteigert werden [355, 296]. Ausgehend von diesen modifizierten Kulturen konnte ein axenisches Kultursystem entwickelt werden, das die Kultivierung der Metacestodenvesikel in Hepatocyten-konditioniertem Medium, in Abwesenheit von Hepatozyten ermöglicht [296]. Aus diesen axenischen Metacestodenvesikeln wiederum können primäre Echinokokkenzellen isoliert werden, die über viele Wochen überleben, gewebeartige Strukturen bilden und sich zu neuen Metacestodenvesikeln differenzieren [diese Arbeit].

Während der Kultivierung von Metacestodeneskizeln proliferieren und differenzieren diese, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Es bilden sich Protoscolices, die unter geeigneten Kulturbedingungen *in vitro* bis zum Adultstadium mit mehreren Proglottiden heranwachsen, jedoch keine Oncosphären ausbilden [diese Arbeit]. Gibt man jedoch natürlichen immunsupprimierten Zwischenwirten diese Adultstadien zu fressen, so dass sie einmal den Darm passieren bilden sich in deren Endproglottiden Oncosphären [314, 76]. Für Oncosphären ist zudem beschrieben, dass sie *in vitro* zum Metacestoden heranreifen können [129]. Prinzipiell scheint es daher möglich zu sein, den gesamten Lebenszyklus des Fuchsbandwurmes, bis auf die, nach dem heutigen Stand der Forschung nötige Darmpassage der Adultstadien, auch *in vitro* nachzustellen.

Alle Methoden, den Fuchsbandwurm *in vitro* zu kultivieren, bieten die Möglichkeit das Wachstum und die Differenzierung unter definierten Bedingungen zu beobachten und zu manipulieren, sowie sehr einfach zu beliebigen Zeitpunkten Proben für weitreichende molekulargenetische und molekularbiochemische Versuche zu entnehmen.

**Biochemie und Molekulargenetik:** Bis Anfang der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts war wenig über die Biochemie und Genetik des Parasiten bekannt. Frühe Studien befassten sich mit der Zusammensetzung der Hydatidenflüssigkeit [271] und der Isolierung von Antigenen aus cDNA-Bibliotheken, die für die Serodiagnostik der alveolären Echinokokkose eingesetzt werden konnten, wie Em2 (1995 [128]), EM10 (1991 [110]), EM13 (1993 [109]), EM16 und EM18 (1995 [162]). Zu diesem Zeitpunkt beschränkten sich die molekularbiologischen Aspekte auf Diagnose und Pathogenität, während von der genomischen Organisation und der Expression der Gene nichts bekannt war.

1999 konnte dann von Brehm et al. [45] mit dem Locus des *E. multilocularis*-Antigens *em10*, einem Ezrin-Radexin-Moesin (ERM)-like Protein, kurz *elp* [110], das erste Echinokokken-Gen charakterisiert werden [45]. Für das Protein Elp konnte dann über biochemische Untersuchungen dessen Interaktionspartner PDZ-1 identifiziert werden [158]. Ein wichtiger Schritt in der molekulargenetischen Charakterisierung des Fuchsbandwurmes war der 2000 von Brehm et al. erbrachte Nachweis des Mechanismus des Trans-Spleißens bei *E. multilocularis*, *E. granulosus* [44] und später bei *T. solium* [43]. Damit konnte das ursprünglich bei Trypanosomen entdeckte [304] und für Nematoden wie *C. elegans* [29] und Trematoden wie *S. mansoni* [252] nachgewiesene Trans-Spleißen auch für Cestoden mit ihrem Vertreter *E. multilocularis* beschrieben werden [44]. Beim Trans-Spleißen werden im Gegensatz zum konventionellen Spleißen nicht die Fragmente einer prä-mRNA miteinander verknüpft, sondern ein kleines, aus einer nicht-polyadenylierten snRNA stammendes Mini-Exon, der so genannte Spliced-Leader (SL), an das 5'-Ende einer prä-mRNA fusioniert [35]. Je nach Organismus gibt es einen oder mehrere Spliced-Leader und da häufig beide Arten des Spleißens für die Genexpression parallel genutzt werden, unterscheidet sich auch der prozentuale Anteil an transgespleißten Transkripten [35, 225, 27, 44]. Bei *E. multilocularis* besteht der einzig bisher nachgewiesene Spliced-Leader aus 36 Basen, hat ein 2,2,7-Trimethylguanosin-Cap und ist an etwa 30% aller mRNAs zu finden [44]. Obwohl die Funktion des Trans-Spleißens weitgehend unbekannt ist [27, 44], lässt sich das Phänomen des Trans-Spleißens für molekularbiologische Untersuchungen ausnutzen. Da jede mRNA, die einen Spliced-Leader trägt, mit diesem ein definiertes 5'-Ende besitzt und der Spliced-Leader immer vor der proteincodierenden Sequenz lokalisiert ist, lassen sich qualitativ sehr hochwertige SL-cDNA-Bibliotheken herstellen [103], die sich im Vergleich zu cDNA-Bibliotheken, die über andere Methoden hergestellt wurden, durch einen überdurchschnittlich hohen Anteil an vollständigen Transkripten auszeichnet. Eine weitere Möglichkeit ist das SL-Differential-Display, mit dem die einzelnen Entwicklungsstadien der Infektion oder auf verschiedene Arten stimulierte *in vitro* Kulturen von *E. multilocularis* über das Expressionsmuster der SL-Faktoren studiert werden kann [47].

**Fazit:** Die molekularbiologische Forschung an *E. multilocularis* ist noch sehr jung und viele Erkenntnisse sind wissenschaftlich gesehen nicht neu sondern bestätigen nur Bekanntes. Mit der Vielzahl an Faktoren, die neben einer gezielten Suche durch systematisches Screenen von cDNA-

Bibliotheken neu identifiziert werden konnten, und der Entwicklung der *in vitro* Kultursysteme, die den Parasiten leicht zugänglich und manipulierbar machen, öffnet sich jetzt aber ein weiterer Raum neuer Möglichkeiten, die zum Beispiel Einblicke in die Interaktion zwischen Wirt und Parasit erlauben.

## 2.3 Wirt-Parasit-Interaktion

Für einen, von einem Parasiten befallenen Organismus ist es sinnvoll, den Eindringling zu erkennen und zu eliminieren, während es für diesen überlebensnotwendig ist, nicht nur unerkannt zu bleiben, sondern auch seine Umgebung sensieren zu können, vor allem dann, wenn davon wie bei *E. multilocularis*, die eigene Entwicklung abhängt. Seinem Lebenszyklus folgend nistet sich die Oncosphäre in über 95% aller Fälle in der Leber eines Zwischenwirts ein und differenziert sich dort zum Metacestoden. Warum geschieht das hauptsächlich in der Leber und wann und wodurch wird anschließend die Bildung von Brutkapseln eingeleitet? Fest steht: Es muss zu einem Zeitpunkt erfolgen, an dem der Zwischenwirt noch kräftig genug ist, deren Ausdifferenzierung zu Protoscolices zu überleben, um schließlich vom Fuchs gefressen zu werden, in dessen Dünndarm sich die Protoscolices dann zu adulten Würmern entwickeln. Warum aber erfolgt dieser letzte Schritt nicht im Darm eines Greifvogels, der einen infizierten Zwischenwirt reißt, oder warum bilden sich Protoscolices fast ausschließlich in natürlichen Zwischenwirten und nicht in infizierten Menschen?

Für diese und viele weitere Fragen konnten bisher noch keine Antworten gefunden werden, die Beobachtungen setzen aber spezifische Kommunikationssysteme voraus, die es zumindest dem Parasit erlauben, Signale des Wirts zu erkennen und auch darauf zu reagieren. Um eine Vorstellung der Kommunikationsmöglichkeiten zu bekommen, muss hier zuerst auf die Signal-Systeme mehrzelliger Organismen eingegangen werden. Im Gegensatz zu Protozoen und anderen Einzellern, die Signale und Einflüsse aus der Umwelt innerhalb einer Zelle umsetzen und auf zelluläre Anforderungen schnell reagieren können, müssen mehrzellige Organismen für eine effiziente Informationsweiterleitung interzellulär kommunizieren können. Metazoen bedienen sich somit nicht nur einfacher Ionen und Zellmetabolite als Signalstoffe, sondern entwickelten im Laufe der Evolution komplexe Zell-Zell-Kommunikationssysteme, die eine Kommunikation über weite Distanzen mit Hilfe von Hormonen erlaubt. Hormone sind Botenstoffe, die in endokrinen Zellen an einer Stelle im Organismus produziert werden und dann an einer anderen Stelle wirken, wo sie durch spezifische Rezeptoren erkannt werden. Peptidhormone, wie Insulin und der Epidermal-Growth-Faktor (EGF), werden von membranständigen Rezeptoren gebunden und das Signal dann über Signalkaskaden an den Zielort in der Zelle weitergeleitet, während zum Beispiel Steroidhormone, wie Testosteron, erst im Zytoplasma auf ihren spezifischen Rezeptor treffen. Da die meisten Hormonsysteme evolutionär betrachtet sehr alt sind, sind sie im gesamten Tierreich weit verbreitet und hoch konserviert. Ein Beispiel: Humanes Insulin kann den Insulinrezeptor einer Drosophila-Fliege stimulieren [102]. Für die Fliege ist diese Interaktion belanglos, da sie in der freien Natur normalerweise niemals mit dem Insulin eines Menschen in Kontakt gerät, während eine gleiche Interaktion für den Fuchsbandwurm von großer Bedeutung sein kann, denn der Metacestode, das zweite Larvenstadium von *E. multilocularis*, wächst in der Leber des Zwischenwirts und ist damit in unmittelbarem Kontakt zum endokrinen System des Wirts.

Neben den *in vivo* Beobachtungen, die eine Kommunikation zwischen den Spezies fordern, konnten signifikante Einflüsse des Wirts auf das Wachstum und die Differenzierung von *E. multilocularis* auch über *in vitro* Kulturstudien bestätigt werden: So reifen Protoscolices in Gegenwart von humanen Fibroblasten (Hep2) zu sterilen Adultstadien heran, während sie sich in Gegenwart von Ratten-Hepatocyten (RH-) zu hydatiden Zysten des Metacestodenstadiums zurück entwickeln [eigene Beobachtung]. Außerdem wurde gezeigt, dass sowohl die Entwicklung der Oncosphäre zum Metacestoden [125], als auch die asexuelle Proliferation des Metacestoden in den Zielorganen [169, 144] stark von löslichen Wachstumsfaktoren mit einem niedrigen Molekulargewicht abhängt

(unter 15 kDa), die von Säugerhepatocyten sezerniert werden [169]. Diese Eigenschaft trifft unter anderem auf Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF $\alpha$  aus der Epidermal-Growth-Factor (EGF) - Familie und TGF $\beta$ , Activin und BMP (bone morphogenetic protein) aus der Transforming-Growth-Factor (TGF) - Familie zu. Genau diese Faktoren, deren Expression auch bei *in vitro* kultivierten Hepatocyten über RT-PCR nachgewiesen werden konnte [K. Brehm, pers. Mitteilung], werden nach einer Schädigung der Leber während deren Regeneration vermehrt sezerniert und zeigen einen deutlichen Einfluss auf das Leberwachstum [100].

Eine genaue Beschreibung der für das Wachstum und die Entwicklung des Fuchsbandwurmes relevanten Wachstumsfaktoren gestaltet sich in einem heterologen Zellkultursystem, in dem Echinokokken gemeinsam mit Hepatocyten in kälberserumhaltigem Medium wachsen, schwierig. Zusätzlich war für den molekulargenetisch wenig charakterisierten Fuchsbandwurm nicht bekannt, ob und welche der in Frage kommenden Signaltransduktionssysteme ortholog vorhanden sind. Deshalb wurde in den letzten Jahren intensiv und erfolgreich nach Faktoren dieser Systeme gesucht. So gelang neben der Isolation von zwei Echinokokken-spezifischen löslichen Wachstumsfaktoren, einem EGF-Homologen das in Gegenwart von Hepatocyten verstärkt exprimiert wird [47] und einem BMP-Homologen das, entdeckt in einer cDNA-Bibliothek von *E. granulosus* [103], auch in *E. multilocularis* nachgewiesen werden konnte, die Charakterisierung einer Reihe von Rezeptoren und Proteinfaktoren, die an den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen beteiligt und teilweise schon publiziert sind. Dazu gehört eine Reihe von Steroidhormon-assoziierte Rezeptoren und einige assoziierte Cofaktoren, wie zum Beispiel EmSkip [119], die eine Rolle bei der Beobachtung spielen könnten, dass Metacestodenvesikel in der *in vitro* Kultur nach Zugabe von weiblichem Rinderserum besser wachsen als nach Zugabe von männlichem [Dirk Günthel pers. Mitteilung]. Weiterhin konnten vier verschiedene Serin/Threonin-Rezeptorkinasen der TGF $\beta$ -Familie [356] und aus deren intrazellulärer Signalkaskade verschiedene SMAD-Proteine [355] und ein Tak-Homolog identifiziert werden. Aus dem Bereich der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist für *E. multilocularis* ein EGF-Rezeptor [295], sowie ein Insulin/IGF-Rezeptor beschrieben. Dieser liefert einen ersten Hinweis zur Wirt-Parasit-Interaktion auf molekularer Ebene, da er *in vitro* mit humanem Insulin reagiert [179]. In der Wachstumsfaktor-vermittelten Signaltransduktion nimmt die MAP-Kinase-Kaskade eine zentrale Stellung ein, da über sie eine Vielzahl extrazellulärer Signale zu den Zielfaktoren in der Zelle geleitet wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die wichtigsten Faktoren einer MAP-Kinase-Kaskade für *E. multilocularis* nachgewiesen werden: vier kleine GTP-bindende Proteine [294, 297], ein Raf-Homolog [297], ein 14-3-3-Homolog, eine MAP-Kinase-Kinase (MKK) und eine MAP-Kinase [298]. Eine ausführliche Beschreibung der Signaltransduktion über die Map-Kinase-Kaskade und des assoziierten EGF-Rezeptors bieten die folgenden Kapitel.

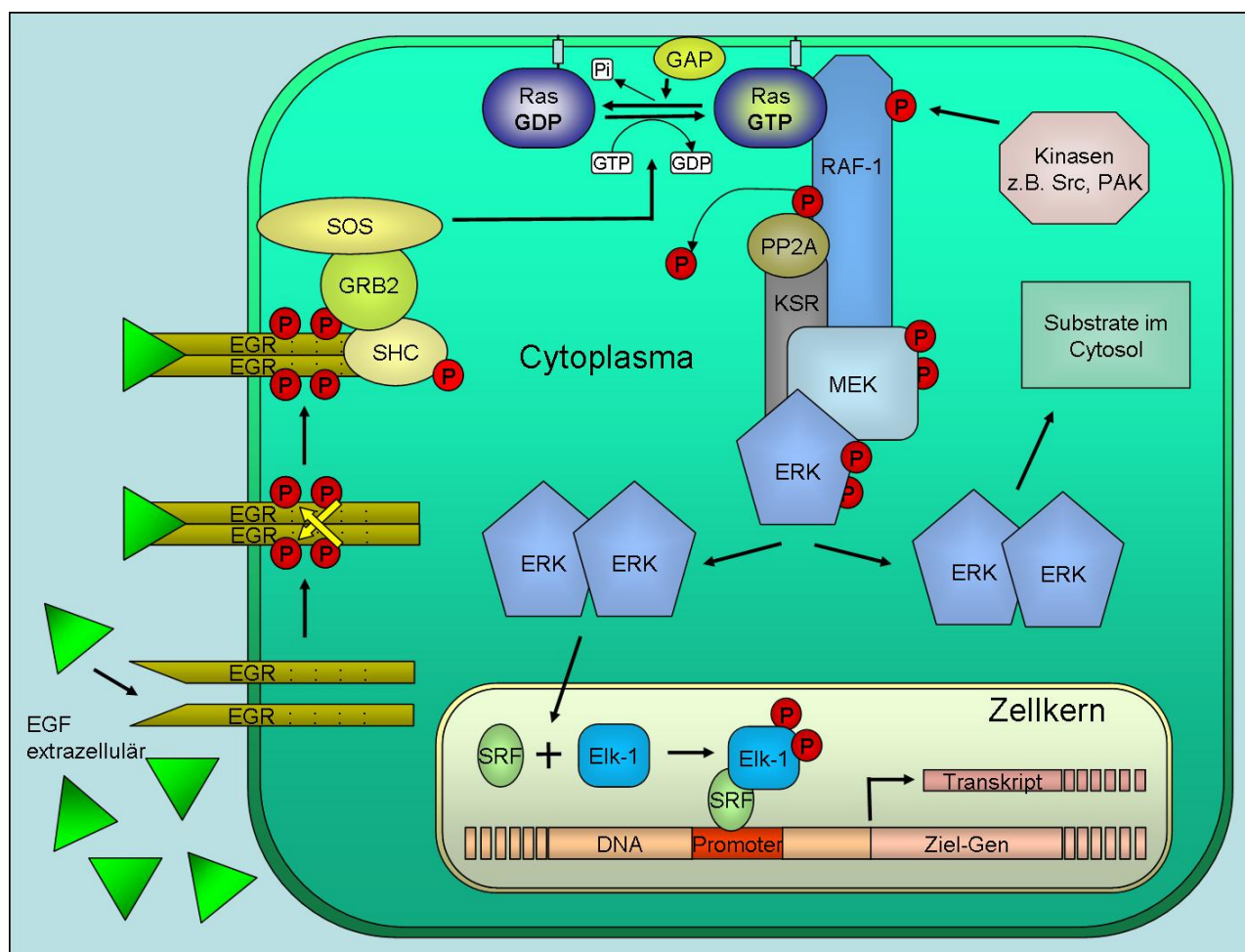
In Bezug auf die Wirt-Parasit-Interaktion ergibt sich jetzt folgendes Bild: Für *E. multilocularis* konnte nachgewiesen werden, dass er tatsächlich Faktoren verschiedener Signaltransduktionswege besitzt, für die in besser untersuchten Organismen die Reaktion auf kleine Signalmoleküle beschrieben ist. Ob und wie die gefundenen Faktoren an dem Wachstum und der Differenzierung des Fuchsbandwurmes beteiligt sind, kann jetzt über molekularbiologische Methoden und *in vitro* Kulturstudien bestimmt werden. Wir sind noch am Anfang, aber es geht voran.

## 2.4 EGF - Signaling und MAP-Kinase-Kaskade

Die MAP-Kinase-Kaskaden (**M**itogen-**a**ktiviert**e P**rotein-**K**inase, MAPK) spielen eine entscheidende Rolle in vielen Bereichen zellulärer Funktionen und sind von der Hefe bis zum Säugtier konserviert. Jede MAP-Kinase hat ihre eigenen Aktivatoren, Substrate und Inaktivatoren [309]. Die Stimuli reichen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen über Strahlung und Osmolarität bis zum Scherstress, der von Flüssigkeit verursacht wird, die über eine Zelle fließt [334]. Die intrazelluläre Signaltransduktion über MAP-Kinasen ist eines der ursprünglichen Signalsysteme (MAPK-Kaskade), das eine Vielzahl fundamentaler zellulärer Prozesse wie die Proliferation, die Differenzierung, das Überleben und die Apoptose der Zelle kontrolliert. In seiner einfachsten Zusammensetzung besteht eine MAPK-Kaskade aus einem kleinen GTP-bindendem Protein (GTPase) das upstream eines Dreikinase-Moduls wirkt, dessen Komponenten MKKK, MKK und MAPK einen sequentiellen Aktivierungs-Signalweg aufbauen [334, 178]. Jede Komponenten-Familie hat viele Mitglieder und bisher können 6 MAPK-Module, die strukturell verwandte Komponenten teilen, unterschieden werden [116]. Im Signalverlauf aktiviert eine GTPase in ihrer aktiven Form eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MKKK), die eine MAP-Kinase-Kinase (MKK) aktiviert, welche dann im Anschluß eine MAP-Kinase (MAPK) aktiviert [178]. Die aktive MAP-Kinase kann dann das Signal an eine Vielzahl möglicher Faktoren im Cytosol oder im Zellkern übertragen [334, 178].

Die in Säugern am besten beschriebene MAPK-Kaskade ist der ERK1/2-Signalweg (ERK: **e**xtracellular **s**ignal-**r**egulated **k**inase), der über viele verschiedene extrazelluläre Signale aktiviert werden kann und zur Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und anderer Serin/Threonin-Kinasen führt, die an der Differenzierung und Proliferation der Zelle, der Regulation des Zell-Zyklus sowie am Überleben der Zelle beteiligt sind [334, 67, 246, 283, 273]. Wie für alle MAP-Kinasen beschrieben, ist auch ERK1/2 innerhalb der ERK-Kaskade in einem Dreikinase-Modul organisiert. Die Vielzahl möglicher extrazellulärer Signale, die am Ende zu einer Aktivierung von ERK1/2 führen, lässt sich durch die Zusammensetzung dieser Dreikinase-Module erklären, die in Säugern aus einem von acht verschiedenen MKKK (Raf-1, A-Raf, B-Raf, Mos, MEKK1, MEKK2, MEKK3, Tpl-2), einem von zwei MKK (MEK1 oder MEK2) und ERK1 oder ERK2 bestehen. Weitere Möglichkeiten ergeben sich zum Beispiel durch die Interaktion von MKKK mit unterschiedlichen vorgeschalteten Faktoren [334].

Eine sehr gut charakterisierte Signaltransduktion, die von einem extrazellulären Signal ausgelöst zur Aktivierung von ERK1/2 führt, ist für den Wachstumsfaktor EGF (**E**pidermal **g**rowth **F**actor) beschrieben. Abb. 3 zeigt die wichtigsten Komponenten und Co-Faktoren, sowie deren Zusammenspiel in der EGF-induzierten Signaltransduktion über ERK. Im ersten Schritt bindet EGF an transmembrane EGF-Rezeptoren, die das Signal in die Zelle übertragen und dort über den Grb2-SOS-Komplex Ras (GTPase) aktivieren. Aktives Ras aktiviert Raf (MKKK), das MEK (MKK) aktiviert, das ERK (MAPK) aktiviert, welches das Signal dann an eine Reihe von Faktoren im Cytosol und im Nucleus weiter geben kann [178]. Die für diese Arbeit wichtigen Faktoren der ERK-Kaskade werden in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben, wobei die Beschreibung der einzelnen Faktoren der Reihenfolge ihres Auftretens in der ERK-Signalkaskade folgt: EGF, EGF-Rezeptor, GTPasen der Ras-Familie (Ras, Ral, Rap1, Rap2), Raf, 14-3-3, MKK und ERK. Eine Reihe weiterer, mit der ERK-Kaskade von *E. multilocularis* assoziierte, Faktoren konnte in cDNA-Bibliotheken gefunden werden, sind aber nicht Teil dieser Arbeit.



**Abb. 3: EGF-Signaling und MAP-Kinase-Kaskade**

Die Bindung des Epidermal-Growth-Faktors (EGF) führt zur Dimerisierung von transmembran lokalisierten EGF-Rezeptoren und deren Autophosphorylierung (P) an Tyrosinresten. Diese Phosphotyrosine dienen als Andockstelle für Signalmoleküle wie Shc und dem Grb2-SOS-Komplex (Grb2: growth-factor-receptor-binding protein 2, SOS: son of sevenless), welcher das kleine GTP-bindende Protein Ras aktiviert, indem der Austausch von Guanodin-Diphosphat (GDP) zu Guanodin-Triphosphat (GTP) stimuliert wird. Dieser Austausch bewirkt eine Konformationsänderung in Ras, das jetzt an Raf-1 binden kann und dieses aus dem Cytosol an die Zellmembran rekrutiert wo die Aktivierung von Raf-1 stattfindet. Die Aktivierung von Raf-1 ist ein Prozess, in den viele Schritte involviert sind, wie die Dephosphorylierung inhibitorischer Reste durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) oder die Phosphorylierung aktivierender Reste durch PAK (p21<sup>raccdc42</sup>-activated kinase), Proteine der Src-Familie und andere bisher unbekannte Kinasen. Aktiviertes Raf-1 phosphoryliert und aktiviert MEK (Map-Kinase-Kinase, MKK), das dann ERK (extracellular-signal-regulated-kinase, MAPK) phosphoryliert und aktiviert. Das gesamte Drei-Kinasen-Modul, bestehend aus Raf-1, MEK und ERK ist an den als Gerüst fungierenden Proteinen KSR (kinase suppressor of Ras) und MP1 (MEK partner 1, nicht gezeigt) lokalisiert. Das aktivierte ERK hat eine Vielzahl von Substraten im Cytosol (z.B. Cytoskelett-Proteine, Phospholipase 2A und Signal-Proteine wie Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, Östrogen-Rezeptoren, SOS und andere), kann aber auch in den Zellkern eindringen und dort die Genexpression z. B. über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. Elk-1 kontrollieren [188, 263].

**Die Regulation der MAP-Kinase-Kaskade:** Für Säugersysteme ist beschrieben, dass ein einziger Rezeptor verschiedene MAPK-Kaskaden aktivieren kann, zusätzlich führt die Aktivität einer MAPK-Kaskade nicht zwingend zur Aktivierung einer anderen auch wenn einzelne Komponenten in verschiedenen Kaskaden gefunden werden [334]. Die Vielfalt an möglichen Stimuli, MAPK-Modulen und Zielfaktoren erfordert daher eine sehr feine Regulation der MAPK-Kaskaden, die die Signale sehr genau und mit hoher Effizienz übertragen müssen, um ihre zellulären Aufgaben zu erfüllen. Der Auf- und Abbau von Verbindungen zwischen den Proteinfaktoren der MAPK-Module wird in diesem Zusammenhang zunehmend als regulatorisches Motiv für die räumliche und zeitliche Steuerung von MAPK-Signalwegen beobachtet [309]. Dabei wird die Spezifität der Regulation durch Protein-Interaktionen, die die beteiligten Faktoren untereinander oder mit weiteren regulatorischen Proteinen eingehen und über die Organisation von MAPK-Modulen über Anker- und Gerüstproteine (scaffolding) erreicht. Beim Scaffolding führen die Gerüst-Proteine verschiedene

Kinasen für die selektive Aktivierung und die Lokalisation von Signal-Komplexen zusammen oder entfernen einzelne Komponenten [116]. Die gerüstbildenden Proteine in der ERK-Kaskade sind unter anderem KSR (**kinase supressor of Ras**) und MP1 (**MEK partner 1**). KSR bindet Raf, ERK und vor allem MEK, wobei MEK aus einer gelösten Form in einen Komplex mit hohem Molekulargewicht überführt wird [302]. Experimente mit KSR-defizienten Mäusen deuten darauf hin, dass KSR für die Signalübertragung nicht essentiell ist, aber das Signal von Ras verstärkt [224]. Das Gerüstprotein MP1 verbindet MEK mit ERK, mit einer verstärkten Spezifität zu MEK1 und ERK1 und daraus resultierend einer bevorzugten Aktivierung von ERK1 [274]. Ein wichtiger Bestandteil der Regulationsmechanismen sind die Protein-Interaktionen zwischen den beteiligten Molekülen. Ein Beispiel dafür sind die negativen Rückkopplungs-Mechanismen durch ERK, das vorgeschaltete Faktoren regulieren kann, indem es die katalytische Aktivität der signalgebenden Rezeptor-Tyrosinkinase (EGF-Rezeptor), eines Adaptormoleküls (SOS), des MKKK (Raf-1) oder des MKK (MEK1) reduziert [334].

## 2.5 EGF - Wachstumsfaktor

Epidermal-Growth-Factor-ähnliche (EGF) Proteine sind eine phylogenetisch alte Gruppe von Mitogenen, die eine wichtige Rolle in den Zell-Zell-Kommunikationsmechanismen spielen, die die Proliferation und die Entwicklung in vielzelligen Organismen steuern [215]. In Säugetieren kann EGF in verschiedenen Konzentrationen in der Milch, der Speichelflüssigkeit, im Urin (9-100 ng/ml), dem Plasma (1 ng/ml) sowie den meisten anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. EGF wird in verschiedenen Organen, wie zum Beispiel dem Gehirn, den Nieren, der Speicheldrüse und dem Magen produziert. Die Produktion von EGF wird durch Testosteron stimuliert und durch Östrogene inhibiert [106].

Humanes EGF ist ein 53 AS langes globuläres Protein von 6.4 kDa, das 3 intramolekulare, für die biologische Aktivität essentielle, Disulfidbrücken besitzt [143, 249]. Die hohe Identität von durchschnittlich 70%, die humanes EGF mit EGF-Proteinen anderer Spezies auf Aminosäureebene aufweist, deutet darauf hin, dass EGF-Proteine evolutionär konserviert sind [106, 61]. Das humane EGF wird als sehr großes Prepro-Protein von 1207 AS synthetisiert, von dem der C-terminal lokalisierte Faktor (Position 970-1023) nach einer proteolytischen Abspaltung freigegeben wird [23, 275]. Der EGF-Vorläufer ist N-terminal glycosyliert und kann sich über eine hydrophobe Domäne in der Plasmamembran verankern [275].

EGF-ähnliche Faktoren wirken auf die Zielzelle über die Bindung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) der EGF-Rezeptorfamilie, die an der Oberfläche der Zellen lokalisiert sind. Mitglieder dieser Rezeptorenfamilie konnten über den gesamten evolutionären Bereich in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen werden [215].

## 2.6 EGF- Rezeptor

Membrandurchspannende Oberflächenrezeptoren der Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie haben eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, die den Transfer des  $\gamma$ -Phosphats von ATP auf die Tyrosin-Hydroxylgruppen von Zielproteinen katalysiert. Alle Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) haben eine teilweise glycosylierte extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, die über eine einzelne transmembrane Helix mit dem cytoplasmatischen Teil verbunden ist. Im cytoplasmatischen Teil liegt eine konservierte Protein-Tyrosinkinase-Domäne und regulatorische Regionen, die autophosphoryliert oder von anderen Kinasen phosphoryliert werden können [278]. Beinahe alle RTKs liegen an der Zellmembran als Monomere vor. Die Bindung eines Liganden führt zur Dimerisierung und an-

schließenden Autophosphorylierung von Tyrosinresten [157, 321]. Rezeptor-Tyrosinkinase sind an Schlüsselprozessen der Zelle, wie Wachstum und Metabolismus, maßgeblich beteiligt [280].

Die zuerst entdeckte RTK war der EGF-Rezeptor v-ERB eines Vogel-Retrovirus [86], über dessen Untersuchung viele Prinzipien der RTK-Funktionen etabliert wurden [279]. Der homologe humane 170 kDa große EGF-Rezeptor ErbB1 (auch HER1) ist der am besten erforschte EGF-Rezeptor und bildet mit drei weiteren, nah verwandten Rezeptoren eine RTK-Unterfamilie, zu der der ErbB2 (auch HER2 und neu), ErbB3 (auch HER3, charakterisiert durch eine beeinträchtigte Kinasedomäne) und ErbB4 (auch HER4) gehören [363]. Aktivierende Mutationen sowie die Überexpression von HER1 und seinen Verwandten können eine Rezeptordimerisierung imitieren und werden mit verschiedenen Krebserkrankungen, wie Brustkrebs, dem Plattenepithelkarzinom und dem Glioblastom (bösartiger Hirntumor) in Verbindung gebracht [28]. EGF-Rezeptoren sind hoch konserviert und werden von den meisten, wenn nicht gar allen Metazoen exprimiert. Beschrieben sind sie unter anderem für Chordaten [157, 321], Insekten [175, 62], Nematoden [131, 84] und Trematoden [253]. Dabei zeigen sich zwischen den verschiedenen Spezies hohe Homologien der intrazellulären Tyrosin-Kinasedomäne, aber nur geringe Homologien der extrazellulären, cysteinreichen Domäne [277].

An die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, können EGF und TGF $\alpha$  binden, die als monomere, wachstumsregulierende Hormone wirken. Die Bindung eines Liganden führt zur Dimerisierung zweier EGF-Rezeptoren und zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren [277, 130]. Dadurch wird die intrazelluläre Tyrosin-Kinasedomäne aktiviert, die 7 der mindestens 9 phosphorylierbaren Tyrosinreste in der cytoplasmatischen Domäne autophosphoryliert [187]. Die Tyrosin-Autophosphorylierungsstellen des EGF-Rezeptors (wie auch anderer RTKs) dienen zur Erkennung und dem Aufbau von Signalkomplexen, da sie als Bindungsstellen für SH2- (Src homology 2) und PTB-Domänen (phosphotyrosin binding domain) dienen [278].

In der EGF-vermittelten Aktivierung von ERK1/2 ist eines dieser Signalmoleküle Grb2 (growth factor receptor bound protein 2), ein im Cytosol der Zelle lokalisierter Adapter, der eine zentrale SH2-Domäne besitzt, die von zwei SH3-Domänen (Src homology 3) flankiert wird [189]. Grb2 bindet entweder direkt oder durch die Mithilfe von Shc, einem weiteren SH2-Adapter [245] an den aktivierten EGF-Rezeptor über das phosphorylierte Tyrosin an Position 1068, das eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne von Grb2 [265] bildet. Durch die Rekrutierung von Grb2 aus dem Cytosol an die Plasmamembran gelangt auch das über die SH3-Domänen an Grb2 gebundene SOS (son of sevenless) dort hin [189, 265]. SOS ist ein GEF (guanin exchange factor) der die Abspaltung von GDP und die Bindung von GTP an Ras beschleunigt und dadurch diese membrangebundene GTPase in ihre aktive Form überführt [189]. Das aktive GTP-Ras gibt dann das Signal an die ERK1/2-Kaskade weiter.

Über die phosphorylierten Tyrosine können aber auch cytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, wie STATs (signal transducers and activators of transcription) direkt an RTKs binden. Im Gegensatz zu den mitogenen Ras/ERK-Signalen haben diese aber vermutlich eine antimitogene Rolle bei der Kontrolle der Proliferation [135].



## 2.7 GTPasen der Ras-Familie (Ras, Rap1, Rap2, Ral)

Kleine GTP-bindende Proteine (GTPasen) sind monomerische G-Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 – 40 kDa, die sowohl eine GDP/GTP-Bindungsaktivität als auch eine GTPaseaktivität besitzen. Die bisher über 100, in Eukaryonten von der Hefe bis zum Menschen, identifizierten kleinen GTP-bindenden Proteine bilden eine Superfamilie, deren Mitglieder strukturell in die fünf Familien, Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran, unterteilt werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen kleinen GTP-bindenden Proteine EmRas, EmRal, EmRap1 und EmRap2 gehören zu der Ras-Familie, deren Mitglieder vor allem an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Sie haben Anteil an der Regulation der Zellproliferation, Differenzierung, Morphologie und Apoptose. Kleine GTP-bindende Proteine können in allen Eukaryonten nachgewiesen werden, am weit verbreitetsten jedoch in Säugerzellen, wo sie in verschiedenen Expressionsstärken und manchmal auch gewebespezifisch exprimiert werden [307].

Zwischen allen kleinen GTP-bindenden Proteinen gibt es 5 hoch konservierte Aminosäureseotive: die Region I (G1), eine ATP/GTP-Bindungsdomäne mit der Konsensus-sequenz **GXXXXGK** (X steht für alle AS), die die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphate von GTP oder GDP bindet, die Effektordomäne (G2 oder switch I), die ihre Konformation nach der GTP-Bindung ändert und substratspezifisch ist, die Region II (G3 oder switch II), mit der Sequenz **DXXG**, in der das  $\gamma$ -Phosphat und das katalytisch  $Mg^{2+}$ -Ion bindet, die Region III (G4) mit der Sequenz **NKXD** in der der Guanin-Ring bindet und die Region IV (G5) mit der Sequenz **EXSAX**, die die GTP/GDP-Bindung stabilisiert [42, 307]. Zusätzlich haben viele kleine GTP-bindende Proteine, z.B. die der Ras Familie, an ihrem C-Terminus Sequenzen, die posttranslational mit Lipiden wie Farnesyl oder Geranylgeranyl modifiziert werden und eine Verankerung in der Zellmembran ermöglichen [63, 123, 198, 306, 357]. Jedes kleine GTP-bindende Protein ist an einer bestimmten Membran lokalisiert, Ras-Proteine zum Beispiel auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran [141].

Kleine GTP-bindende Proteine wirken als molekulare Schalter und kommen in einer inaktiven GDP-gebundenen und einer aktiven GTP-gebundenen Form vor [41, 139, 306]. Ein upstream-Signal führt zur Abtrennung von GDP aus der inaktiven Form. Die folgende Bindung von GTP bewirkt eine Konformationsänderung in der Region II sowie der Effektor-Bindungsdomäne (switch I), die jetzt mit einem downstream-Effektor interagieren kann. Diese Interaktion bewirkt eine Veränderung des downstream-Effektors und ist damit ausschlaggebend für die Weiterleitung des Signals. Über eine intrinsische GTPase-Aktivität wird die aktive GTP-gebundene Form wieder in die inaktive GDP-gebundene Form überführt, von der sich dann der gebundene Effektor löst. Auf diese Art und Weise geben die kleinen GTP-bindenden Proteine, einem molekulare Schalter gleich, ein upstream-Signal an einen downstream-Effektor weiter [307]. Reguliert wird diese Signalübertragung durch eine Reihe weiterer Faktoren:

Die Reaktion, in der GDP gegen GTP getauscht wird, verläuft sehr langsam und wird daher vom **GEP** (GDP/GTP Exchange Protein) stimuliert, dessen Aktivität wiederum von einem upstream-Signal abhängt [31, 56, 327].

Die GTPase-Aktivität zwischen den verschiedenen kleinen GTP-bindenden Proteinen unterscheidet sich, ist aber relativ langsam und wird daher von **GAPs** (GTPase Activating Protein) stimuliert [31, 114, 316].

Bei einigen kleinen GTP-bindenden Proteinen (Rho, Rab aber nicht die der Ras-Familie) existieren **GDI**s (GDP Dissociation Inhibitor), die die Abtrennung von GDP aus der inaktiven GDP-bindenden Form verhindern [307].

## 2.7.1 RAS

Ras ist das erste beschriebene kleine GTP-bindende Protein und wurde als transformierendes Onkogen (C-Ras) in murinen Sarcomaviren entdeckt. In Säugetieren konnten die drei nah verwandten 21 kDa großen Orthologen Harvey-Ras (H-Ras), Kirsten-Ras (K-Ras) und Neuroblastoma-Ras (N-Ras) isoliert werden [286]. Aktivierende Mutationen dieser Ras-Isoformen, ausgelöst durch eine beeinträchtigte GTPase-Funktion und eine Stabilisierung im GTP-gebundenen Zustand, werden bei annähernd einem Drittel aller menschlichen Krebserkrankungen gefunden [283]. Ras Proteine sind an der Cytoplasmamembran lokalisiert und an der Regulation der Zell-Proliferation, Zell-Differenzierung, Zell-Morphologie und der Apoptose beteiligt [307]. Die Aktivität von Ras wird dabei von GEPs und GAPs reguliert und durch eine Vielzahl an extrazellulären Signalen, die über Rezeptor-Tyrosinkinasen sensiert werden, induziert [10, 20, 37, 204, 264, 325, 343]. Im Verlauf der EGF-induzierten ERK-Kaskade interagiert SOS (GEP), das den Austausch von gebundenem GDP zu GTP stimuliert, mit membrangebundenem Ras [18], das mit einer hohen Affinität als Adapter für Raf-Kinasen wirkt. Diese werden durch Ras an die Zellmembran geführt und dort aktiviert [165].

## 2.7.2 RAP1/2

Rap-GTPasen haben eine Größe von 20 - 25 kDa und bilden innerhalb Ras-Familie eine Unterfamilie, die mehreren Vertreter zählt, wovon Rap1 am besten charakterisiert ist. Die Datenlage für Rap2 ist dagegen noch sehr dünn [307, 38, 232].

**Rap1:** Rap1 spielt eine zentrale Rolle in zellbiologischen Prozessen, da es Signale, die innerhalb biologischer Membranen generiert werden, mit intrazellulären Effektoren verknüpft. Beteiligt ist Rap1 zum Beispiel bei der Aktivierung von Integrinen und an der Regulation der ERK-Kaskade [232, 89]. Von Rap1 existieren die zwei Isoformen Rap1A und Rap1B, die sich in wenigen AS-Resten voneinander unterscheiden [307]. Die Effektor-Bindungsdomänen (switch I, G2) von Rap1 und Ras sind hoch homolog und führen dazu, dass beide die gleichen Effektor-Proteine, wie Raf-1, B-Raf, RalGDS (ein Ral-spezifisches GEP) und AF-6, binden können [38]. Wie bei allen GTPasen der Ras-Familie führt eine Vielzahl von Stimuli zur Aktivierung von Rap1, die von GEPs und GAPs reguliert wird [232, 38]. Ein wichtiger Unterschied zu Ras ist die Lokalisation von Rap1, das nicht nur an der Cytoplasmamembran [115, 232] sondern auch an Membranen des Golgi-Apparats [38, 60], lysosomalen Vesikeln [38], perinukleären Strukturen [191] und dem Perisom [60, 352, 338] lokalisiert sein kann. Dieses weite Spektrum an Lokalisationsmöglichkeiten erklärt auch, warum Rap1 an der Aktivierung von ERK inhibierend oder aktivierend beteiligt sein kann [232]. Rap1 konkurriert mit Ras um die Bindung an Raf-1, geleitet dieses jedoch an Membrandomänen, in der die für die vollständige Aktivierung von Raf-1 nötigen Co-Faktoren nicht vorhanden sind. Durch diesen antagonistischen Effekt wirkt Rap1, im Fall der EGF-vermittelten Aktivierung von ERK, inhibierend [38, 60, 59]. Verschiedene Signale, wie zum Beispiel Dopamin, führen zu einer cAMP-vermittelten Aktivierung von RAP1, das dann über eine Interaktion mit B-Raf zur Aktivierung von ERK führt. Diese Regulation von ERK durch Rap1 über B-Raf ist Zelltyp-spezifisch, da B-Raf nicht in allen Zellen exprimiert wird [232].

**Rap2:** Das im Gegensatz zu Rap1 bisher wenig untersuchte Rap2 ist zu 60% identisch mit Rap1 und an der Zell-Entwicklung [69], der Zell-Migration [206], der Regulation des Aktin-Cytoskellets [305], der Regulation von Rho [221], dem JNK-Signalweg [360, 197] und der ERK-Signalkaskade [184, 233] beteiligt, die genauen Funktionen sind jedoch weitgehend ungeklärt. Wie Rap1 ist Rap2 sowohl an der Cytoplasmamembran als auch an intrazellulären Membrankomponenten lokalisiert und kann Raf-1 binden, wodurch die Ras-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk1 inhibiert wird [231]. Im Gegensatz zu anderen GTPasen der Ras-Familie liegt Rap2 in Zellen (*in vitro* Studien an adhärennten 293T-Zellen) zu über 50% in der GTP gebundenen Form vor. Bekannt sind verschiedene GEPs und GAPs, die Rap2 regulieren [184,

233]. Einige davon sind nicht nur Rap2-spezifisch sondern regulieren auch Rap1. Während die GEPs, die den Austausch von GDP in GTP stimulieren, bei Rap1 und Rap2 die gleiche Aktivität zeigen, unterscheidet sich die GTPase-Aktivierung durch gemeinsam verwendeten GAPs deutlich zwischen Rap1 und Rap2. Die Folge ist, dass Rap2 wesentlich länger am Effektor gebunden bleibt als Rap1 und in Signalwegen, in die beide GTPasen involviert sind, zu einer verlangsamt Signalübertragung führt [233, 231].

### 2.7.3 RAL

Die Ral-Unterfamilie besteht aus RalA und RalB. Ral-Proteine werden wie Ras über GEPs und GAPs reguliert und in Antwort auf verschiedene mitogene Regulationskaskaden, wie zum Beispiel über den EGF- und den Insulin-Signalweg, aktiviert [36, 307, 25, 90]. In der EGF-vermittelten Signaltransduktion liegt Ral downstream von Ras und wird dabei durch die Ral-spezifischen GEPs Rgl, Rlf und GDS stimuliert, die direkt mit aktivem Ras interagieren [151, 174, 293, 261, 337]. Neben seiner Rolle als downstream-Effektor von Ras kann Ral auch Ras-unabhängig aktiviert werden, wie zum Beispiel über Kalzium-Signalwege [74]. Die genaue Funktion der Ral-Proteine in der eukaryontischen Zelle ist weitgehend unbekannt, zuletzt konnten sie jedoch mit der Kontrolle der Zellproliferation und der Ras vermittelten onkogenen Zelltransformation in Verbindung gebracht werden [261, 337, 307, 240, 68]. Weiterhin konnten mehrere Effektoren identifiziert werden, die an der Koordination des Vesikelverkehrs in der Zelle oder an der Organisation des Cytoskelllets beteiligt sind. RLIP76, ein CDC42/Rac-GAP und Sec5, eine Untereinheit des sec6/8-Exocysten-Komplexes sind die am besten charakterisierten, aber auch RalBP1, ein weiteres CDC42/Rac-GAP, Phospholipase D und Filamin sind als Effektoren für Ral beschrieben [218, 228, 307].

## 2.8 Raf (MKKK)

**Raf (MKKK):** Wie Ras wurde die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MKKK) Raf (*v-Raf*) zuerst in Form eines retroviralen mutationsauslösenden Faktors entdeckt [254]. Säugetiere besitzen drei Raf-Proteine mit einer Größe zwischen 70 und 100 kDa: das in allen Geweben exprimierte und am besten studierte Raf-1, das weniger gut untersuchte A-Raf mit hohen Expressionsstärken in Muskel- und Urogenitalgewebe [186] und B-Raf, das in verschiedenen Isoformen auftritt und stark in fötalem Hirn und adultem Großhirn exprimiert wird [19]. Zusätzlich zu ihrer unterschiedlichen zellspezifischen Expression variieren auch die Phänotypen von *Raf*-knock-out Mäusen. Mäuse ohne *A-Raf* überleben die Geburt mit Missbildungen im Darm- und Nervengewebe [251], ohne *B-Raf* sterben sie an Gefäßdefekten während der Schwangerschaft [336] und durch verschiedene Entwicklungsdefekte sterben auch *Raf-1*-defiziente Mäuse, schon in der Gebärmutter [211]. Diese Ergebnisse deuten darauf, dass Raf-1 eine allgemeine Rolle in der Bildung von Gewebe spielt während A-Raf und B-Raf spezialisierte Aufgaben erfüllen [334, 178]. Zusätzlich wurde vorgeschlagen, dass B-Raf das primäre Ziel für oncogene Ras-Isoformen ist [202] und es konnte gezeigt werden, dass aktivierende Mutationen von B-Raf, die alle innerhalb der Kinasedomäne liegen und am häufigsten durch einen Austausch von Val<sup>599</sup> in Glu zustande kommen, in 66% aller Malignome vorkommen [79]. In der EGF-vermittelten Signalübertragung sind die Raf-Proteine an der ersten Stelle des Dreikinase-Moduls lokalisiert und geben ihr Signal über MKK (MEK) an ERK1/2 weiter. Die ERK-Aktivierung kann dabei von Raf-1 und B-Raf ausgehen. Beide Kinasen werden unterschiedlich reguliert, daher kann die gleichzeitige Aktivität beider Kinasen zu einer verstärkten ERK-Aktivierung führen [334, 178]. Ein wichtiges Molekül ist in diesem Zusammenhang cAMP, das die ERK-Kaskade über PKA, das Raf-1 inhibiert, inhibieren oder über den Weg Rap-1/B-Raf aktivieren kann [326, 80].

Raf-Proteine besitzen eine C-terminale Ser/Thr-Proteinkinasedomäne, die die Phosphorylierung von Hydroxylgruppen an spezifischen Serin- und Threonin-Resten katalysiert [205]. Die Substrate

von Raf sind dualspezifische Serin/Threonin-Kinasen (MKKs bzw. MEKs), die über zwei separate Bindungsstellen an Raf-1 binden [334, 95, 339]. Im N-terminalen Bereich von Raf sind die Ras-Bindungs-Domäne (RBD) und die Cystein-reiche Domäne (CRD) lokalisiert [334, 178]. Dort binden kleine GTP-bindende Proteine, wie zum Beispiel Ras, und führen zur Aktivierung von Raf [53, 154]. Während die RBD für die Translokation von Raf aus dem Cytosol an die Zellmembran wichtig ist, ist die CRD essentiell für die Raf-Aktivierung [153, 196, 268]. Die Aktivierung und Regulation von Raf ist ein komplexer Vorgang, in dem verschiedene Proteininteraktionen die intrazelluläre Lokalisation und das Phosphorylierungsmuster von Raf beeinflussen. Am besten beschrieben ist in diesem Zusammenhang Raf-1.

**Raf-1:** Im Cytosol wird Raf-1 von Akt-Isoformen an Serin S<sup>259</sup> und S<sup>621</sup> phosphoryliert, wodurch 14-3-3-Dimere binden können, die die inaktive Form von Raf-1 stabilisieren [361]. Im ersten Schritt der Aktivierung bindet GTP-Ras über dessen Effektordomäne an der Ras-Bindungs-Domäne (RBD) und der cysteinreichen Domäne (CRD) von Raf-1 und führt zur Translokation an die Cytoplasmamembran [108]. Dort wird das inaktivierende Serin S<sup>259</sup> dephosphoryliert, das nach der Bindung von GTP-Ras an Raf-1 für die ebenfalls an der Cytoplasmamembran lokalisierten Serin/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A zugänglich ist. Diese Dephosphorylierung ist einer der ersten und essentiellen Phosphorylierungswechsel von Raf-1 während der Aktivierung und führt zur Freisetzung eines Armes des 14-3-3-Dimers, das jetzt mit weiteren Faktoren, wie zum Beispiel KSR, interagieren kann und zur Bildung eines Dreikinasen-Moduls führt [178]. Die Aktivierung von Raf-1 erfolgt über die vier Ras-induzierbaren, aktivierenden Phosphorylierungsstellen: Ser<sup>338</sup>, Tyr<sup>341</sup>, Thr<sup>491</sup> und Ser<sup>494</sup>. Mutationen an diesen Stellen durch Aminosäuren, die Phosphorylierungen nachahmen, führen zu einer Ras-unabhängigen konstitutiven Aktivität [71]. Verschiedene Ras-Isoformen aktivieren dabei Raf-1 unterschiedlich stark und spezifisch. K-Ras, zum Beispiel, rekrutiert Raf-1 wesentlich effizienter an die Plasmamembran und aktiviert dieses dort auch deutlich stärker als H-Ras [345]. Für Rap1 ist beschrieben, dass es an Raf-1 binden, dieses jedoch nicht aktivieren kann [307].

Die Kinaseaktivität von Raf-1 wird an der Cytoplasmamembran durch die Serinphosphorylierung an den Resten S<sup>259</sup> und S<sup>499</sup> über die Protein-Kinase C reguliert [334]. Weiterhin kann Raf-1 von ERK1/2 und Protein-Kinase A phosphoryliert und inhibiert werden. Die ERK-Phosphorylierung ist dabei eine klassische Feedback-Inhibition die den Umfang der Aktivität des Signalpathways begrenzt [334]. Für MEK1, den downstream-Effektor von Raf-1, konnte gezeigt werden, dass er die Aktivität von Raf-1 steigern kann. Das Signal, das im ERK-Signalweg übertragen wird, wird bei Ankunft an MKK verstärkt und negativ durch ERK1/2 reguliert, wenn ERK aktiviert wird. Diese Art der doppelten Regulation könnte wichtig sein, um die Dauer und die Stärke der ERK-Antwort (auf das Signal) zu bestimmen [334]. Eine weitere Regulationsmöglichkeit erfolgt über RKIP (**Raf Kinase Inhibitor Protein**), das sowohl an Raf-1 als auch MEK binden kann und eine Signalübertragung von Raf auf MEK unterbindet [178].

**B-Raf:** Im Unterschied zu Raf-1 wird B-Raf hauptsächlich durch die Bindung von kleinen GTP-bindenden Proteinen reguliert. Für die Aktivierung ist dabei die Bindung von GTP-Ras oder GTP-Rap1, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, ausreichend [235, 236]. Das ist möglich, weil B-Raf im Gegensatz zu Raf-1 keine weiteren Kinasesignale für die Aktivierung benötigt. Wichtige Reste, die für die Aktivierung von Raf-1 phosphoryliert werden müssen, sind bei B-Raf durch phosphomimetische Reste ersetzt (Raf-1: Tyr<sup>341</sup> in Raf-B Asp<sup>448</sup>) oder konstitutiv phosphoryliert (Raf-1: Ser<sup>338</sup>, Raf-B: Ser<sup>445</sup>) [205].

## 2.9 14-3-3-Proteine

Proteine der 14-3-3-Familie werden in allen eukaryontischen Zellen in großen Mengen exprimiert und sind eine evolutionär hochkonservierte Proteinfamilie, die an der Regulation des Zellzyklus, der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose beteiligt sind [112, 105, 5, 94, 146, 200, 260]. Sie wirken als Dimere, die eine Tasche bilden, in die zwei große Moleküle gleichzeitig passen [193] und interagieren mit einer Vielzahl von Signalproteinen, wodurch deren Funktion moduliert werden kann. In vielen Fällen inaktiviert 14-3-3 dabei das Zielprotein durch den Wechsel der subzellulären Lokalisation oder des Proteinverbands [346]. 14-3-3-Proteine binden an Motive die häufig Phosphoserine und Phosphothreonine enthalten [220, 344] und wurden zuerst als Interaktoren von Raf-1 über Y2H entdeckt [107, 111], an das sie über dessen phosphorylierte Serine S<sup>259</sup> sowie S<sup>621</sup> binden. Diese Bindung, in der 14-3-3 sowohl die aktive als auch die inaktive Form von Raf-1 stabilisieren kann [178], kann durch Mutationen von Ser<sup>259</sup>, Cys<sup>165</sup> und Cys<sup>168</sup> verhindert werden [200].

Die genaue Aufgabe der 14-3-3-Proteine ist noch nicht geklärt, zum Beispiel ergaben verschiedene Untersuchungen, dass die Bindung von 14-3-3 an Raf-1 auf die Raf-1-Kinaseaktivität verstärkend, unterdrückend oder ohne Effekt sein kann [96, 107, 161, 209]. Ein Modell beschreibt die Beteiligung von 14-3-3 während der Aktivierung von Raf-1. In ruhenden Zellen wird dabei inaktives Raf-1 im Cytosol über die Phospho-Serine S<sup>259</sup> und S<sup>621</sup> von 14-3-3-Dimeren gebunden. Während der Aktivierung von Raf-1 verdrängt Ras-GTP das 14-3-3-Dimer von der RBD und der CRD und führt zu einer Translokation des Komplexes an die Zellmembran. Zusätzlich wird die Bindung von 14-3-3 an das Serin S<sup>259</sup> destabilisiert. An der Zellmembran kann dann die Protein-Phosphatase 2A an das S<sup>259</sup> gelangen und die Phosphatgruppe entfernen, wobei ein Arm des 14-3-3-Dimers frei wird und mit weiteren Faktoren interagieren und dadurch den Aktivierungsprozess unterstützen kann. Einer dieser Faktoren kann das gerüstbildende KSR sein, für das eine Interaktion mit 14-3-3 nachgewiesen ist. KSR bindet ERK1/2 und MEK1/2 konstitutiv, Raf-1 jedoch nur an der Zellmembran, wo Raf-1 mit 14-3-3 assoziiert vorliegt. In diesem Fall ist 14-3-3 ein Gerüstprotein für ein Gerüstprotein und da 14-3-3 nur an phosphoryliertes Substrat bindet, kann 14-3-3 ein zusätzliches regulatorisches Element im Gerüstkomplex sein oder dessen Vielseitigkeit verstärken, indem es zum Beispiel das Umschalten zwischen verschiedenen alternativen MEK-Aktivatoren vermittelt [178].

## 2.10 MEK (MKK):

Humanes MEK1 und MEK2, sind in einem Dreikinase modul organisiert und werden durch phosphoryliertes Raf aktiviert [358]. Interessanterweise konnten bisher keine natürlichen oncogenen MEK-Proteine gefunden werden, obwohl konstitutiv aktive Formen Fibroblasten transformieren können, die Tumore in Nacktmäusen auslösen [199]. An Mäusen durchgeführte knock-out Mutationen von *mek1* führen schon in der Gebärmutter zu deren Tod, wobei die mutierten Embryonen durch eine gestörte plazentale Gefäßneubildung sterben, was darauf hin deutet, dass MEKs eine Rolle in der Angiogenese spielt [122]. MEK1 und MEK2 sind etwa 45 kDa groß und auf Aminosäureebene zu etwa 80 % identisch. Es ist wahrscheinlich, daß beide Formen unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Dafür sprechen die Versuche mit MEK1-defizienten Mäusen und die Konservierung beider Faktoren in allen Eukaryonten. Beide MEKs werden in Säugerzellen ubiquitär in mikromolaren Mengen exprimiert, obwohl einige gewebespezifische Varianten bekannt sind [52].

MKKs sind dualspezifische Threonin/Tyrosin-Kinasen, die das Threonin (T) und das Tyrosin (Y) in einem TXY-Motiv von MAP-Kinasen phosphorylieren [334]. MAP-Kinasen besitzen eine Domäne (common docking domain) über die die Bindung mit Interaktionspartnern erfolgt. Annähernd alle Proteine die mit MAP-Kinasen interagieren haben ein Motiv (MAPK docking site), das eine Bindung an diese Domäne erlaubt [308, 310, 178]. Für MKKs ist die N-terminale Konsensusse-

quenz **K/R XXX L/V X L** beschrieben, über die die Bindung an MAP-Kinasen erfolgt [91, 152, 347, 349, 308].

Aktiviert werden MEK1 und MEK2 durch verschiedene Raf-Kinasen [95, 334]. Im Cytoplasma bindet dabei inaktives MEK an ERK. Dieser Komplex geht anschließend eine Bindung mit Raf ein, das dann MEK aktiviert. Das aktive MEK phosphoryliert ERK, das erst nach dem Ablösen von MEK aktiv ist [334]. In der EGF-vermittelten Aktivierung der ERK-Kaskade aktivieren Raf-1, B-Raf und A-Raf MEK1 und MEK2 durch die Phosphorylierung der zwei Serinreste in deren aktivem Zentrum an Position 217 und 221 [8, 334]. Wird nur ein Serinrest phosphoryliert, zeigen die MEKs eine verminderte Aktivität und wenn die Serinreste durch saure Aminosäuren ersetzt werden, erhöht sich die Grundaktivität [199]. Während die Raf-Isoformen Enzyme sind, die nur in geringer Menge vorkommen, erlaubt die hohe Konzentration von MEKs eine Verstärkung des Signals [157]. Die verschiedenen Raf-Isoformen aktivieren MEK1 und MEK2 unterschiedlich: A-Raf aktiviert nur sehr schwach, B-Raf aktiviert bevorzugt MEK1 und Raf-1 aktiviert beide MEKs effizient [178]. Eine stark erhöhte Aktivierung erfolgt, wenn an Raf-1 das regulative Serin<sup>338</sup> phosphoryliert ist [339]. Positiv oder negativ reguliert wird MEK über zwei Phosphorylierungsstellen, die außerhalb des aktiven Zentrums liegen. Die erste, an Serin<sup>298</sup>, wird von PAK1 phosphoryliert und könnte MEK auf die Aktivierung durch Raf-1 vorbereiten [75]. Auf der anderen Seite führt *in vivo* die Phosphorylierung durch eine unbekannte Kinase, an dem in allen MKKs konservierten Serin<sup>212</sup> zu einem starken Nachlassen der Aktivität [124]. Eine weitere Regulationsmöglichkeit erfolgt über RKIP (**Raf Kinase Inhibitor Protein**), das sowohl an MEK als auch an Raf binden kann und eine Signalübertragung von Raf auf MEK unterbindet [178].

## 2.11 ERK (MAPK):

Extrazellular-Signal-Regulated-Kinases (ERK), die ihre Bezeichnung aufgrund der Vielzahl an extrazellulären Signalen über die sie stimuliert werden können erhalten haben, bilden eine Familie der MAP-Kinasen von der in Säugersystemen bisher die 8 Mitglieder ERK1 - ERK8 beschrieben sind. Daraus bilden die am besten charakterisierten MAP-Kinasen, ERK1 und ERK2 (auch MAPK3 oder MAPK1 genannt) eine Unterfamilie [334, 39, 67, 246, 283, 30]. Beschrieben sind sie als 44 kDa (ERK1) bzw. 42 kDa (ERK2) große Serin/Threonin-Kinasen, die in Säugetieren eine Sequenzhomologie von 90% haben [39, 40] und in den meisten Geweben exprimiert werden, wobei die Expressionsstärke von ERK2 im allgemeinen stärker ist. Knock-out-Studien an Mäusen haben gezeigt, dass der Verlust des einen ERK wenigstens teilweise durch das andere kompensiert werden kann [242]. Isoliert und kloniert wurden sie zuerst als Kinasen, die in Antwort auf eine Insulin- und NGF-Stimulation aktiviert wurden [39, 40]. Später konnten dann viele weitere Stimuli identifiziert werden, die über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder andere upstream liegende Signale zur Aktivierung von ERK1/2 führen [334]. Ein Beispiel ist der Wachstumsfaktor EGF, der wie Insulin oder NGF von einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase an der Zelloberfläche sensiert wird. Das Signal wird dann über einen Ras-abhängigen Signalweg an ERK weiter geleitet, das gemeinsam mit MEK und Raf über die gerüstbildenden Faktoren KSR und MP1 in einem Dreikinase-Modul organisiert ist [334]. Das aktivierte ERK reguliert, auf Wachstumsfaktoren reagierende, Zielproteine im Cytosol und kann auch in den Nucleolus wandern wo es eine Vielzahl von genexpressionsregulierenden Transkriptionsfaktoren phosphoryliert [334]. Obwohl ERK eine zentrale Rolle beim Wachstum und der Differenzierung der Zelle einnimmt, sind interessanterweise weder konstitutiv aktive Punktmutationen beschrieben noch aktivierende *in vivo* Mutationen bekannt [58, 334].

Die Voraussetzung für die Aktivität von MAP-Kinasen, wozu auch ERK1/2 gehören, ist die Phosphorylierung des Threonins (T) und des Tyrosins (Y) im TXY-Motiv des Activation-Loops ihrer Serin/Threonin-Kinasedomäne [266, 4]. Beide ERKs werden durch eine duale Threonin- und Tyrosinphosphorylierung durch MAP-Kinase-Kinasen (MEK) aktiviert, bei ERK1 an Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>

und bei ERK2 an Thr<sup>185</sup>/Tyr<sup>187</sup>. Im Gegensatz zu MEK benötigt ERK für eine signifikante Aktivierung die Phosphorylierung beider Reste, wobei zuerst das Tyrosin und dann das Threonin phosphoryliert wird [334, 4, 104]. Für die Aktivierung bindet im Cytosol zunächst inaktives MEK an inaktives ERK und bildet gemeinsam mit Raf einen Komplex. Nach der Aktivierung von MEK durch Raf wird ERK phosphoryliert und nach der Dissotiation von MEK aktiv. Die Aktivität von ERK hält solange an, bis es dephosphoryliert wird [334]. Die Dephosphorylierung von ERK erfolgt über, nur für MAP-Kinasen beschriebene, dualspezifische Phosphatasen (DSPs), die beide Reste dephosphorylieren und die MAPK-Signaltransduktionskaskade regulieren. In Säugerzellen sind mindestens 9 DSPs, die auch MAPK-Phosphatasen (MKPs) genannt werden identifiziert worden [57]. Dass mehrere dieser DSPs (MKP3, MKP4, PAC1, PP2A, HEPTP) mit der Dephosphorylierung und damit der Inaktivierung von ERK assoziiert sind [351, 359] deutet darauf hin, dass die Dauer und der Umfang der ERK-Aktivierung über eine fein abgestimmte Aktivität von MEK und dieser Phosphatasen kontrolliert wird. MAP-Kinasen sind prolingerichtete Proteinkinasen, die Serin- oder Threoninreste phosphorylieren, die neben Prolinresten liegen. Für ERK1/2 ist die generelle Konsensussequenz Pro-X-Ser/Thr-Pro beschrieben [11]. Die Substrate für aktives ERK sind vielfältig und finden sich sowohl im Cytosol als auch im Nucleolus.

Ziele im Cytosol sind zum einen Proteine die am ERK-Signalweg beteiligt sind und über die, durch deren Phosphorylierung, eine negative Rückkopplungsregulation erreicht wird: EGF-Rezeptor, SOS, MEK und MKP [330, 227, 51, 334]. Weiterhin wird über die Phosphorylierung von MNK1 (MAP kinase interacting kinase) der eukaryontische Initiationsfaktor 4E (eIF-4E) aktiviert, der dann die Translationseffizienz steigert [329, 176]. Durch die Phosphorylierung von RSKs (90 kDa ribosomal protein S6 kinases), die eine Hauptaufgabe in der Regulation der Transkription durch die Phosphorylierung des proto-Oncogens c-fos, von SRF (serum response factor) und von CREB (cyclic AMP response protein) einnehmen, wird von ERK indirekt die Transkription reguliert [66, 78, 118, 65, 342, 73].

Im Nucleolus ist ERK entscheidend für die von Wachstumsfaktoren induzierte Genexpression und die DNA-Replikation [54]. Dabei kann ERK eine Vielzahl von Zielproteinen phosphorylieren, wie Transkriptionsfaktoren, mit RSK-Kinasen verwandte Faktoren und MSKs (mitogen- and stress activated protein kinases) [81]. MSKs wiederum aktivieren die AP-1-Komponente ATF1, phosphorylieren Histon H3 und HMG-14, das die schnelle Induktion der ersten Gene nach einer mitogenen Stimulation unterstützt [134, 335, 292]. Wichtige, über ERK aktivierte Transkriptionsfaktoren sind c-Myc, ein kurzlebiger Transkriptionsfaktor, der in vielen Bereichen der Wachstumskontrolle involviert ist sowie verschiedene TCFs (ternary complex factors), wie Elk-1, Sap-1 und Sap-2 [201, 121, 250, 134]. Neben der weiter oben beschriebenen Aktivierung von MNKs nimmt ERK auch über die Phosphorylierung von BRF1 Einfluss auf die Proteinsynthese. BRF1 ist eine Untereinheit des RNA-Polymerase-(pol)-III-spezifischen Transkriptionsfaktors TFIIB, dessen Aktivierung die Translationseffizienz durch die Induktion der tRNA- und 5S-RNA-Synthese steigert [245]. Nach der Deaktivierung von ERK durch dualspezifische Phosphatasen wandert ERK wieder ins Cytoplasma [334].

In ihrer nativen Form bilden Map-Kinasen eine globuläre Struktur ohne eine eindeutige, für die Protein-Protein-Interaktionen spezifische, Domäne im Umfeld ihres aktiven Zentrums [309]. Solche Domänen, wie zum Beispiel (SH)<sub>2</sub>, SH3, PDZ, u.a. [243, 244, 160], sind gekennzeichnet durch geladene Aminosäuren und bestimmen die Spezifität und Effizienz der eingegangenen Bindung mit den Interaktionspartnern. Für MAP-Kinasen konnte jedoch mit der Andockfurche (docking groove) eine Domänen-Struktur beschrieben werden, die diese Voraussetzungen erfüllt. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Beispielen liegt diese auf der gegenüberliegenden Seite des Moleküls, weit außerhalb des aktiven Zentrums. Die Bindungen, die über die Andockfurche gebildet werden, unterscheiden sich von den transienten Enzym-Substrat-Interaktionen durch das aktive Zentrum der Enzyme und werden Andock-Interaktionen (docking interactions) genannt [308]. Die Andockfurche wird bei MAP-Kinasen aus der CD- und der ED-Domäne, sowie umliegenden

AS-Resten gebildet. Beide Dömänen wurden über Studien am ERK2 der Ratte und humanem p38 beschrieben. Die gut charakterisierte CD-Domäne (**common docking domain**) folgt im C-Terminus der MAP-Kinasen direkt auf die Kinase-Domäne und besteht aus 2-3 negativ geladenen Aminosäuren deren Sequenz zwischen den verschiedenen MAP-Kinasen variiert [309, 308]. Für ERK1 und ERK2 der Ratte wurde die Sequenz DXXD beschrieben. Beinahe alle Proteine die mit MAP-Kinasen interagieren, besitzen ein konserviertes Motiv, das aus positiv geladenen Aminosäuren besteht, die von hydrophoben Resten umgeben sind (MAP-Kinase docking site). Da daraus resultierend sehr viele Faktoren mit der CD-Domäne interagieren können, ist diese für die Bindung der Faktoren von Bedeutung, jedoch nicht für die Spezifität der Bindung [309]. Die Spezifität wird durch die ED-Domäne erzielt, die in der linearen AS-Sequenz innerhalb der Kinasedomäne liegt, im dreidimensional gefalteten Protein jedoch gemeinsam mit der CD-Domäne auf der gegenüberliegenden Seite des aktiven Zentrums der Kinase die Andockfurche bildet. Die ED-Domäne ist bisher wenig beschrieben. Für Ratten-ERK2 konnte jedoch gezeigt werden, dass es nach einem Austausch der ERK2-spezifischen Reste TT in die p38-spezifischen Reste ED in der Lage war, einen p38-spezifischen Faktor (3pk) zu binden [308].

Die Regulation der Signalübertragung erfolgt über zwei Mechanismen: den Interaktionen während des Andockens (docking interactions) und der Bildung von Proteinkomplexen über gerüstbildende Faktoren (scaffolding). Während die docking-Interaktion über die CD-Domäne (common docking domain) der MAP-Kinase erreicht wird, wird beim Scaffolding gewöhnlich ein drittes Molekül genutzt um verschiedene Komponenten der MAP-Kinase-Kaskade aneinander zu binden. Die gemeinsame Verwendung beider Mechanismen ermöglicht die Regulation der enzymatischen Spezifität und Effizienz und schließt auch die Beobachtungen mit ein, dass sehr viele verschiedene Signale zu einer Aktivierung von ERK1/2 führen können und aktives ERK1/2 eine Vielzahl an Substraten phosphorylieren kann [309].

## 2.12 Ziele dieser Arbeit

Da parasitäre Helminthen, wie der Fuchsbandwurm, in direktem Kontakt mit dem endokrinen System des Wirts leben und die Faktoren dieser Systeme evolutionär konserviert sind, wurde die Theorie aufgestellt, dass Wirt und Parasit unter Verwendung dieser Systeme miteinander kommunizieren können. Für *E. multilocularis* waren cDNA-Sequenzen eines EGF-Rezeptor-, Insulin-Rezeptor- und TGF $\beta$ -Rezeptor-Homologs identifiziert, die für eine solche Kreuz-Kommunikation in Frage kommen könnten.

Da in Säugersystemen die intrazelluläre Signalübertragung sowohl beim Insulin-Rezeptor als auch beim EGF-Rezeptor über eine ERK/MAP-Kinase-Kaskade erfolgt, sollten in dieser Arbeit Komponenten einer ERK-Kaskade für *E. multilocularis* identifiziert, charakterisiert und funktionell analysiert werden. Da für diese Signalsysteme in Säugern eine entscheidende Beteiligung an Entwicklungsprozessen beschrieben ist, bietet die Charakterisierung dieser Faktoren in *E. multilocularis* neue Ansätze für Chemotherapeutika.

Zusätzlich sollten Methoden etabliert werden, über die ein Einfluß von Wirtszytokinen, Chemotherapeutika oder Inhibitoren auf den Parasiten gemessen werden kann.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 EmER

EmER ist ein 174,5 kDa großes EGF-Rezeptor-Homolog aus *E. multilocularis*, das als single-copy-Gen vorliegt. Die mRNA von EmER ist in den zwei Larvenstadien Metacestode und Protoscolex nachweisbar und wird im Protoscolex etwa 10x stärker exprimiert als im Metacestoden. Mit EmER wurde das erste EGF-Rezeptor-Homolog eines Cestoden beschrieben.

Die Charakterisierung des EGF-Rezeptor-Homologs EmER wurde gemeinsam mit A. Kroner durchgeführt, die im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation die Sequenzierung der cDNA sowie des genomischen Locus von *emer* übernahm und die erhaltenen Daten analysierte. Auf Grund der hoch konservierten Domänenstruktur und der Anwesenheit funktionell relevanter Aminosäurereste konnte EmER eindeutig als ein EGF-Rezeptor-Ortholog humaner EGF-Rezeptoren eingeordnet werden (Abb. 123 und 124, Seite 179 ff.). Eine ausführliche Diskussion der Sequenzanalysen findet sich A. Kroners Promotionsschrift [183].

Die für die Charakterisierung von EmER angewandten Methoden und die verwendeten Oligonucleotide sowie die identifizierten Sequenzen des chromosomalen Locus, der cDNA und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich in Kapitel 5.14.

#### 3.1.1 *emer* - molekularbiologische Charakterisierung des chromosomalen Locus

In dieser Arbeit wurde mittels Southern-Blot-Analysen wurde überprüft, ob *emer* Teil einer Multigen-Familie ist. Mit einer Sonde, die gegen Teile der Tyrosinkinase-Domäne gerichtet war, konnten auf mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdauter chromosomaler DNA von *E. multilocularis*, multiple Hybridisierungsbanden detektiert werden. Diese Banden ergaben sich vermutlich aus Kreuzhybridisierungen der Sonde mit anderen Tyrosinkinase codierenden Genen des Parasiten.

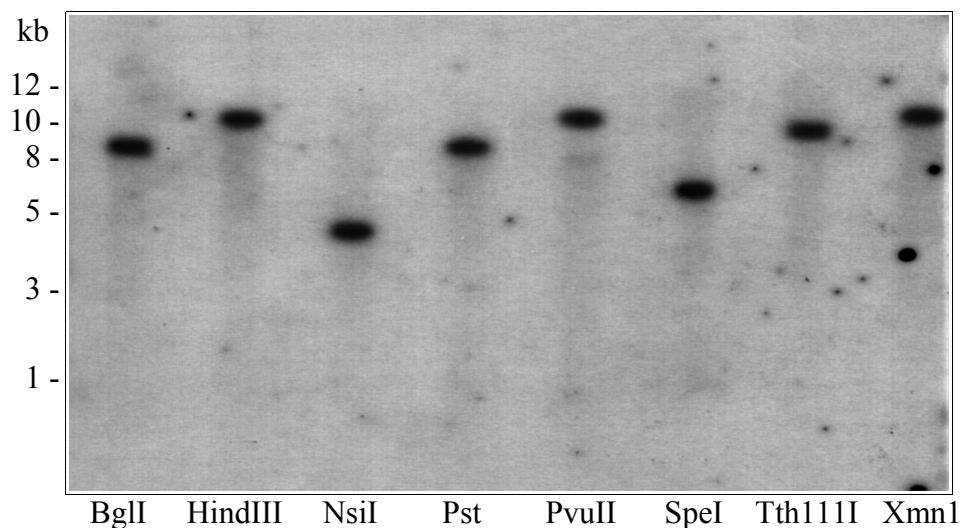


Abb. 4: *emer* - Southern Hybridisierungen.

Chromosomale DNA von *E. multilocularis* wurde mit 8 verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, in einem 0.8 % Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Membran wurde dann mit einer Sonde gegen *emer* untersucht. Der Blot wurde 48 h auf einen Röntgenfilm gelegt. Links ist der Größenmarker angegeben.

Daher wurde eine neue Sonde hergestellt (chromosomaler Locus, Exons 1 - 4, bp 1 - 880), die teilweise in der extrazellulären Ligandenbindungsstelle hybridisiert. Die Ligandenbindungsstelle wurde gewählt weil diese Region in der Genfamilie, die die verschiedenen EGF-Rezeptoren in

Säugetieren codiert, hoch konserviert ist. Die Sonde wurde aus chromosomaler DNA mit den Oligonucleotiden EGR5'4 und EGR-Tup1 amplifiziert (chrDNA, bp 1 – 880), umfasst die Exons 1 – 4 und sollte multiple Hybridisierungsbanden produzieren wenn *emer* Teil einer Genfamilie ist. Dafür wurde chromosomale *E. multilocularis* DNA mit den folgenden Restriktionsenzymen verdaut: NsiI, PstI, SpeI (Schnittstellen im Intron 4), HindIII, PvuII, TthIII1, XmnI (Schnittstellen im Intron 5) und BglII (Schnittstelle im Intron 6). Wie in Abb. 4 zu sehen ist, wurde von der Sonde in jedem der acht verschiedenen Verdaue nach der Hybridisierung nur ein einziges Fragment erkannt, was darauf hin deutet dass *emer* im Fuchsbandwurm als single-copy Gen vorliegt. Das stimmt mit der Situation in anderen Organismen überein. Während Säugetiere verschiedene Paraloge des EGF-Rezeptors exprimieren, haben Nicht-Vertebraten gewöhnlich nur ein Ortholog, wie es schon für *D. melanogaster* und *C. elegans* gezeigt wurde [215].

### 3.1.2 *emer* - Echinokokkenspezifität

Da die ursprüngliche *emer*-cDNA aus in Labortieren kultiviertem Parasitenmaterial isoliert wurde, bestand die Möglichkeit, dass das Gen nicht von *E. multilocularis* stammt sondern ein bisher unbekanntes Säugetier EGF-Rezeptor-Homolog ist. Um die genaue Herkunft zu bestimmen wurde chromosomale DNA aus der Leber eines nicht infizierten Gerbils und aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskizeln isoliert und über genspezifische PCRs getestet (Abb. 5). Dabei ergaben die Primer Tub12-UP und Tub12-ST, die gegen ein von uns identifiziertes  $\beta$ -tubulin des Gerbils [46] gerichtet sind, nur ein starkes Signal auf chromosomale DNA des Gerbils und keines auf die chromosomale DNA von Echinokokken. Zwei verschiedene Primerkombinationen, die den intrazellulären (ER-dw7  $\times$  ER-3') bzw. den extrazellulären Teil (ER5'4  $\times$  ER-Tup1) von *emer* erkennen, führen dagegen nur bei Echinokokken-DNA zu positiven Signalen. Diese Daten zeigen das *emer* ein Echinokokken-Faktor ist.

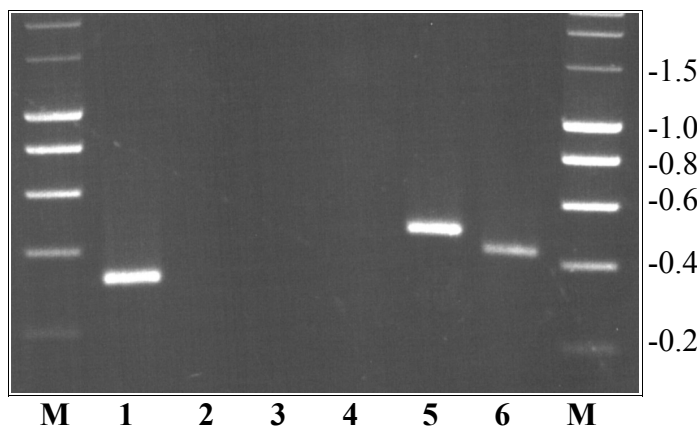


Abb. 5: Nachweis der Echinokokkenspezifität von *emer* über PCR.

Chromosomale DNA aus der Leber eines uninfizierten Gerbils (Spuren 1-3) und aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskizeln von *E. multilocularis* (Spuren 4-6) wurde als Template für eine PCR eingesetzt. Verschiedene Primer wurden für das wirtsspezifische  $\beta$ -tubulin (Spuren 1 und 4), die Ligandenbindungsdomäne von *emer* (Spuren 2 und 5) und die Tyrosin-Kinase-Domäne von *emer* (Spuren 3 und 6) verwendet. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größenmarker ist rechts in kb angegeben.

### 3.1.3 *emer* - Expression in verschiedenen Larvenstadien

Um zu überprüfen, ob *emer* während der Infektion des Wirts exprimiert wird, wurden Northern-Blot- Experimente durchgeführt. Dafür wurde aus Larvenmaterial des Isolates H95, das nach einer Kultivierung in Rennmäusen die zwei Entwicklungsstadien Metacestode und Protoscolex enthielt, RNA isoliert. Für die Hybridisierung wurden zwei verschiedene Sonden aus cDNA amplifiziert, wobei die eine in der Ligandenbindungs-Domäne und die andere in der Tyrosinkinase-Domäne bindet. Abb. 6 zeigt für beide Sonden nach der Hybridisierung eine einzelne Bande bei 5.2 kb, was auf eine Expression von *emer* während des Wachstums und der Entwicklung der *E. multilocularis* Larve im Zwischenwirt hinweist.

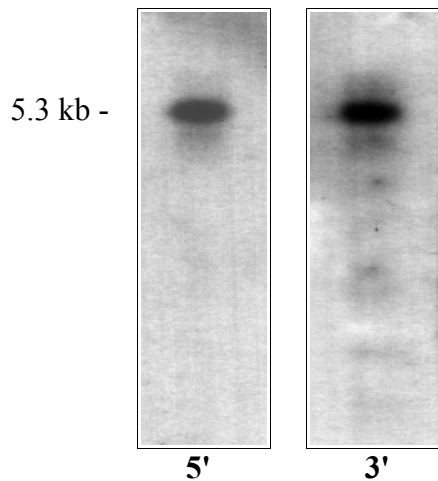


Abb. 6: Expression von *emer* in verschiedenen Larvenstadien: Northern-Blot.

Gesamt-RNA wurde aus *E. multilocularis*-Larven (in Rennmäusen unter Laborbedingungen *in vivo* kultiviert) isoliert, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit einer [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Sonde unter hoch-stringenten Bedingungen markiert. Die Sonden waren gegen Regionen im 5'- und 3'-Bereich der *emer*-RNA gerichtet. Die Expositionszeit betrug 48 Std. Die Fragmentgröße ist links in kb angegeben.

Für den Nachweis einer möglichen stadienspezifischen Expression von *emer* in verschiedenen Larvenstadien wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Als Template wurde RNA verwendet, die entweder aus *in vitro* kultiviertem Metacestodenmaterial, das frei von Brutkapseln war, oder aus manuell gepickten Protoscolices, die frei von Metacestodenmaterial waren, isoliert wurde. Wie in Abb. 215 zu sehen ist ergeben Primer, die gegen das konstitutiv exprimierte *elp* [47] gerichtet sind, in beiden Präparationen Fragmente mit vergleichbarer Intensität. Nimmt man Primer gegen die 3'- und 5'-Region der *emer* cDNA erhält man Banden der erwarteten Größe für beide Larvenstadien, jedoch ein signifikant stärkeres in der Protoscolexpräparation. Um diesen stadienspezifischen Expressionsunterschied von *emer* zu verifizieren, wurden kompetitive PCRs gemacht. Wie aus Abb. 8 und Abb. 9A zu sehen ist, sind 10 mal mehr *emer*-Transkripte in den Protoscolex-mRNAs als in den mRNA-Fractionen des Metacestodenstadiums.

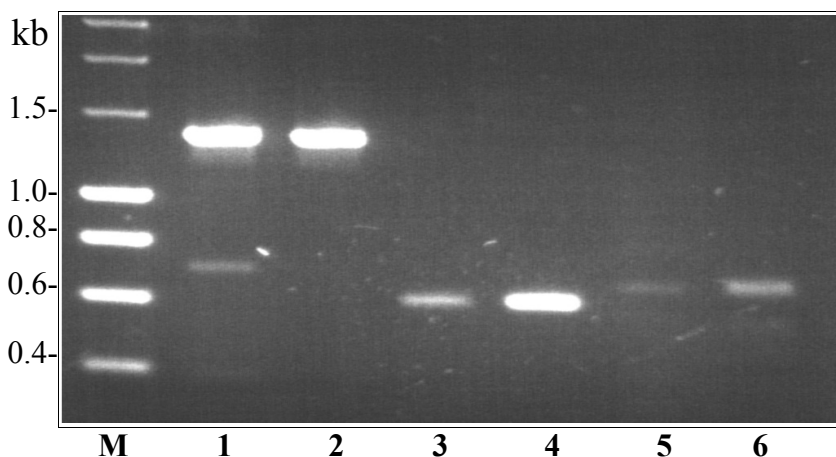


Abb. 7: Expression von *emer* in verschiedenen Larvenstadien: RT-PCR

Gesamt-RNA wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln (Spuren 1, 3 und 5) und *in vitro* kultivierten Protoscolices (Spuren 2, 4 und 6) isoliert. Die RT-PCR wurde dann für das in *E. multilocularis* konstitutiv exprimierte Gen *elp* (Spuren 1 + 2) sowie für die Tyrosin-Kinase-Domäne (Spuren 3 + 4) und die Ligandenbindungsdomäne (Spuren 5 + 6) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1.5% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größenmarker ist links angegeben.

Da wir schon zeigen konnten, dass in Metacestodeneskellen in Gegenwart von Wirtszellen die Expression von *egfd*, das für ein *Echinococcus* EGF Homolog codiert, hochreguliert wird [47], waren wir interessiert, ob das auch für *emer* der Fall ist. Dafür wurden Metacestodeneskel *in vitro* mit und ohne Wirtshepatozyten kultiviert und über kompetitive PCR analysiert. Wie in Abb 9B zu sehen ist, konnte nur die deutliche Hochregulierung von *egfd* reproduziert werden. Für die Expression von *emer* konnte unter diesen Bedingungen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

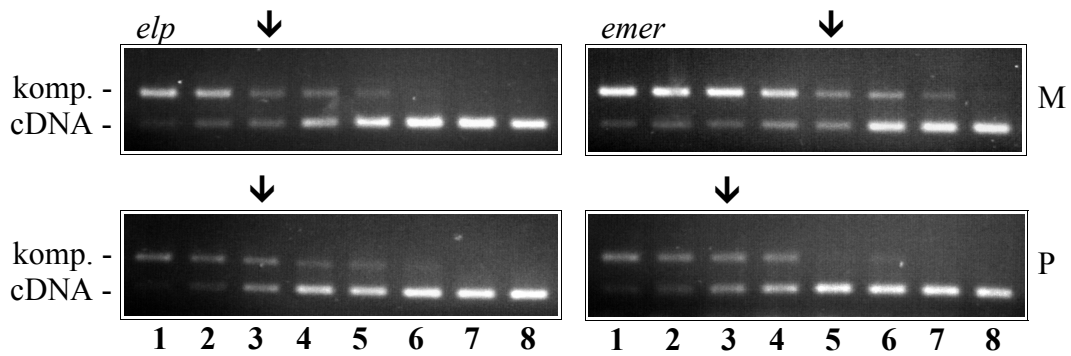
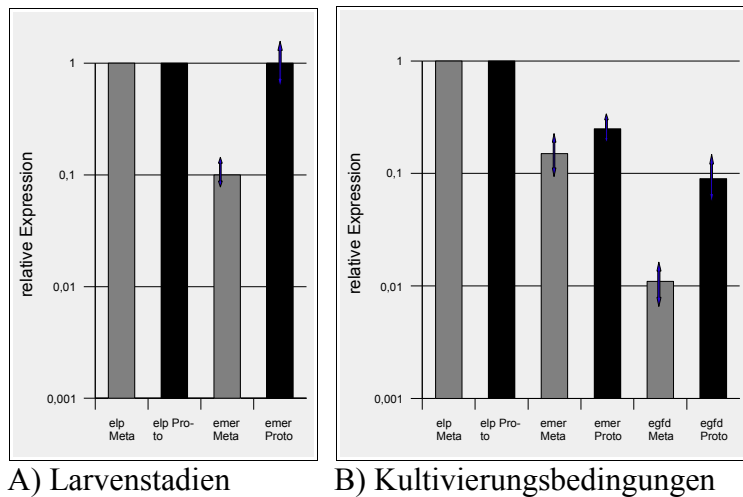


Abb. 8: Expression von *emer* in verschiedenen Larvenstadien: kompetitive PCR

Beispielsergebnisse der kompetitiven PCR. Mit cDNA-Präparationen aus Metacystode (M) und Protocolex (P) wurden kompetitive PCRs für das konstitutiv exprimierte *elp* [47] und für *emer* gemacht. Die Fragmente wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Gezeigt ist eine Serie fortlaufender 1 zu 3 Verdünnungen der Kompetitormoleküle. Die Pfeile (↓) zeigen an, bei welcher Verdünnung die Molarität zwischen Kompetitor (komp.) und der cDNA gleich ist. Die Anzahl an Kompetitormolekülen pro Verdünnung war:  $1 \times 10^7$  (1),  $3 \times 10^6$  (2),  $1 \times 10^6$  (3),  $4 \times 10^5$  (4),  $1 \times 10^5$  (5),  $4 \times 10^4$  (6),  $1 \times 10^4$  (7) und  $4 \times 10^3$  (8).



A) Larvenstadien

B) Kultivierungsbedingungen

Abb. 9: kompetitive PCR

**A)** Schematische Darstellung der Ergebnisse der kompetitiven PCRs für die *elp*- und *emer*-Expression in den zwei Larvenstadien Metacystode (grauer Balken) und Protocolex (schwarzer Balken), wobei hier die relative Expression gezeigt ist (Die Werte von *elp* wurden auf 1 gesetzt). Für jedes Gen wurde eine Folge von 10-fach, 5-fach und 3-fach-Verdünnungen des Kompetitors eingesetzt und drei verschiedene cDNA-Präparationen getestet. Die Standardabweichung ist über den Balken eingezeichnet. **B)** Schematische Darstellung der Ergebnisse der kompetitiven PCRs für die *elp*-, *egfd*- und *emer*-Expression in Metacystodenesikeln, die in Anwesenheit (grauer Balken) oder Abwesenheit (schwarzer Balken) von Hepatocyten kultiviert wurden (Die Werte von *elp* wurden auf 1 gesetzt). Für jedes Gen wurde eine Folge von 10-fach, 5-fach und 3-fach-Verdünnungen des Kompetitors eingesetzt und drei verschiedene cDNA-Präparationen getestet. Die Standardabweichung ist über den Balken eingezeichnet.

## 3.2 EmRas

EmRas ist eine 21 kDa große farnesylierte GTPase aus *E. multilocularis*, die mit über 70% identischen Aminosäureresten eine sehr hohe Homologie zu Ras-Proteinen aus Säugern hat und die in rekombinant exprimierter Form GTP binden kann. EmRas kann funktionell Ras2 in Hefen ersetzen, interagiert in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten mit EmRaf, wird in den zwei Larvenstadien Metacestode und Protoscolex exprimiert und kann mit kommerziellen Antikörpern sowohl als rekombinant sowie als nativ exprimiertes Protein im Western-Blot sowie als natives Protein in Echinokokken-Gefrierschnitten nachgewiesen werden.

Die für die Charakterisierung von EmRas angewandten Methoden und die verwendeten Oligonucleotide sowie die identifizierten Sequenzen des chromosomalen Locus, der cDNA und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich in Kapitel 5.21.

### 3.2.1 *emras* - cDNA und genomischer Locus

Die *emras*-cDNA wurde über eine degenerative PCR und eine anschließende 3'- sowie 5'-RACE aus einer cDNA-Bank des Larvenstadiums von *E. multilocularis* isoliert. Es konnten keine Hinweise erlangt werden, dass EmRas über trans-gespleisste Transkripte exprimiert wird. Die cDNA ist 632 bp lang und enthält ein einziges offenes Leseraster das für das kleine GTP-bindende Protein EmRas (184 AS, 21 kDa) codiert (Abb. 10). Ein Aminosäure-Sequenzvergleich zeigte, dass EmRas bis auf den, unter den einzelnen Ras-GTPasen heterologen C-Terminus, über die gesamte Länge hohe Homologien zu Ras-GTPasen verschiedenen phylogenetischen Ursprungs besitzt (Abb. 11). Die mit 80% höchste Homologie besteht zu einer in *S. mansoni* beschriebenen Ras-GTPase [171, 237, 282], während EmRas mit Ras-Homologen von Nematoden, Insekten und Säugtieren zwischen 74% und 78% übereinstimmt (Abb. 11).

Intron 1 (37 bp): ↓ GTAATA...GCTTAG		
ATAATAGGGTACCATTGTACTAAACAAAATGCCTGAGTACAAACTCGTTGTTGTCGGAGCTGGTGGAGTCGGAAAGAGTGCCTGACGATCCAGCTTATC	100	
M P E Y <b>K L V V V G A G G V G K S A L T I Q L I</b>	24	
<b>G-1 (GTP-Bindung)</b>		
Intron 2 (39 bp): ↓ GTAAGA...AAACAG    Intron 3 (35bp): GTGAGT...TTGCAG		
CAGAATCATTTTGTAGATGAGTACGCCAACCGATTGAGGATTCCTATAGGAAGCAAGTAAATATTGATGGGGAGACTTGCATGCTTGATATTCTGGATA	200	
Q N H F V D E <b>Y Y D P T I E D S Y R K Q V N I D G E T C M L D I L D</b>	57	
<b>G-2 (Effektordomäne)</b>		
Intron 4 (43 bp): ↓ GTATGT...TTTCAG		
CGGCTGGTCAAGAAGAGTACAGCGCCATGCGTGACCAATATATGCGAACTGGCGAGGGCTTCTCTGTGTTATTTGCTGTTAATAACGCCAAAAGCTTTGA	300	
<b>T A G Q E E Y S A M R D Q Y M R T G E G F L C V F A V N N A K S F E</b>	91	
AGACATTAGTCAATACCGGAACAGATTAACGGGTCAAAGACGCAGATGAGGTGCCCATGGTTTTAATTGGGAACAAGGTAGACCTTCAGTCAGATCA	400	
D I S Q Y R E Q I K R V K D A D E V P M <b>V L I G N K V D L A V R S</b>	124	
<b>G-4</b>		
GTGATTTCTACAAAGGCTGAGGCCGTTGCTAAGGCGTACAACATTCCTACATTGAAACATCTGCTAAAACCCGTC AAGGTGTTGAGGACGCATTTTCA	500	
V D S T K A E A V A K A Y N I <b>P Y I E T S A K T R Q G V E D A F F</b>	157	
<b>G-5</b>		
CTCTTGTTCGAGAAATCCGCAAATTTAAGGAAAGGGGAAACGAGAAGAAAAGCGCGGCAAGAGGAAATGCCATCTGCTGTAGTGTGGGTGCGATTACAT	600	
<b>T L V R E I R K F K E R G N E K K K R G K R K C H L L .</b>	184	
<b>Prenylierung</b>		
TGACAAACTGTGCCACGGTGGAGTGACAGACA	632	

Abb. 10: cDNA-Sequenz, abgeleitete Aminosäuresequenz und Struktur des genomischen Locus von *emras*.

Gezeigt ist die gesamte cDNA-Sequenz (oben) von *emras* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des EmRas-Proteins (unten, fett). Ein Punkt am Ende der Aminosäuresequenz markiert das Stop-Codon. Die Positionen der bisher bekannten Introns des genomischen Locus sind mit Pfeilen markiert. Für jedes Intron ist die Größe sowie die Sequenz des 5'-Donors und des 3'-Akzeptors angegeben. Die Regionen G1 – G5, die von funktioneller Wichtigkeit für Ras-ähnliche GTPasen sind, sind ebenso grau unterlegt wie das Bindungsmotiv für die Prenylierung am 3'-Terminus. Start- und Stop-Codon sind unterstrichen.

Mit Primern aus der cDNA-Sequenz und chromosomaler Echinokokken-DNA als Template konnten im 5'-Bereich 676 bp des chromosomalen Locus von *emras* bestimmt werden. Die auf cDNA-Ebene bis zu bp 492 bestätigte chromosomale Sequenz enthält 4 kleine Introns mit Längen von 35 bis 43 bp, die alle an ihren Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen die kanonischen Dinucleotid-

Sequenzen GT und AG enthalten (Abb. 10). Ab Basenpaar 492 wurden keine Amplifikationsprodukte erhalten, was dafür spricht, dass in diesem Bereich sehr große Introns zu erwarten sind.

Zwischen allen kleinen GTP-bindenden Proteinen gibt es 5 funktionell wichtige, hoch konservierte Sequenzabschnitte, die Region I (G1), eine ATP/GTP-Bindungsdomäne mit der Konsensussequenz GXXXXGK (X steht für alle AS), die die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphate von GTP oder GDP bindet, die Effektordomäne (G2), die ihre Konformation nach der GTP-Bindung ändert und substratspezifisch ist, also keine Konsensussequenz aufweist, die Region II (G3) oder switch II, mit der Sequenz DXXG, in der das  $\gamma$ -Phosphat und das katalytisch  $Mg^{2+}$ -Ion bindet, die Region III (G4) mit der Sequenz NKXD in der der Guanin-Ring bindet und die Region IV (G5) mit der Sequenz EX-SAX, die die GTP/GDP-Bindung stabilisiert [42, 307]. Wie in den Abbildungen 10 und 11 zu sehen ist, sind alle diese Motive auch in EmRas an den vergleichbaren Positionen vorhanden.

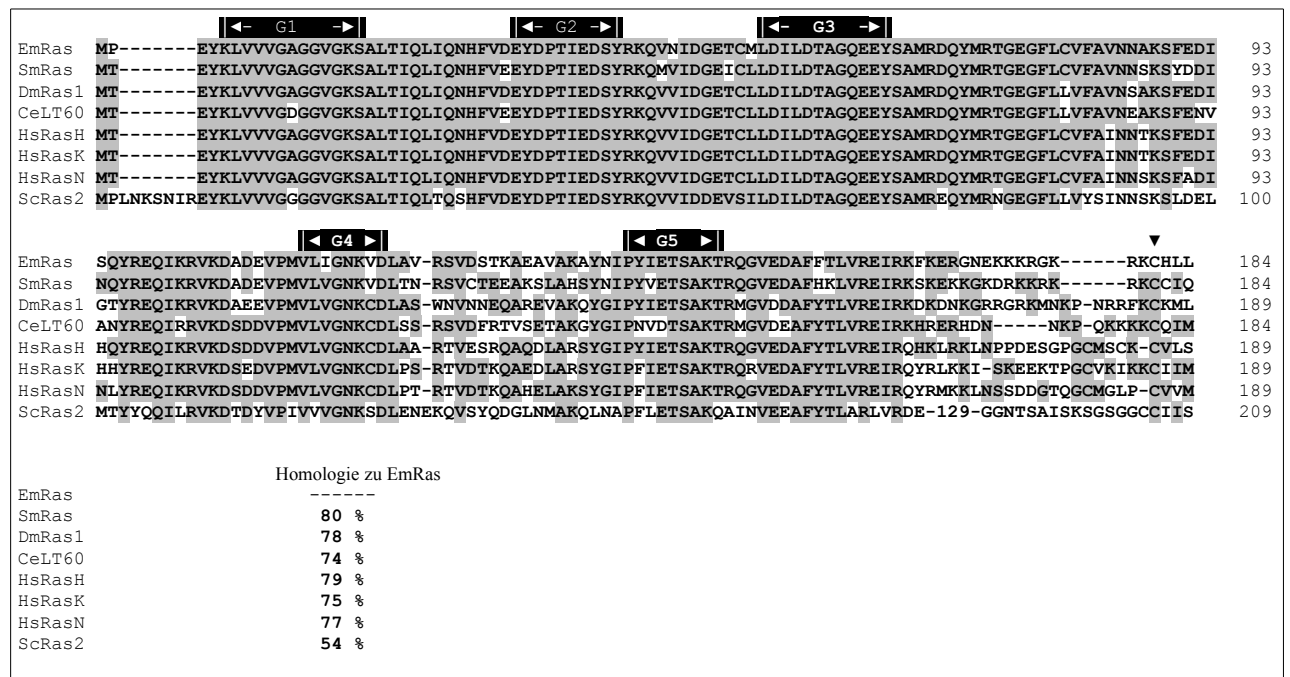


Abb. 11: EmRas – Sequenzhomologien.

Abgebildet ist ein Vergleich von EmRas mit Ras-GTPasen aus Säugetier, Insekt, Trematode, Nematode und Hefe. Die angegebenen Sequenzen beziehen sich auf *S. mansoni* (SmRas; GenBank Accession No. U53177), Ras1 von *D. melanogaster* (DmRas1; AF186648), Let-60 von *C. elegans* (CeLT60; M55535), den humanen Isoformen H-Ras (HsRasH; Q14080), K-Ras (HsRasK; P01116) und N-Ras (HsRasN; X02751) sowie Ras2p von *S. cerevisiae* (ScRas2; X52411). Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz aller 8 Proteine übereinstimmen sind grau unterlegt. Mit weißen Pfeilen auf schwarzem Grund sind die katalytisch wichtigen Regionen G1 – G5 markiert. Ein schwarzes Dreieck (▼) markiert das bei allen Ras-GPAsen konservierte Cystein, das farnesyliert wird. Die Homologien zwischen EmRas und den anderen Ras-Proteinen ist am Ende der Sequenz in Prozent angegeben.



Abb. 12: EmRas - Sequenzhomologien in der Effektordomäne.

Gezeigt ist ein Alignment verschiedener Ras-, Ral- und Rap-Proteine von *E. multilocularis* (Em), *H. sapiens* (Hs) und *D. melanogaster* (Dm). Reste, die mit der EmRas-Sequenz übereinstimmen sind grau unterlegt. Reste, die für GTPasen der Ras-Unterfamilie spezifisch sind, sind mit einem \* markiert.

Kleine GTP-bindende Proteine der Ras-, Rho/Rac/Cdc42- und Rab-Familien haben spezifische C-Termini, die posttranslational mit Lipiden wie Farnesyl oder Geranylgeranyl modifiziert werden [261, 307]. EmRas hat am C-Terminus ein kanonisches Prenyl-Bindungsmotiv (C<sup>183</sup>HLL) und davor einen charakteristischen Abschnitt aus verschiedenen basischen Aminosäuren (K<sup>192</sup>KKRGKR) (Abb. 10 und 11). Bis auf die fehlende aliphatische Aminosäure an Position H<sup>184</sup> entspricht das Prenylbindungsmotiv von EmRas dem von humanem Rap1 [307]. Die switch I -Region (G2), in der die Effektor-Domäne liegt, die im Fall von Ras für die Interaktion mit nachfolgenden Effektoren wie z.B. Raf wichtig ist, kann zur Unterscheidung der einzelnen Unterfamilien der kleinen GTP-bindenden Proteine genutzt werden [205, 178]. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, sind in EmRas 7 AS-Reste, die für Mitglieder der Ras-Unterfamilie charakteristisch sind, identisch mit den vergleichbaren AS-Resten homologer Ras-GTPasen von Säugetieren und Insekten.

### 3.2.2 *emras* - Echinokokkenspezifität

Da die cDNA-Bibliothek, über die *emras* isoliert wurde, aus Parasitenmaterial stammte das in Labortieren (*M. unguiculatus*) kultiviert wurde, musste ausgeschlossen werden, dass *emras* eine bisher unidentifizierte GTPase des Wirts ist. Dafür wurden auf die chromosomale DNA von axenisch *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln des Parasiten *E. multilocularis* und auf die chromosomale DNA, die aus der Leber eines uninfizierten Laborwirts *M. unguiculatus* isoliert wurde, PCRs durchgeführt, wobei *emras*-spezifische PCR-Produkte nur in der Echinokokken-DNA nachgewiesen werden konnten. Auf der anderen Seite konnte das für den Wirt spezifische  $\beta$ -*tubulin* [46] nicht aus Echinokokken-DNA sondern nur aus der chromosomalen DNA von *M. unguiculatus* (Gerbil) amplifiziert werden (Abb: 13). Diese Ergebnisse zeigen, dass *emras* ein Echinokokkengen ist.

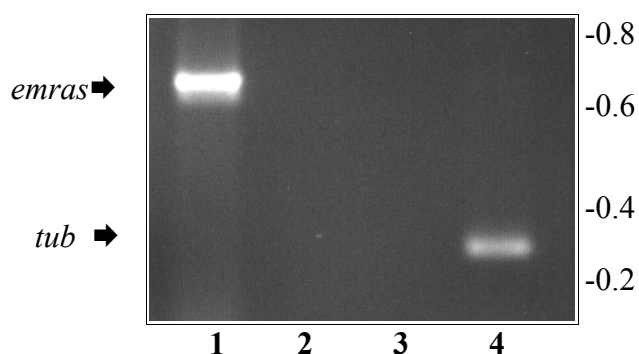


Abb. 13: Nachweis der Echinokokkenspezifität von *emras* über PCR.

Mit chromosomaler DNA aus *in vitro* kultivierten Echinokokken (Spur 1 + 2) und aus dem Gehirn von uninfizierten Rennmäusen (Spur 3 + 4) als Template wurden PCRs gegen *emras* (Spur 1 + 3) und das wirtsspezifische  $\beta$ -*tubulin* (Spur 2 + 4) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größenmarker ist rechts in kb angegeben.

### 3.2.3 *emras* - Expression in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*

In verschiedenen Versuchsansätzen wurde über RT-PCR die Expression von *emras* aus *in vivo* und *in vitro* kultivierten *E. multilocularis*-Larven untersucht. Zuerst wurde RNA aus Gesamtlarvenmaterial von infizierten Laborwirten (*M. unguiculatus*) isoliert. Wie in Abb. 14 zu sehen ist, konnte die Expression der korrekt gespleißten mRNA in drei verschiedenen natürlichen und klinischen Isolaten (H95, Süddeutschland; K188, Südösterreich; MP1, Patientenisolat aus Süddeutschland) unterschiedlicher geographischer Herkunft nachgewiesen werden. Da *in vivo* gewachsenes *E. multilocularis*-Parasitenmaterial aus zwei verschiedenen Entwicklungsstadien, nämlich dem Metacestoden und dem Protoscolex, besteht, stellte sich die Frage, ob *emras* in beiden Stadien exprimiert wird. Dafür wurde RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln und aus frisch isolierten Protoscolices (aus *in vivo* kultiviertem Material) isoliert. Abb. 14 zeigt deutlich die Expression von *emras* in beiden Larvenstadien.

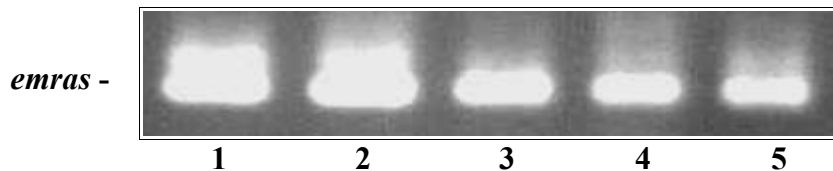


Abb. 14: Expression von *emras* in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Gesamt-RNA wurde aus dem Larvenmaterial der drei Echinokokken-Isolate K188 (Spur 1), H95 (Spur 2) und MPI (Spur 3) nach Kultivierung in Labortieren, oder aus *in vitro* kultivierten Metacystodensvesikeln (Spur 4) und Protoscolices (Spur 5). Nach einer genspezifischen RT-PCR wurden die PCR-Produkte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### 3.2.4 EmRas - Nachweis in verschiedenen *E. multilocularis* Larvenstadien

Für den Expressions-Nachweis von EmRas in verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten wurde ein kommerzieller Antikörper (Kaninchen-antiRas; Stressgen) verwendet, der gegen ein Peptid gerichtet ist, das unter den Ras-Proteinen unterschiedlichen phylogenetischen Ursprungs hoch konserviert ist. Wie in Abb. 15 zu sehen ist, reagiert der Antikörper mit dem rekombinant exprimierten Thioredoxin-EmRas und mit einem einzigen Protein der Lysate aus *in vitro* kultivierten Metacystoden-Vesikeln und Protoscolices. Für die rekombinante Expression wurde *emras* als 5'-Fusion in den Vektor pBAD/Thiofusion (Invitrogen) kloniert. Die Größe der erkannten natürlichen Proteine entspricht mit 21 kDa genau dem errechneten Molekulargewicht von EmRas. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Antikörper den Echinokokken-Faktor erkennt und das EmRas in beiden Larvenstadien exprimiert wird.

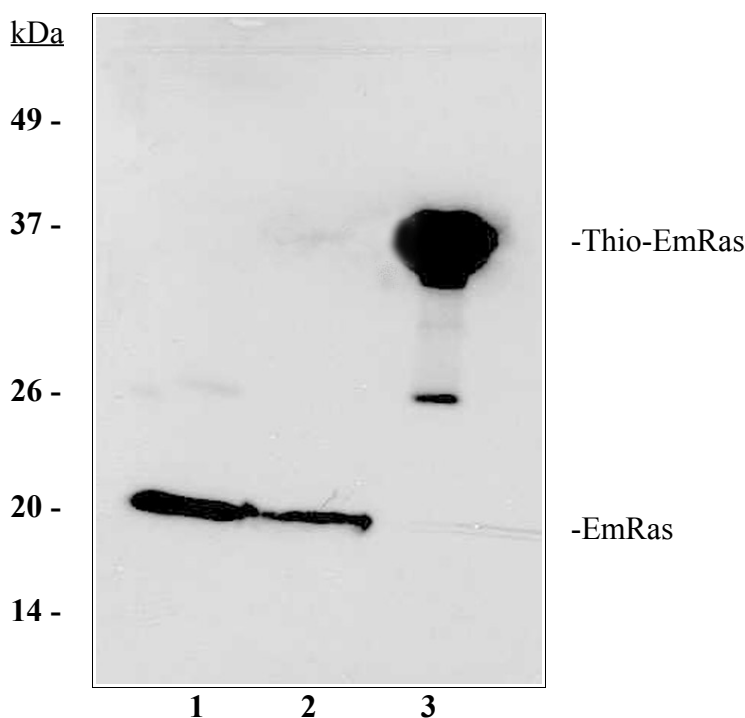


Abb. 15: Nachweis von EmRas über Antikörper im Western-Blot.

Zellysate von *in vitro* kultivierten Metacystodensvesikeln (Spur 1), von Protoscolices (Spur 2) und von *E. coli*, die ein Thioredoxin-EmRas rekombinant exprimieren (Spur 3) wurden in einem 12.5% PAAgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Blots wurden mit dem Erstantikörper anti-Ras (rabbit anti-Ras; Stressgen) und dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper AffiniPure anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research) entwickelt. Links ist der Proteingrößenstandard angegeben.

Um zu überprüfen, in welchen Geweben des Parasiten EmRas exprimiert wird, wurden in Zusammenarbeit mit Dennis Tappe (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg) Immunlokalisations-Studien an *in vivo* gewachsenem Parasitenmaterial durchgeführt. Wie in Abb. 16 gezeigt, wurden Tegument-Strukturen des Protoscolex (Abb. 16 C) sowie die Kalziumkörperchen enthaltende Germinalschicht des Metacystoden (Abb. 16 B,D) deutlich gefärbt. Eine besonders intensive Färbung konnte für die Bereiche um die Saugnäpfe und um das Rostellum der Protoscolices beobachtet werden (Abb. 16 C). Am wahrscheinlichsten als Folge einer Kreuzreaktion des Antikörpers mit wirtseigenem Ras wurde auch das Wirtsgewebe das den Metacystoden umschließt angefärbt. Wie erwartet, wurde weder die zellenlose Laminatschicht noch die Negativ-Kontrolle, bei welcher nur der Zweitantikörper eingesetzt wurde, angefärbt (Abb. 16 A).



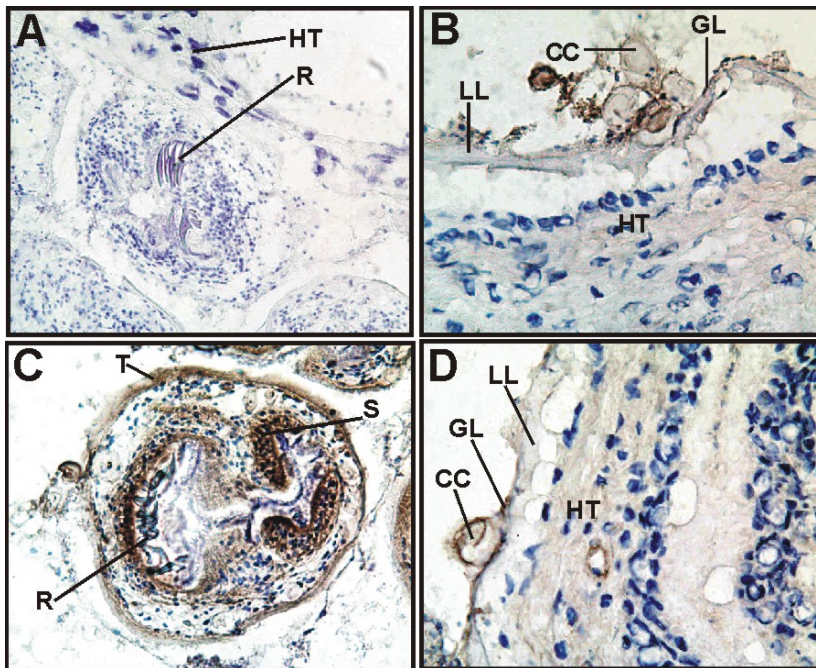


Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis von EmRas in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Aus von infizierten Labortieren (*M. unguiculatus*) isolierten Lebern wurden Gefrierschnitte hergestellt ( $\varnothing$  5 $\mu$ m), mit einem anti-Ras-Antikörper (rabbit anti-Ras; Stressgen) als Erstantikörper inkubiert und mit einem Peroxidase-konjugierten Maus-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Bild B,C,D) oder nur mit dem Zweitantikörper entwickelt (Bild A). Die Pfeile zeigen folgende Strukturen: CC - Kalziumkörperchen, GL - Schicht aus Germinalzellen des Metacestoden, LL - nichtzelluläre Laminatschicht des Metacestoden, S - Saugnäpfe des Protoscolex, T - Tegument, HT - Wirtsgewebe, R - Hakenkranz des Protoscolex (Rostellum).

### 3.2.5 EmRas bindet GTP

Basierend auf der Sequenzanalyse und den daraus resultierenden hohen Homologien der Domänen G1 – G5 (Abb. 10 und 11), konnte davon ausgegangen werden, dass EmRas GTP binden kann. Um das experimentell zu bestätigen wurde das *emras* Leseraster als 5'-Fusion in den Vektor pBAD/Thiofusion (Invitrogen) kloniert, in *E. coli* rekombinant exprimiert und mit dem resultierenden Protein dann ein GTP-Bindungsassay durchgeführt [170]. Wie in Abb. 17 zu sehen ist, konnte EmRas erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden und zeigte dazu hin eine deutliche GTP-Bindungsaktivität.

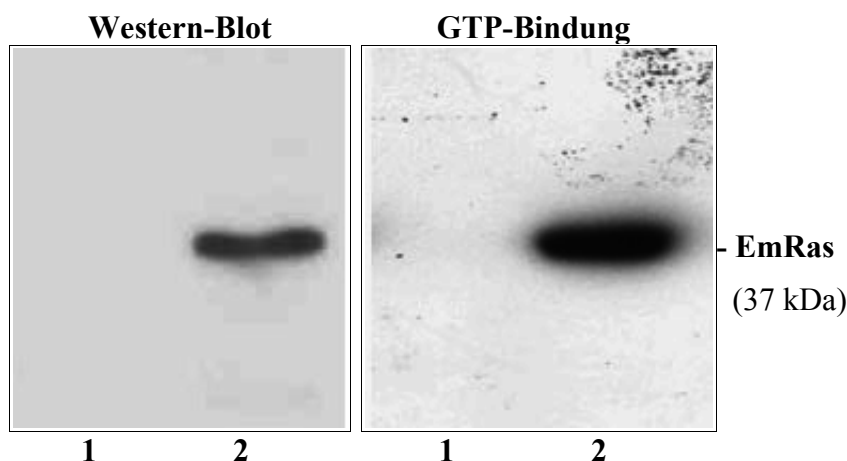


Abb. 17: EmRas: GTP-Bindung

EmRas wurde translationell 5' mit Thioredoxin und 3' mit dem V5-Epitop und einem 6 $\times$ His-Tag fusioniert und rekombinant unter der Kontrolle eines arabinoseinduzierbaren Promotors in *E. coli* exprimiert. Das gesamte Zelllysate wurde vor (Spur 1) und nach (Spur 2) der Induktion der Expression in einem 12.5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblotet. Im linken Blot (Western) wurde das rekombinante Protein mit dem anti-V5-Antikörper nachgewiesen. Der rechte Blot (GTP-Bindung) wurde mit  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-GTP inkubiert.

### 3.2.6 EmRas ist farnesyliert

Für die Funktion von Ras und Ras-ähnlichen kleinen GTP-bindenden Proteine ist eine Verankerung in zellulären Membranen über kovalent gebundene lipophile Prenylgruppen essentiell [261, 307]. Wie in Abb. 11 zu sehen ist, hat EmRas am C-Terminus ein kanonisches Prenylgruppen-Bindungsmotiv (C<sup>183</sup>HLL) und davor einen charakteristischen Abschnitt basischer Aminosäuren. Dieses Prenylgruppen-Bindungsmotiv kann entweder durch das Anhängen von Farnesyl oder von Geranylgeranyl modifiziert werden. Um heraus zu finden, welche dieser Prenylgruppen posttranskriptionell an EmRas gebunden wird, wurden *in vitro* Prenylierungsexperimente durchgeführt [237, 322]. Dafür wurde EmRas rekombinant als C-terminale Fusion mit Thioredoxin in *E. coli* exprimiert, mit einem anti-Thioredoxin-Antikörper immunpräzipitiert und anschließend in der Gegenwart von [<sup>3</sup>H] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat in Kaninchen-Reticulocytensextrakt oder Echinokokkenlysate inkubiert. Wie in Abb. 18 zu sehen ist, wird EmRas unter beiden Bedingungen farnesyliert nicht jedoch geranylgeranyliert. In Abb. 39 ist eine Zusammenstellung der Prenylierungsexperimente aller hier charakterisierten GTPasen von *E. multilocularis* gezeigt.

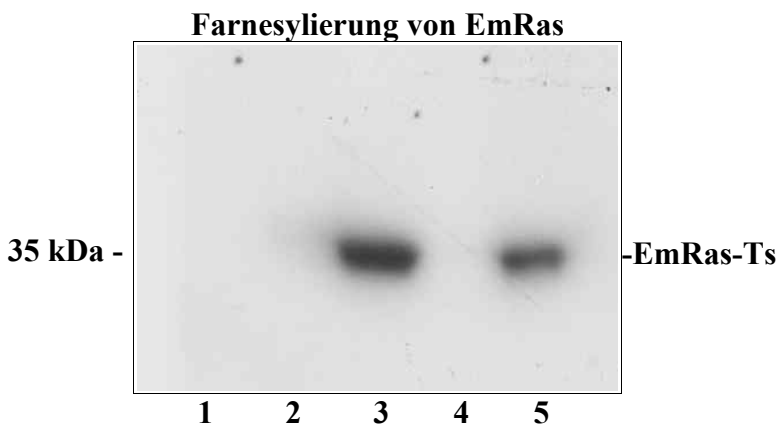


Abb. 18: EmRas – Farnesylierung.

EmRas wurde translationell am 5'-Ende mit Thioredoxin fusioniert, in *E. coli* rekombinant exprimiert und mit einem anti-Thioredoxin-Antikörper immunpräzipitiert. Das präzipitierte Protein wurde dann mit Kaninchen-Reticulocytensextrakt (Spuren 2 und 3) und in Echinokokkenlysate (Spuren 4 und 5) in der Gegenwart von [<sup>3</sup>H]-Geranylgeranyl-Pyrophosphat (Spuren 2 und 4) und [<sup>3</sup>H]-Farnesyl-Pyrophosphat (Spuren 3 und 5) inkubiert. Die Reaktionen wurden auf einem 15% PAA-Gel aufgetrennt und dann die Prenylierung über Autoradiographie gemessen.

### 3.2.7 *emras* - Funktionelle Komplementation einer Hefen-Ras2-Mutante

Das invasive Wachstum der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* steht unter der Kontrolle des Ras2 Gens. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt signifikante Homologien zu EmRas (Abb. 11). In Hefen induziert Ras2p das invasive Wachstum durch die Aktivierung der cAMP-abhängige Protein-Kinase (A Kinase) und der MAP-Kinase-Kaskade. Das Protein, dass nach einer Interaktion mit Ras2p die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert (in Hefen werden keine Raf-ähnlichen Faktoren exprimiert) ist noch nicht beschrieben [217]. Bisher konnte aber gezeigt werden, dass an der Stimulierung des A Kinase-Signalwegs die Aktivierung der Hefen-Adenylat-Cyclase (Cyr1p) durch Ras2p beteiligt ist, und zwar nach einer direkten Interaktion beider Proteine [217]. Um zu überprüfen, ob EmRas diese Signalwege auch aktivieren kann wurden in Kooperation mit S. Brückner und H.-U. Mösch (Phillips-Universität, Marburg) mit dem Ras2-mutierten Hefestamm YHUM120 funktionelle Komplementierungs-Versuche durchgeführt. Dafür wurde das wildtypische Ras2p (ScRAS2), ein dominant aktives Ras2p (ScRAS<sup>Val19</sup>) und das EmRas unter der Kontrolle eines Galactosidase-induzierbaren Promotors (GAL-EmRas) in dem Hefestamm YHUM120 exprimiert und in einem invasiven Wachstumsassay [217] getestet. Wie in Abb. 19 zu sehen ist, induzierte EmRas in Hefen nur nach der Zugabe von Galactose invasives Wachstum, während kein invasives Wachstum unter den galaktosefreien Bedingungen und in Hefemutanten, die einen Kontrollvektor enthielten, beobachtet werden konnte.

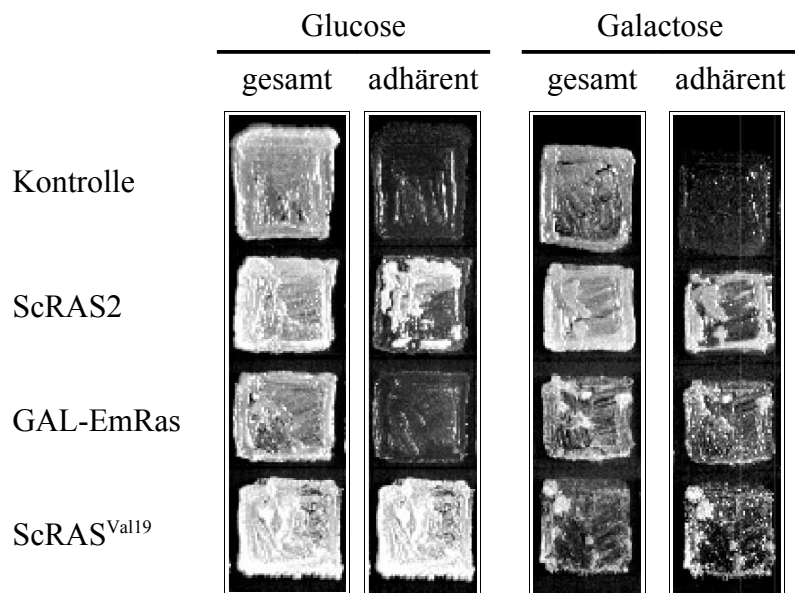


Abb. 19: Funktionelle Komplementation des *S. cerevisiae* RAS2 durch EmRas von *E. multilocularis*.

Der *ras2Δ* mutierte *S. cerevisiae*-Stamm YHUM120 mit den Plasmiden pRS426-GAL1 (Kontrolle), pRS316-RAS2 (ScRAS2), MS-HUM-EmRas (Gal-EmRas) oder pRS316-RAS2<sup>val19</sup> (ScRAS2<sup>val19</sup>) wuchs auf SC-Ura-Medium mit 2% Glucose (Glucose) oder 0,5% Galactose und 2% Raffinose (Galactose) für 5 Tage. Die Platten wurden vor (gesamt) und nachdem (adhärent) nichtinvasive Zellen abgewaschen wurden fotografiert.

### 3.2.8 EmRas - *in vivo* Interaktionsstudien mit EmRaf über Yeast-2-Hybrid

Über das Yeast-Two-Hybrid-Systeme lassen sich *in vivo* Interaktionen von kleinen GTP-bindenden Proteinen wie Ras mit Raf oder anderen Faktoren untersuchen [203]. Da mit EmRaf ein potentieller Downstreamfaktor von EmRas für *E. multilocularis* charakterisiert wurde, sollten Yeast-Two-Hybrid-Experimente eine Interaktion dieser beiden Faktoren nachweisen. Die Beschreibung und die beobachteten Ergebnisse des durchgeführten Versuchs sind in Kapitel 3.6.5 ausführlich dargestellt (Abb. 45). Für EmRas und EmRaf konnte dabei eine starke Interaktion festgestellt werden.

### 3.3 EmRal

EmRal ist eine 23 kDa große geranylgeranylierte GTPase aus *E. multilocularis*, die mit über 50/70% eine hohe Homologie zu bekannten Ral-Proteinen hat und die in rekombinant exprimierter Form GTP binden kann. Die mRNA von EmRal ist in den zwei Larvenstadien Metacestode und etwas stärker im Protoscolex nachweisbar. In Yeast-Two-Hybrid-Experimenten reagiert EmRal wie erwartet nicht mit EmRaf.

Die für die Charakterisierung von EmRal angewandten Methoden und die verwendeten Oligonucleotide sowie die identifizierten Sequenzen des chromosomalen Locus, der cDNA und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich in Kapitel 5.18.

#### 3.3.1 *emral* - cDNA und genomischer Locus

Über ein Spliced-Leader-Differential-Display (SLDD [47]) konnte ein ~300 bp großes, in Protoscolices und in Metacestodenesikeln konstitutiv exprimiertes, Fragment isoliert werden. Nach einer TA-Klonierung in den Vektor pTOPO-TA ergab die folgende Sequenzierung, dass es für 90 N-terminale Aminosäuren eines kleinen GTP-bindenden Proteins der Ras-Familie codiert (Abb. 84). Die vollständige *emral* cDNA wurde über 3'-RACE und RT-PCR aus Echinokokken-cDNA gewonnen und ist in Abb. 84 dargestellt. Sie besteht ohne poly(A)-Schwanz aus 933 bp, beginnt am 5'-Ende mit dem 36 bp langen *E. multilocularis* Spliced-Leader [44] und enthält ein offenes Leseraster das ein 200 AS langes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 23 kDa codiert. Ein Sequenzvergleich der Proteinsequenz ergab signifikante Homologien zu humanen Ral-GTPasen (Abb. 84), daher wurde das zugehörige Gen *emral* genannt.

CACCGTTAATCGGTCCTTACCTTGCGAGTTTGTATGATGACTCAACAGCAACAACAGCAAACTTTGTTAAGTTGATTGTCGCTGGTGGTGGCGGTGG	100
<b>Spliced Leader</b> M T Q Q Q Q Q N F V K L I V A <b>G V G G V</b>	21
GCAAGAGTGCTCTCACGCTCTACTTTCATGTACAGATGAATTTGTCAAGGACTATGAACCCACACGGGCGGACTCCTACCGAAAGAAGATATCGTTCCGGTAG	200
<b>G K S A L T L Y F M Y D E F V K D Y E P T R A D S Y R K K I S F G S</b>	55
<b>G-1 (GTP-Bindung)</b>	
<b>G-2 (Effektor-Domäne)</b>	
<b>Intron 1 (162 bp):</b> ↓ GTAAAT.....TTGCAG	
TGAGGACGTTCAACTACATATCTCGACACTGCCGGACAAGAAGACTACGCAGGCATTTCGAGATACTTTCTATCGCAATAGTGAGGGATTCTCCTCGTC	300
<b>E D V Q L H I L D T A G Q E D Y A G I R D T F Y R N S E G F L L V</b>	88
<b>G-3</b>	
<b>Intron 2 (2698 bp):</b> ↓ GTGAGT.....GTTTAG	
TTCGATCTCACTGACAGACAGTCGTTCACTTCTTTGGGTGAATTTGTGGATCAGATTTTGCCTGTGAAGCGTTCCGATAGGGTGCCAAATGCTGATCTGCG	400
<b>F D L T D R Q S F T S L G E F V D Q I L R V K R S D R V P M L I C</b>	121
GTAACAAGGTGGACCTGACAGAAAAATCGGAGGGTATCGCAGGAAGAAGCGGAAGATTTCTGTGCAAAATGCCATGTTCCCTACCTCGAGACGTCGGCTAA	500
<b>G N K V D L T E N R R V S Q E E A E D F C R K C H V P Y L E T S A K</b>	155
<b>G-4</b>	
<b>G-5</b>	
<b>Intron 3 (652 bp):</b> ↓ GTACCA.....TTGTAG	
GACCAATACAAATGTCGAAAAGGCCCTTCTCACCCCTCGCCCGAGAGGTTTACCAACTGAAAAGTGGCTCAGAGACAGCAGCACCCGCGGACAGCCGACCC	600
<b>T N T N V E K A F L T L A R E V Y Q L K V A Q R Q Q H Q P G Q P T</b>	188
AAGCAAGGTCACAAAAGAAGAGATGCAAGATTTTGTAAATTTGTCACTTCAGCATTCGAACTTCTATTTCCCAATTGCTTTTGCATCCTATTTCTTC	700
<b>K Q G H K K K R C K I L .</b>	200
<b>Prenylierung</b>	
CTCACTCTCTTTTGTCTCATACTTCCACTCTGCTTGGCTCCCTCCCTTTCAGTTTCTCTTTCCTTCTGGTTCCTCTTACTCTACCTTTTAACT	800
CATTGAATCTGCTTGCCTTGGTAGGGGATAAGGGAACTTTTCTTTCTGGTCGCTAACAGATTCCCACTACTGGGGGTAATTTCAATTATTTTCCG	900
ACTGGATAAGAAAAGTGGTAAAAAGGACCCCTAAAAA	932

Abb. 20: cDNA-Sequenz, abgeleitete Aminosäuresequenz und Struktur des genomischen Locus von *emral*.

Gezeigt ist die gesamte cDNA-Sequenz (oben) von *emral* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des EmRal-Proteins (unten, fett). Die Sequenz des *E. multilocularis*-Spliced-Leader am 5'-Terminus und ein putatives Polyadenylierungs-Signal am 3'-Terminus sind unterstrichen dargestellt. Ein Punkt am Ende der Aminosäuresequenz markiert das Stop-Codon. Die Positionen der Introns des genomischen Locus sind mit Pfeilen markiert. Für jedes Intron ist die Größe sowie die Sequenz des 5'-Donors und des 3'-Akzeptors angegeben. Die Regionen G1 – G5, die von funktioneller Wichtigkeit für Ras-ähnliche GTPasen sind, sind ebenso grau unterlegt wie das Bindungsmotiv für die Prenylierung am 3'-Terminus.

Mit Primern aus der cDNA-Sequenz und chromosomaler Echinokokken-DNA als Template wurde über PCR der genomische Locus von *emral* amplifiziert, kloniert und charakterisiert. Das *emral* Leseraster wird von drei Introns mit Längen zwischen 162 bp und 2698 bp unterbrochen (Abb. 84). Alle Introns haben die kanonischen Dinucleotid-Sequenzen GT und AG an ihren Spleißdonor- und ihren Spleißakzeptorstellen. Der Echinokokken-Spliced-Leader, der am 5'-Ende der *emral* mRNA liegt deutet darauf hin, dass *emral* tatsächlich ein Faktor des Parasiten und nicht des Wirts ist. Für eine genaue Bestätigung wurden auf chromosomale DNAs des Parasiten *E. multilocularis* und des Laborwirts *M. unguiculatus* PCRs durchgeführt, wobei *emral*-spezifische PCR-Produkte nur in der Echinokokken-DNA nachgewiesen werden konnten. Auf der anderen Seite konnte das für den Wirt spezifische  $\beta$ -tubulin [46] nicht aus Echinokokken-DNA sondern nur aus der chromosomalen DNA von *M. unguiculatus* (Gerbil) amplifiziert werden (Abb. 23). Diese Ergebnisse zeigen, dass *emral* ein Echinokokkengen ist.

		← G1 →	← G2 →	← G3 →	
EmRal	MTQQ-----QQQNFVKLVAGVGGVGSALTLQFMYDEFVDEYEPTRADSYRKKISFGSEVQLHLIDTAGQEDYAGIRDTFYRNSEGFLVFDLTD				93
HsRalA	MAANKPRG---QNSLALHKVIMVGGVGSALTLQFMYDEFVDEYEPTRADSYRKKVVLGDGEEVQIDILDLAGQEDYAAIRDNYFRSGEGFLCVFSITE				97
HsRalB	MAANKSKG---QSSLALHKVIMVGGVGSALTLQFMYDEFVDEYEPTRADSYRKKVVLGDGEEVQIDILDLAGQEDYAAIRDNYFRSGEGFLVFSITE				97
DmRal	MSKKPTAG---P---ALHKVIMVGGVGSALTLQFMYDEFVDEYEPTRADSYRKKVVLGDGEEVQIDILDLAGQEDYAAIRDNYFRSGEGFLCVFSITD				94
CeRal	MASKKASGTLPPQQQVVKVIMVGTGGVGSALTLQFMYDEFVVEYEPTRADSYRKKVVLGDGEECSIDILDLAGQEDYSAIRDNYFRSGEGFLCVFSILD				100
		← G4 →	← G5 →		
EmRal	RQSFSLGFEFVDQILRVKRSR-RVEMLICGNKVDLTENRRVSQEEAEDFCRKCHVPYLETSAKTNTNVEKAFLTLAREVYQLKVAQRQHQPGQPTKQGH				192
HsRalA	MESFAATADFREQILRVK-EDENVPFLLVGNKSDLEDKRVQVVEEAKNRAEQWNVYVETSAKTRANVDKVFDFLMREIRARKMEDSKEKN---GKKKRK				193
HsRalB	HESFTATAEFREQILRVKAEEDKIPLLVVGKSDLEERRQVVEEARSKAEEWGVQYVETSAKTRANVDKVFDFLMREIRTKKMSKNDKKN---GKKSSK				194
DmRal	DESFQATQEFREQILRVK-NDESIFFLLVGNKCDLNDKRVPLSECOLRAQQWAVPYVETSAKTRENVDKVFDFLMREIRSRKTEDSKATS---GRAKDR				190
CeRal	MESFEATNEFREQILRVKNSDSSVPIVLVGNKGMRDQRVVAELCRQRAEQWGHYVETSAKRRENVKVFYDLMREMKRRKGGQAQTGIDASASSGR				200
				▼	
		Homologie zu EmRal			
EmRal	K-----KKRCKIL				200
HsRalA	SLAKRIRERCCIL		53/70%		206
HsRalB	N-KKSFKERCCIL		54/71%		206
DmRal	CKKRRLK--CTLL		53/66%		201
CeRal	KKRSGIKKHCTIL		49/62%		213

Abb. 21: EmRal – Sequenzhomologien.

Abgebildet ist ein Vergleich von EmRal mit Ral-Proteinen aus Säugetier, Insekt und Nematode. Die angegebenen Sequenzen beziehen sich auf die humanen RalA (HsRalA; GenBank Accession No. X15014) und RalB (HsRalB; X15015), ein Ral von *D. melanogaster* (DmRal; U23800) und auf ein Ral von *C. elegans* (CeRal; AC024809). Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz aller 5 Proteine übereinstimmen sind grau unterlegt. Mit weißen Pfeilen auf schwarzem Grund sind die katalytisch wichtigen Regionen G1 – G5 markiert. Ein schwarzes Dreieck (▼) markiert das bei allen Ras-GTPasen (wazu auch Ral-Proteine gehören) konservierte Cystein, das prenyliert wird (Geranylgeranyl bei EmRal). Die Homologien zwischen EmRal und den anderen Ral-Proteinen ist am Ende der Sequenz in Prozent angegeben (Identisch/ähnlich).

Zwischen allen kleinen GTP-bindenden Proteinen gibt es 5 funktionell wichtige, hoch konservierte Sequenzabschnitte, die Region I (G1), eine ATP/GTP-Bindungsdomäne mit der Konsensussequenz GXXXXGK (X steht für alle AS), die die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphate von GTP oder GDP bindet, die Effektordomäne (G2), die ihre Konformation nach der GTP-Bindung ändert und substratspezifisch ist, also keine Konsensussequenz aufweist, die Region II (G3) oder switch II, mit der Sequenz DXXG, in der das  $\gamma$ -Phosphat und das katalytisch  $Mg^{2+}$ -Ion bindet, die Region III (G4) mit der Sequenz NKXD in der der Guanin-Ring bindet und der Region IV (G5) mit der Sequenz EXSAX, die die GTP/GDP-Bindung stabilisiert [42, 307]. Wie in den Abbildungen 84 und 22 zu sehen ist, sind alle diese Motive auch in EmRal an den vergleichbaren Positionen vorhanden. Kleine GTP-bindende Proteine der Ras-, Rho/Rac/Cdc42- und Rab-Familien haben spezifische C-Termini, die posttranslational mit Lipiden wie Farnesyl oder Geranylgeranyl modifiziert werden [261, 307]. EmRal hat am C-Terminus ein kanonisches Prenyl-Bindungsmotiv ( $C^{197}$  hydrophob I<sub>aliphatisch</sub> L) und davor einen charakteristischen Abschnitt aus verschiedenen basischen Aminosäuren ( $H^{192}$ KKKR), (Abb. 84 und 22). Das Prenylbindungsmotiv ist bis auf eine Aminosäure mit dem für humanes Rap1 beschriebenen Motiv CX<sup>aliph.</sup>X<sup>aliph.</sup>L/F identisch. Die switch I-Region in der die Effektor-Domäne liegt kann zur Unterscheidung der einzelnen Unterfamilien der kleinen GTP-bindenden Proteine genutzt werden [205, 178]. Wie in Abb. 22 sehen ist, sind in EmRal 9 von den 10 AS-Resten, die für die Ral-Unterfamilie charakteristisch sind, an den dazugehörigen Positionen hoch

konserviert. Nur in einem Fall (Abb: 22) kommt es in EmRal zu einem konservativen Austausch von Lysin (K) nach Arginin (R). Zudem sind alle 4 AS-Reste vorhanden, die an der Interaktion von humanem Ral mit Sec5 [113] beteiligt sind (Abb: 22).

	▼ ▼	▼ ▼	
	*	****	* * ** *
EmRal	TLYFMYDEFVKDYEPTRADSYRKK		
HsRalA/B	TLQFMYDEFVEDYEPTKADSYRKK		
DmRalA	TLQFMYDEFVEDYEPTKADSYRKK		
HsRasH/N/L/K	TIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQ		
DmRas1	TIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQ		
HsRap1A/B	TVQFVQGI FVEKYDPTIEDSYRKQ		
DmRap	TVQFVQCI FVEKYDPTIEDSYRKQ		
HsRap2A	TVQFVTGTFIEKYDPTIEDFYRKE		
HsRap2B	TVQFVTGTFIEKYDPTIEDSYRKE		

Abb. 22: Sequenzvergleich von Ral-, Ras- und Rap-Effektordomänen.

Gezeigt ist ein Alignment verschiedener Ral-, Ras- und Rap-Proteine von *E. multilocularis* (Em), *H. sapiens* (Hs) und *D. melanogaster* (Dm). Reste, die mit der Sequenz von EmRal übereinstimmen sind grau unterlegt. Ein Stern (\*) markiert die Reste, die für Ral spezifisch sind. Dreiecke (▼) markieren die vier Reste, die für die Interaktion von humanem Ral mit Sec5 wichtig sind [113].

Ein Aminosäurevergleich zwischen EmRal und bekannten Faktoren aus Protein-Datenbanken ergab die größte Homologie zum humanen RalB (54 % identisch, 71 % ähnlich), humanen RalA (53/70 %), dem einzig bekannten Ral von *Drosophila* (53/66 %) und einem Ral-ähnlichen Faktor aus *C. elegans* (49/62 %). Die höchste Homologie der untersuchten Faktoren liegt in den GTP-Bindungsdomänen, während die N- und C-terminalen Regionen sich stärker unterscheiden (Abb: 88). Die Untersuchung der genomischen Organisation ergab, dass die Exon/Intron-Grenzen der Introns II und III zwischen *emral* und den Ral-codierenden Genen von Mensch, Insekt und Nematode hoch konserviert sind, während es im genomischen Locus der für den N-Terminus codiert, Unterschiede in der Intronlokalisierung gibt (Abb: 84).

### 3.3.2 *emral* - Echinokokkenspezifität

Da die cDNA-Bibliothek, über die *emral* isoliert wurde, aus Parasitenmaterial stammte das in Labortieren (*M. unguiculatus*) kultiviert wurde, musste ausgeschlossen werden, dass *emral* eine bisher unidentifizierte GTPase des Wirts ist. Dafür wurden auf die chromosomale DNA von axenisch *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln des Parasiten *E. multilocularis* und auf die chromosomale DNA, die aus der Leber eines uninfizierten Laborwirts *M. unguiculatus* isoliert wurde, PCRs durchgeführt, wobei *emral*-spezifische PCR-Produkte nur in der Echinokokken-DNA nachgewiesen werden konnten. Auf der anderen Seite konnte das für den Wirt spezifische  $\beta$ -tubulin [46] nicht aus Echinokokken-DNA sondern nur aus der chromosomalen DNA von *M. unguiculatus* (Gerbil) amplifiziert werden (Abb: 23). Diese Ergebnisse zeigen, dass *emral* ein Echinokokkengen ist.

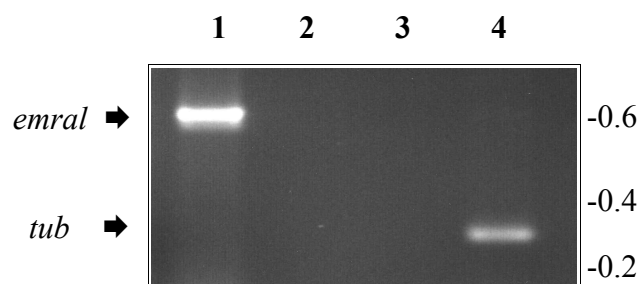


Abb. 23: Nachweis der Echinokokkenspezifität von *emral* über PCR.

Mit chromosomaler DNA aus *in vitro* kultivierten Echinokokken (Spur 1 + 2) und aus dem Gehirn von uninfizierten Rennmäusen (Spur 3 + 4) als Template wurden PCRs gegen *emral* (Spur 1 + 3) und das wirtsspezifische  $\beta$ -tubulin (Spur 2 + 4) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größenmarker ist rechts in kb angegeben.

### 3.3.3 *emral* - Expression in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*

In verschiedenen Versuchsansätzen wurde über RT-PCR die Expression von *emral* aus *in vivo* und *in vitro* kultivierten *E. multilocularis*-Larven untersucht. Zuerst wurde RNA aus Gesamtlarvenmaterial von infizierten Laborwirten (*M. unguiculatus*) isoliert. Wie in Abb. 24A zu sehen ist, konnte die Expression der korrekt gespleißten mRNA in drei verschiedenen natürlichen und klinischen Isolaten (H95, Süddeutschland; K188, Südösterreich; MP1, Patientenisolat aus Süddeutschland) unterschiedlicher geographischer Herkunft nachgewiesen werden. Da *in vivo* gewachsenes *E. multilocularis*-Parasitenmaterial aus zwei verschiedenen Entwicklungsstadien, nämlich dem Metacestoden und dem Protoscolex, besteht, stellte sich die Frage, ob *emral* in beiden Stadien exprimiert wird. Dafür wurde RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln und aus frisch isolierten Protoscolices (aus *in vivo* kultiviertem Material) isoliert. Abb. 24A zeigt deutlich die Expression von *emral* in beiden Larvenstadien.

Die Überprüfung einer cDNA-Bank mit *emral*-spezifischen 3'- und Vektor-spezifischen 5'-Primern konnten verschiedene Klone, die jeweils einen Teil des Spliced-Leader am 5'-Ende trugen, identifiziert werden, jedoch keine, bei welchen der Spliced-Leader durch alternative Sequenzen ersetzt wurde. Das deutete darauf hin, dass die *emral*-mRNA in *E. multilocularis* nur in trans-gespleißter Form vorliegt.

Mit einem virtuellen Northern-Blot wurde eine quantitative Analyse der *emral*-Expression des Metacestoden und des Protoscolex über doppelsträngige Spliced-Leader-cDNA durchgeführt. Wie in Abb. 24B zu sehen ist, konnte das Transkript in beiden Larvenstadien nachgewiesen werden, wobei die Expressionsstärke im Metacestoden etwas über der des Protoscolex liegt.

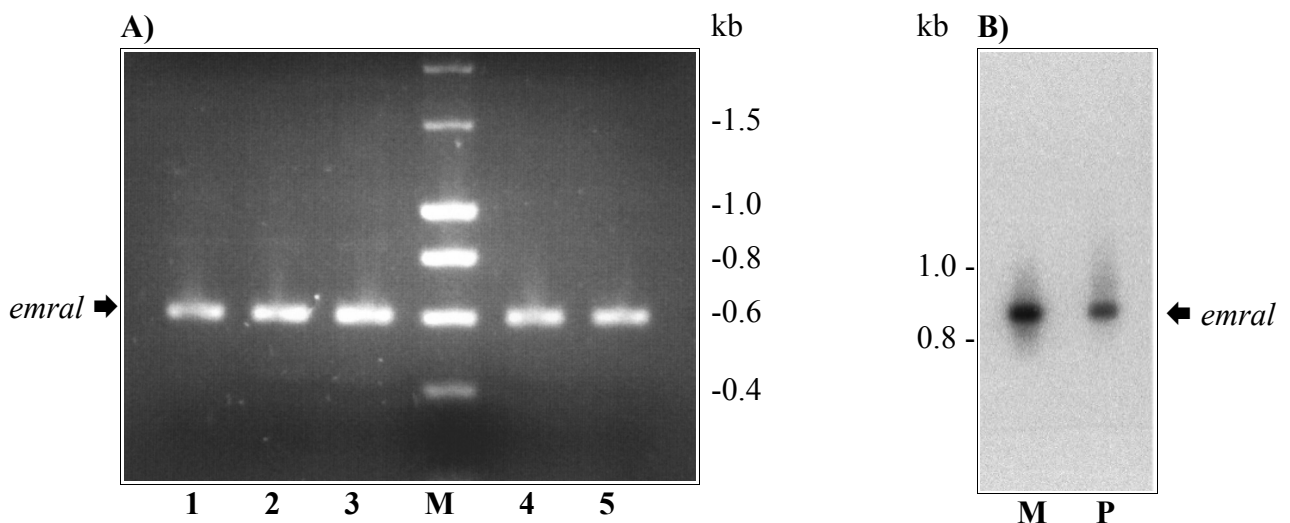


Abb. 24: Expression von *emral* in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

**A)** Nachweis von *emral* über RT-PCR. Gesamt-RNA wurde aus den *in vivo* gewachsenen Isolaten H95 (Spur 1), K188 (Spur 2) und MP1 (Spur 3) sowie aus *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln (Spur 4) und Protoscolices (Spur 5) isoliert und in eine SL-cDNA umgeschrieben. Mit den Primern Ral-5' und Ral-3' wurde die *emral*-spezifische RT-PCR amplifiziert, die PCR-Produkte dann in einem 1.5% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Größen des DNA-Markers (Spur M) sind rechts angegeben. **B)** Virtueller Northern-Blot. Mit cDNA aus *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln (Spur M) und Protoscolices (Spur P) wurde über PCR (24 Zyklen) mit Primern gegen den poly(A)-Schwanz und den Spliced-Leader doppelsträngige Spliced-Leader-cDNA amplifiziert. Jeweils 500 ng dieser cDNAs wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran geblottet und mit einer [<sup>32</sup>P]-markierten *emral*-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Größe der DNA ist links angegeben.

### 3.3.4 EmRal bindet GTP

Die Sequenzanalysen ergaben, dass EmRal zur Ral-Unterfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTP-bindenden Proteine gehört. Um heraus zu finden, ob EmRal GTP binden kann, wurde das *emral*-Leseraster als 5'-Fusion in den Vektor pBAD/Thiofusion (Invitrogen) kloniert, in *E. coli* rekombinant exprimiert und mit dem resultierenden Protein dann ein GTP-Bindungsassay durchgeführt [170]. Wie in Abb. 25 zu sehen ist, konnte EmRal erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden und zeigte eine deutliche GTP-Bindungsaktivität.

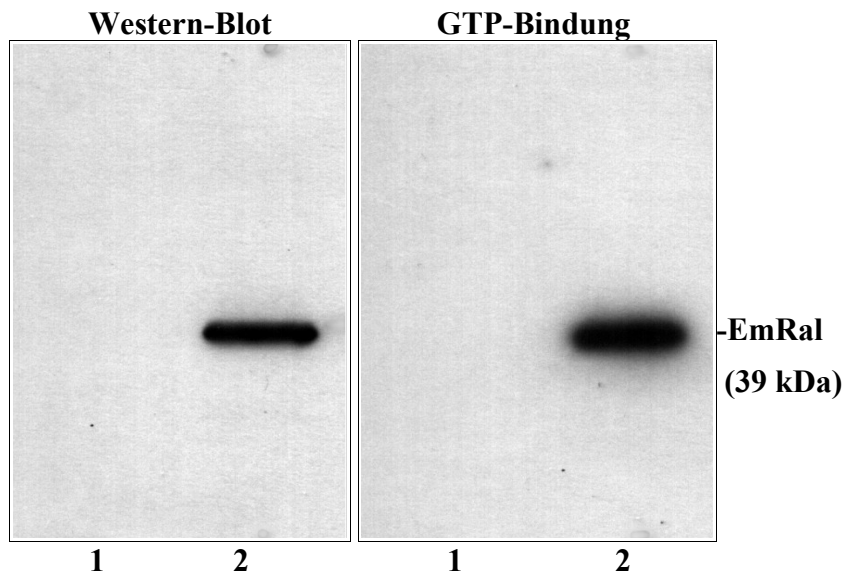


Abb. 25: EmRal: GTP-Bindungsaktivität

EmRal (23 kDa) wurde translationell am 3'-Ende mit dem V5-Epitop und einem 6×His-Tag (3 kDa) fusioniert und rekombinant unter der Kontrolle eines arabinoseinduzierbaren Promoters in *E. coli* exprimiert. Das gesamte Zellysate wurde vor (Spur 1) und nach (Spur 2) der Expressions-Induktion in einem 12.5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Im linken Blot (Western) wurde das rekombinante Protein mit dem anti-V5-Antikörper nachgewiesen. Der rechte Blot (GTP-Bindung) wurde mit  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -GTP inkubiert, gewaschen und für 24 Stunden auf einem Röntgenfilm gelegt.

### 3.3.5 EmRal ist geranylgeranyliert

Für die Funktion von Ras und Ras-ähnlichen kleinen GTP-bindenden Proteine ist eine Verankerung in zellulären Membranen über kovalent gebundene lipophile Prenylgruppen essentiell [261, 307]. Wie aus Abb. 84 zu ersehen ist, hat EmRal am C-Terminus ein kanonisches Prenylgruppen-Bindungsmotiv ( $\text{C}^{197}\text{KIL}$ ) und davor einen charakteristischen Abschnitt basischer Aminosäuren. Dieses Prenylgruppen-Bindungsmotiv kann entweder durch das Anhängen von Farnesyl oder von Geranylgeranyl modifiziert werden. Um heraus zu finden, welche dieser Prenylgruppen posttranskriptionell an EmRal gebunden wird, wurden verschiedene *in vitro* Prenylierungsexperimente durchgeführt [237, 322].

In einem ersten Experiment wurde EmRal in Kaninchen-Reticulocytenextrakt *in vitro* translatiert (Abb. 26A) und mit  $^3\text{H}$  markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat inkubiert. Wie in Abb. 26B gezeigt, wird das *in vitro* translatierte EmRal nur in Gegenwart von  $^3\text{H}$  Geranylgeranyl-Pyrophosphat modifiziert, nicht jedoch nach Zugabe von  $^3\text{H}$  Farnesyl- Pyrophosphat. In einem zweiten Experiment wurde EmRal als Thiofusions-Protein in *E. coli* rekombinant exprimiert, mit einem anti-Thioredoxin-Antikörper immunpräzipitiert und anschließend in der Gegenwart von  $^3\text{H}$  markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat in Kaninchen-Reticulocytenextrakt oder Echinokokkenlysate inkubiert. In beiden Ansätzen konnte eine Modifikation von EmRal nur mit Geranylgeranyl-Pyrophosphat, nicht jedoch mit Farnesyl- Pyrophosphat beobachtet werden (Abb. 26C). Aus diesen Daten ging hervor, dass EmRal, wie auch seine humanen Homologe RalA und RalB [166], in *E. multilocularis* geranylgeranyliert wird. In Abb. 39 ist eine Zusammenstellung der Prenylierungsexperimente aller GTPasen von *E. multilocularis*, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden, gezeigt.



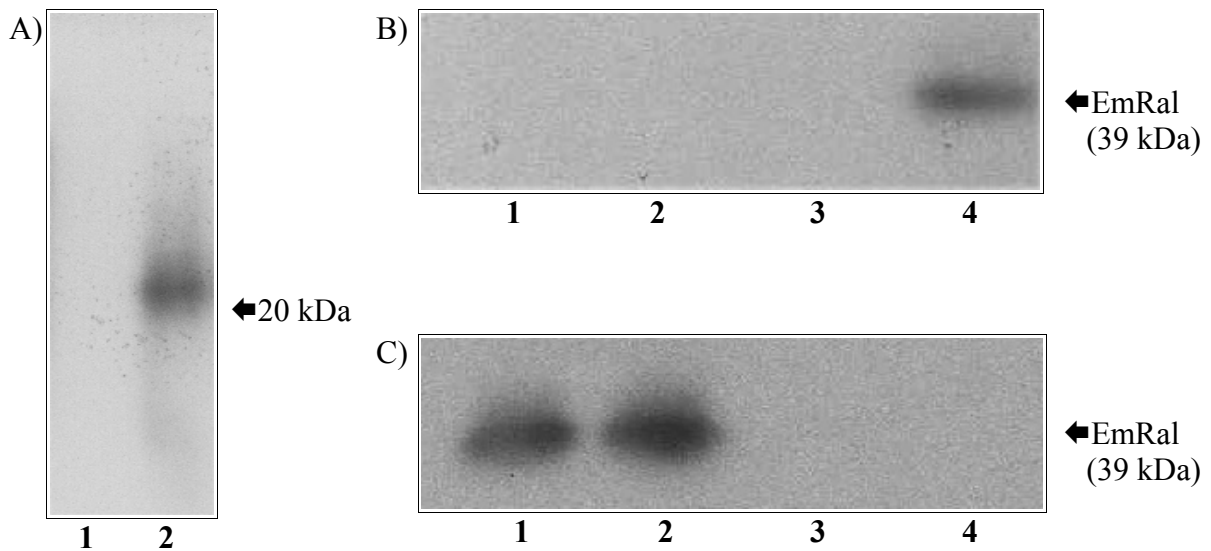


Abb. 26: Geranylgeranylierung von EmRal.

**A)** *In vitro* Translation von EmRal. Das *emral*-Leseraster wurde 5'-terminal translationell mit einem c-Myc-Tag fusioniert. Mit T7-RNA-Polymerase wurde dann mRNA hergestellt. Für die *in vitro* Translation des cMyc-EmRal-Fusionsproteins wurde Kaninchen-Reticulocytextrakt mit (Spur 1) und ohne (Spur 2) mRNA eingesetzt. Die Lysate wurden über einen Western-Blot mit einem anti-Myc-Antikörper analysiert. **B)** Prenylierung mit *in vitro* translatiertem EmRal. Dafür wurde Kaninchen-Reticulocytextrakt ohne (Spur 1+2) und mit (Spur 3+4) *emral*-mRNA zur *in vitro* Translation des EmRal-cMyc-Fusionsproteins benutzt und dabei mit [<sup>3</sup>H]-Farnesyl-Pyrophosphat (Spur 1+3) oder [<sup>3</sup>H]-Geranylgeranyl-Pyrophosphat (Spur 2+4) inkubiert. Die Reaktionen wurden in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt und autoradiographisch gemessen. **C)** Prenylierung mit rekombinant exprimiertem EmRal. EmRal wurde als Fusionsprotein mit einem 5'-terminalen Thioredoxin exprimiert. Das Fusionsprotein wurde mit einem anti-Thioredoxin-Antikörper immunpräzipitiert und dann in Kaninchen-Reticulocytextrakt (Spur 1+3) oder Echinokokken-Extrakt (Spur 2+4) mit [<sup>3</sup>H]-Geranylgeranyl-Pyrophosphat (Spur 1+2) oder [<sup>3</sup>H]-Farnesyl-Pyrophosphat (Spur 3+4) inkubiert. Die Reaktionen wurden in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt und autoradiographisch gemessen.

### 3.3.6 EmRal- *in vivo* Interaktionsstudien mit EmRaf über Yeast-2-Hybrid

Über das Yeast-Two-Hybrid-Systeme lassen sich *in vivo* Interaktionen von kleinen GTP-bindenden Proteinen wie Ras mit Raf oder anderen Faktoren untersuchen [203]. Da für Ral-Proteine bisher keine Interaktion mit Raf beschrieben ist, wurde EmRal als Negativkontrolle in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten eingesetzt, in welchen die *in vivo* Interaktion der kleinen GTPasen EmRas, EmRap1 und EmRap2 mit EmRaf untersucht wurden. Die Beschreibung und die beobachteten Ergebnisse des durchgeführten Versuchs sind in Kapitel 3.6.5 ausführlich dargestellt (Abb. 45). Für EmRal und EmRaf konnten dabei keine Interaktionen nachgewiesen werden.

### 3.4 EmRap1

EmRap1 ist eine 20,3 kDa große farnesylierte GTPase aus *E. multilocularis*, die mit bis zu 76% identischen und 85% ähnlichen Aminosäureresten eine hohe Homologie zu bekannten Rap1-Proteinen hat und die in rekombinant exprimierter Form GTP binden kann. Die mRNA von EmRap1 ist in den zwei Larvenstadien Metacestode und Protoscolex nachweisbar. In Yeast-Two-Hybrid-Experimenten reagiert EmRap1 mit EmRaf.

Die für die Charakterisierung von EmRap1 angewandten Methoden und die verwendeten Oligonucleotide sowie die identifizierten Sequenzen des chromosomalen Locus, der cDNA und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich in Kapitel 5.19.

#### 3.4.1 *emrap1* - cDNA und genomischer Locus

Die vollständige cDNA von *emrap1* konnte während der Sequenzierung einer Spliced-Leader-cDNA-Bank isoliert werden. Sie beginnt am 5'-Ende mit dem 36 bp langen Spliced-Leader von *E. multilocularis* [44], ist ohne Poly(A)-Schwanz 1153 bp lang und enthält ein offenes Leseraster, dass für ein 183 AS langes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 20.3 kDa codiert (Abb. 27). Ein Aminosäure-Sequenzvergleich ergab signifikante Homologien von 76/85% zur humanen GTPase Rap1b sowie zu weiteren Rap1-Proteinen verschiedenen phylogenetischen Ursprungs (Abb. 28). Aufgrund dieser hohen Homologien wurde das zugehörige Gen *emrap1* genannt.

<u>CACCGTTAATCGGTCCTTACCTTGACAGTTTGTATG</u> CCTCTGTGTGTGAGCAATCGTTGGCCTCACGTGGAATTACGGTCA <u>TGC</u> GAGACTACAAGTTGGT	
Spliced-Leader	M R D Y K L V 7
GGTTCTCGGCAGCGGAGGTGTGGCAAGAGCGCACTGACGGTGCAGTTTGTACAAAGCATTTCGTCGAAAAGTATGATCCTACTATCGAGGATAGTTAC	200
V L G S G G V G K S A L T V Q F V Q S I F V E K Y D P T I E D S Y	40
<b>G-1 (GTP-Bindung)</b>	<b>G-2 (Effektordomäne)</b>
Intron 1 (409bp): ↓ GTATG...TGTAG	
AGGAAGCAAATCGAGTGGATGGCCAGCAGTGCATGCTCGAAATTCGATACTGCAGGCACAGAGCAATTCACGGCTATGCGCGACCTCTATATGAAAA	300
R K Q I D V D G Q Q C M L E I L D T A G T E Q F T A M R D L Y M K	73
G-3	
ACGGTCAGGGGTTTGTGCTGTGCTACTCTATTACCTCCCAGTCCACTTCAATGACTTGGCAGATCTCTACGAGCAGATTCTGCGCGTGAAGGACACGCA	400
N G Q G F V L C Y S I T S Q S T F N D L A D L Y E Q I L R V K D T H	111
CGAGGTACCTCTAGTGTGGTGGGGAACAAGTGTGATCTTGACAACGAGCGTGTGCTGGGCAGGGAGCAAGGCCAAACTCTGGCCAGAAAATTGGAATTGTT	500
E V P L V L V G N K C D L D N E R V V G R E Q G Q T L A R N W N C	144
G-4	
Intron 2 (2192 bp): ↓ GTAAT...TTTAG	
GTTTTTATGGAGACCAGTGCAGAAAGCCAAAATCAACGTCATGAGGTATCTTTGATTTGGTGCCTCAAATAAACCAACCGAACACCGGTCCCCAAAAAGA	600
V F M E T S A K A K I N V N E V F F D L V R Q I N N R T P V P K K	178
G-5	
CACGAACGAAGAAAGTGCAGCATCTGCTAGCGCGGACGCTCCTTCTCCTCGACCACCGTCCACCGTCCAGTTCCTTCATATATTGGAGCGA	700
T R T K K E C S I C .	183
Prenylierung	
TGCGAAGGGCCGTGGACTCTATTATCTTCGTTAGCGCTGCCTCCTACCCCTTCTTCTCCTCGTCTTTAAGAGATGACAATCTGCACACCTGCTTATC	800
CCGTAATTTAATCGCCTCTATATGCGAACATCTCGAACTCTATACACTCGGGCGCAGATCTATTCATGCAAAAATCACCGTCCACATTTTGTAGTCATTTTCG	900
TGTCCTTTTTTCGCTAATAATCATTTCGTTCTCCCATTTCCCTGCATTTCACTCACTGCAAAACCGGTTGGGTGGATGCTGAAGTTTCCCTCTGCTTTCTTGGC	1000
ACTCTTTTTTATTTCTGCTACTGTAATAGTTTATTTACATGCAGTATTTTACCCTCCCCAACCAACCTTGATATCTGCTTTTCTGTTCTGCTTTTTC	1100
CTTGAAGCTAATAAAGTGGCGAGTTTTGAGTCCGTTAACGTGTACACTCAAAAAA	1152

Abb. 27: cDNA-Sequenz, abgeleitete Aminosäuresequenz und Struktur des genomischen Locus von *emrap1*.

Gezeigt ist die gesamte cDNA-Sequenz (oben) von *emrap1* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des EmRap1-Proteins (unten, fett). Ein Punkt am Ende der Aminosäuresequenz markiert das Stop-Codon. Die Positionen der beiden Introns des genomischen Locus sind mit Pfeilen markiert. Für jedes Intron ist die Größe sowie die Sequenz des 5'-Donors und des 3'-Akzeptors angegeben. Die Regionen G1 – G5, die von funktioneller Wichtigkeit für Ras-ähnliche GTPasen sind, sind ebenso grau unterlegt wie das Bindungsmotiv für die Prenylierung am 3'-Terminus. Der Spliced-Leader am 5'-Terminus sowie das Start- und Stop-Codon sind unterstrichen.

EmRap1	MRDYKLVVLSGGVGSALTVQFVQSI FVEKYDPTIEDSYRKQIDVDGQQCMLEILD TAGTEQFTAMRDLYMKNQGQFVLCYSITSQSTFNDLADLYEQI	100
HsRap1A	MREYKLVVLSGGVGSALTVQFVQGI FVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQCMLEILD TAGTEQFTAMRDLYMKNQGQFALVYSITAQSTFNDLQDLREQI	100
HsRap1B	MREYKLVVLSGGVGSALTVQFVQGI FVEKYDPTIEDSYRKQVEVDAQQCMLEILD TAGTEQFTAMRDLYMKNQGQFALVYSITAQSTFNDLQDLREQI	100
DmRap	MREYKLVVLSGGVGSALTVQFVQCI FVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQCMLEILD TAGTEQFTAMRDLYMKNQGQFVLYYSITAQSTFNDLQDLREQI	100
CeRap	MREYKLVVLSGGVGSALTVQFVQGI FVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQCMLEILD TAGTEQFTAMRDLYMKNQGQFVLYYSITAQSTFNDLMDLRDQI	100
		Homologie zu EmRap1
EmRap1	QILRVKDTHEVPLVLVGNKCDLDNERVVGREQQQT LARNW-NCVFEMETSAKAKINVNEVFFDLVRQINNRT PVP-KKTRTK-KE---CSIC	----- 184
HsRap1A	QILRVKDTEDVPMILVGNKCDLEDERVVGKEQQQLARQWNCALLESSAKSKINVNEIFYDLVRQINRKT PVEK-KKPKK-K---SCLLL	75/84% 184
HsRap1B	QILRVKDTDDVPMILVGNKCDLEDERVVGKEQQQLARQWNNCAFLESSAKSKINVNEIFYDLVRQINRKT PVPK-KARKK-S---SCQLL	76/85% 184
DmRap	QILRVKDTDDVPMILVGNKCDLEERVVGKELGKNLA TQF-NCFTETSAKAKVNVNDIFYDLVRQINKKS PEKKQKPKK-S---LCVLL	75/84% 184
CeRap	QILRVKDTDEVPMILVGNKCDLEDERVVGKDGQQLARQFGS-AFLETSAKAKINVSEVFFDLVRQINRYPESGRRQGSNKQCCSCVIM	76/86% 188

Abb. 28: EmRap1 – Sequenzhomologien.

Abgebildet ist ein Vergleich von EmRap1 mit Rap-GTPasen aus Mensch, Insekt und Nematode. Die angegebenen Sequenzen beziehen sich auf *H. sapiens* Rap1A (HsRap1A; GenBank Accession No. Q5U0C3) und Rap1B (HsRap1B; Q6DCA1), auf Rap von *D. melanogaster* (DmRap; M80535) und das hypothetische Protein C27B.8 (hier CeRap genannt) von *C. elegans* (C27B.8; T19507). Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz aller 5 Proteine übereinstimmen sind grau unterlegt. Mit weißen Pfeilen auf schwarzem Grund sind die katalytisch wichtigen Regionen G1 – G5 markiert. Ein schwarzes Dreieck (▼) markiert das konservierte Cystein, das prenyliert wird und das bei allen GTPasen der Ras-Familie, zu der auch Rap1 gehört vorhanden ist. Die Homologien zwischen EmRap1 und den anderen Rap-Proteinen ist am Ende der Sequenz in Prozent angegeben.

Mit Primern aus der cDNA-Sequenz und chromosomaler Echinokokken-DNA als Template wurde über PCR der genomische Locus von *emrap1* amplifiziert, kloniert und charakterisiert. Das *emrap1* Leseraster wird von zwei Introns unterbrochen, die 409 bp und 2192 bp lang sind (Abb. 27). Beide Introns haben die kanonischen Dinucleotid-Sequenzen GT und AG an ihrer Spleißdonor- und ihrer Spleißakzeptorstelle. Die Intronengrenzen beider Introns sind in HsRap1A konserviert.

Zwischen allen kleinen GTP-bindenden Proteinen gibt es 5 funktionell wichtige, hoch konservierte Sequenzabschnitte, die Region I (G1), eine ATP/GTP-Bindungsdomäne mit der Konsensussequenz GXXXXGK (X steht für alle AS), die die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphate von GTP oder GDP bindet, die Effektor-domäne (G2), die ihre Konformation nach der GTP-Bindung ändert und substratspezifisch ist, also keine Konsensussequenz aufweist, die Region II (G3) oder switch II, mit der Sequenz DXXG, in der das  $\gamma$ -Phosphat und das katalytisch  $Mg^{2+}$ -Ion bindet, die Region III (G4) mit der Sequenz NKXD in der der Guanin-Ring bindet und die Region IV (G5) mit der Sequenz EX-SAX, die die GTP/GDP-Bindung stabilisiert [42, 307].

Wie in den Abbildungen 27 und 28 zu sehen ist, sind alle diese Motive auch in EmRap1 an den vergleichbaren Positionen vorhanden. Kleine GTP-bindende Proteine der Ras-, Rho/Rac/Cdc42- und Rab-Familien haben spezifische C-Termini, die posttranslational mit Lipiden wie Farnesyl oder Geranylgeranyl modifiziert werden [261, 307]. EmRap1 hat am C-Terminus ein kanonisches Prenyl-Bindungsmotiv (C<sup>181</sup>SIC) und davor einen charakteristischen Abschnitt aus verschiedenen basischen Aminosäuren **KKTRTKKRE** (Abb. 27 Und 28). Bis auf die fehlende aliphatische Aminosäure an Position S<sup>182</sup> entspricht das Prenylbindungsmotiv von EmRap1 dem von humanem Ki-Ras [307].

### 3.4.2 *emrap1* - Echinokokkenspezifität

Da die cDNA-Bibliothek, über die *emrap1* isoliert wurde, aus Parasitenmaterial stammte das in Labortieren (*M. unguiculatus*) kultiviert wurde, musste ausgeschlossen werden, dass *emrap1* eine bisher unidentifizierte GTPase des Wirts ist. Dafür wurden auf die chromosomale DNA von axenisch *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln des Parasiten *E. multilocularis* und auf die chromosomale DNA, die aus der Leber eines uninfizierten Laborwirts *M. unguiculatus* isoliert wurde, PCRs durchgeführt, wobei *emrap1*-spezifische PCR-Produkte nur in der Echinokokken-DNA nachgewiesen werden konnten. Auf der anderen Seite konnte das für den Wirt spezifische  $\beta$ -*tubulin* [46] nicht aus Echinokokken-DNA sondern nur aus der chromosomalen DNA von *M. unguiculatus* (Gerbil) amplifiziert werden (Abb: 29). Diese Ergebnisse zeigen, dass *emrap1* ein Echinokokkengen ist.

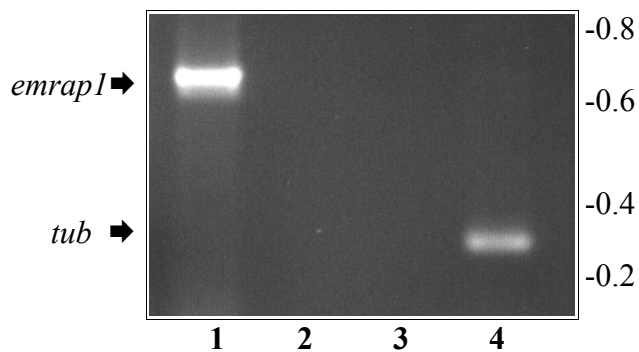


Abb. 29: Nachweis der Echinokokkenspezifität von *emrap1* über PCR.

Mit chromosomaler DNA aus *in vitro* kultivierten Echinokokken (Spur 1 + 2) und aus dem Gehirn von uninfizierten Rennmäusen (Spur 3 + 4) als Template wurden PCRs gegen *emrap1* (Spur 1 + 3) und das wirtsspezifische  $\beta$ -*tubulin* (Spur 2 + 4) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größenmarker ist rechts in kb angegeben.

### 3.4.3 *emrap1* - Expression in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*

Über RT-PCR wurde die Expression von *emrap1* aus *in vivo* und *in vitro* kultivierten *E. multilocularis*-Larven untersucht. Da *in vivo* gewachsenes *E. multilocularis*-Parasitenmaterial aus zwei Larvenstadien, nämlich dem Metacestoden und dem Protoscolex, besteht, stellte sich die Frage, ob *emrap1* in beiden Stadien exprimiert wird. Dafür wurde RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln und aus frisch isolierten Protoscolices (aus *in vivo* kultiviertem Material) isoliert. Ein Teil der Protoscolices wurde aktiviert. Abb. 30A zeigt deutlich die Expression von *emrap1* in beiden Larvenstadien. Mit einem virtuellen Northern-Blot wurde eine quantitative Analyse der *emrap1*-Expression des Metacestoden und des Protoscolex über doppelsträngige Spliced-Leader-cDNA durchgeführt. Wie in Abb. 30B zu sehen ist, konnte das Transkript in beiden Larvenstadien nachgewiesen werden, wobei der Expressionslevel im Metacestoden deutlich stärker ist als im Protoscolex.

### 3.4.4 EmRap1 - Nachweis in verschiedenen *E. multilocularis* Larvenstadien

Für den Expressions-Nachweis von EmRap1 in verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten wurde ein kommerzieller Antikörper (Kaninchen-anti-Rap1; Stressgen) verwendet, der gegen ein Peptid gerichtet ist, das unter den Rap1-Proteinen unterschiedlichen phylogenetischen Ursprungs hoch konserviert ist. Wie in Abb. 31 zu sehen ist, reagiert der Antikörper mit dem rekombinant exprimierten Thioredoxin-EmRap1 (31A) und mit einem einzigen Protein der Lysate aus *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln und *in vivo* kultivierten Protoscolices, während in Leberlysat des Laborwirts *M. unguiculatus* nichts erkannt wird (31B). Die Größe der erkannten natürlichen Proteine entspricht mit 21 kDa genau dem errechneten Molekulargewicht von EmRap1. Daher

kann davon ausgegangen werden, dass der Antikörper den Echinokokken-Faktor erkennt und das EmRap1 in beiden Larvenstadien exprimiert wird.

Um zu überprüfen, wo genau EmRap1 im Parasiten lokalisiert ist, wurden in Zusammenarbeit mit Dennis Tappe (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg) Immunlokalisations-Studien an *in vivo* gewachsenem Parasitenmaterial durchgeführt. Wie in Abb. 33 gezeigt, wurden in der Germinalschicht des Metacestoden die Zellen angefärbt, die die Kalziumkörperchen umgeben (Abb. 33 A) während im Protoscolex die Tegument-Strukturen deutlich angefärbt wurden (Abb. 33 C Protoscolex invaginiert, Abb. 33 D: Protoscolex evaginiert). Wie erwartet, wurde weder die zellenlose Laminatschicht noch die Negativ-Kontrolle, in welcher nur der Zweitantikörper eingesetzt wurde, angefärbt (Abb. 33 B).

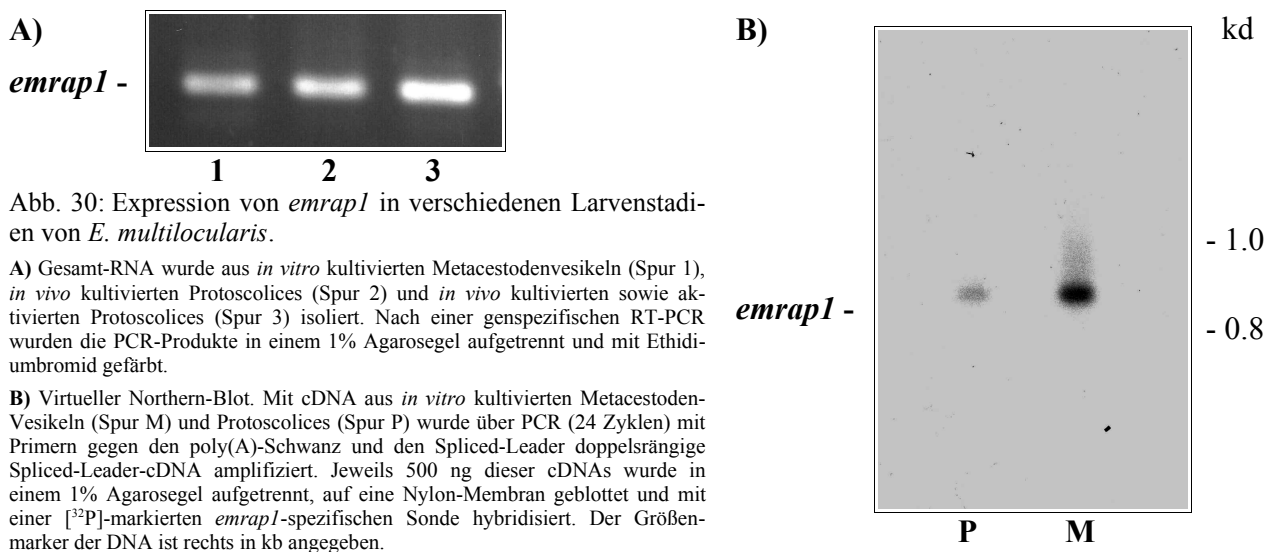


Abb. 30: Expression von *emrap1* in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

A) Gesamt-RNA wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (Spur 1), *in vivo* kultivierten Protoscolices (Spur 2) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten Protoscolices (Spur 3) isoliert. Nach einer genspezifischen RT-PCR wurden die PCR-Produkte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

B) Virtueller Northern-Blot. Mit cDNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (Spur M) und Protoscolices (Spur P) wurde über PCR (24 Zyklen) mit Primern gegen den poly(A)-Schwanz und den Spliced-Leader doppelsrängige Spliced-Leader-cDNA amplifiziert. Jeweils 500 ng dieser cDNAs wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran geblotet und mit einer [<sup>32</sup>P]-markierten *emrap1*-spezifischen Sonde hybridisiert. Der Größemarker der DNA ist rechts in kb angegeben.

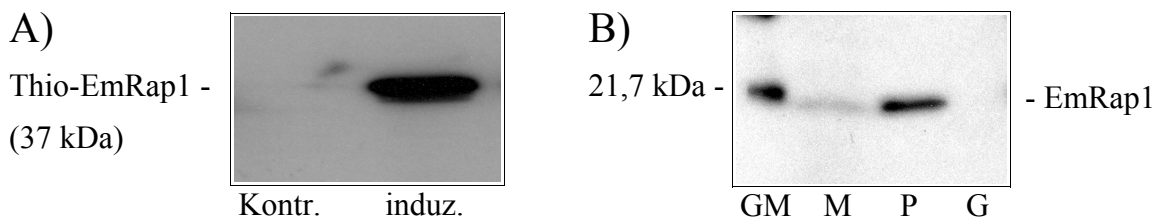


Abb. 31: Nachweis von EmRap1 über Antikörper im Western-Blot.

Rekombinant exprimiertes EmRap1 (Abb. A: EmRap1-Thiofusionsprotein, Kontr: nicht induziert, induz: induziert) sowie Zellysate (Abb. B) von *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (M), *in vivo* kultivierten Protoscolices (P) und Leberlysat eines Gerbils (G) in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Blots wurden mit dem Erstantikörper anti-Rap1 (rabbit anti-Rap1; Stressgen) und dem Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörper AffiniPure anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research) entwickelt. Die Größe der Proteine ist in kDa angegeben, GM ist der Größemarker in Abb B.

### 3.4.5 EmRap1 ist farnesyliert

Für die Funktion von Rap1 ist wie bei allen Ras-ähnlichen GTPasen eine Verankerung in zellulären Membranen über kovalent gebundene lipophile Prenylgruppen essentiell [261, 307]. Wie in Abb. 27 Und 28 zu sehen ist, hat EmRap1 am C-Terminus ein kanonisches Prenylgruppen-Bindungsmotiv (C<sup>183</sup>SIC) und davor einen charakteristischen Abschnitt basischer Aminosäuren. Dieses Prenylgruppen-Bindungsmotiv kann entweder durch das Anhängen von Farnesyl oder von Geranylgeranyl modifiziert werden. Um heraus zu finden, welche dieser Prenylgruppen posttranskriptionell an EmRap1 gebunden wird, wurden *in vitro* Prenylierungsexperimente durchgeführt [237, 322]. Dafür wurde EmRap1 rekombinant als C-terminale Fusion von Thioredoxin in *E. coli*

exprimiert. Das aufgereinigte Fusionsprotein wurde mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach einer Anfärbung mit Ponceau-Rot wurde die EmRap1-Proteinbande ausgeschnitten und in vier Abschnitte geteilt. Die einzelnen Abschnitte wurden in der Gegenwart von [ $^3\text{H}$ ]-markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat in Kaninchen-Reticulocytenextrakt oder Echinokokkenlysate inkubiert. Der Nachweis einer Prenylierung wurde über eine Röntgenfilmexposition erbracht. Sowohl in Kaninchen-Reticulocytenextrakt als auch in Echinokokkenlysate konnte eine Farnesylierung nachgewiesen werden. Die angewandte Methode funktionierte schnell und war im Materialverbrauch sehr sparsam. Die Ergebnisse sind in Abb. 39 dargestellt.

### 3.4.6 EmRap1 bindet GTP

Die Sequenzanalysen ergaben, dass EmRap1 zur Rap-Unterfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTP-bindenden Proteine gehört. Um heraus zu finden, ob EmRap1 GTP binden kann, wurde das *emrap1*-Leseraster als 5'-Fusion in den Vektor pBAD/Thiofusion (Invitrogen) kloniert und in *E. coli* rekombinant exprimiert. Mit dem resultierenden Protein wurde dann ein GTP-Bindungsassay durchgeführt [170]. Wie in Abb. 32 zu sehen ist, konnte EmRap1 erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden und zeigte dazu hin eine deutliche GTP-Bindungsaktivität.

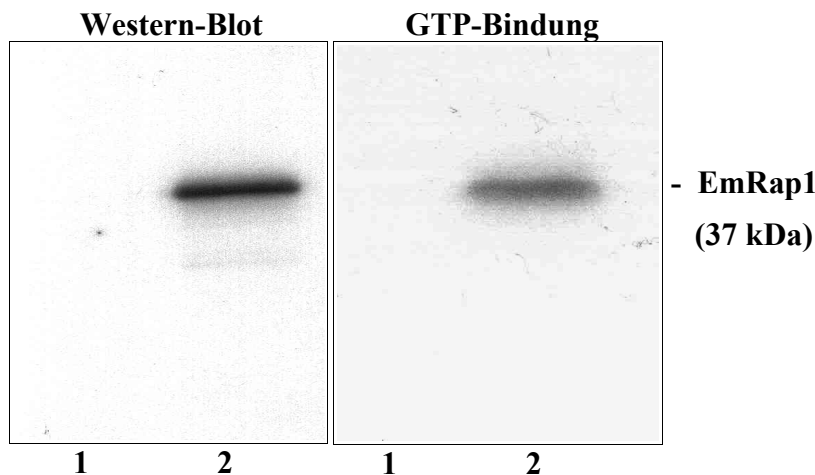


Abb. 32: EmRap1: GTP-Bindungsaktivität.

EmRap1 (20.8 kDa) wurde translationell am 5'-Terminus mit Thioredoxin und am 3'-Ende mit dem V5-Epitop und einem 6 $\times$ His-Tag (3 kDa) fusioniert und rekombinant unter der Kontrolle eines arabinoseinduzierbaren Promoters in *E. coli* exprimiert. Das gesamte Zelllysate wurde vor (Spur 1) und nach (Spur 2) der Expressions-Induktion in einem 12.5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Im linken Blot (Western) wurde das rekombinante Protein mit dem anti-V5-Antikörper nachgewiesen. Der rechte Blot (GTP-Bindung) wurde mit  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-GTP inkubiert, gewaschen und für 24 Stunden auf einem Röntgenfilm gelegt.

### 3.4.7 EmRap1 - *in vivo* Interaktionsstudien mit EmRaf über Yeast-2-Hybrid

Über das Yeast-Two-Hybrid-Systeme lassen sich *in vivo* Interaktionen von kleinen GTP-bindenden Proteinen wie Ras mit Raf oder anderen Faktoren untersuchen [203]. Da mit EmRaf ein potentieller Downstreamfaktor von EmRap1 für *E. multilocularis* charakterisiert wurde, sollten Yeast-Two-Hybrid-Experimente eine Interaktion dieser beiden Faktoren nachweisen. Die Beschreibung und die beobachteten Ergebnisse des durchgeführten Versuchs sind in Kapitel 3.6.5 ausführlich dargestellt (Abb. 45). Für EmRap1 und EmRaf konnte dabei eine deutliche Interaktion festgestellt werden.

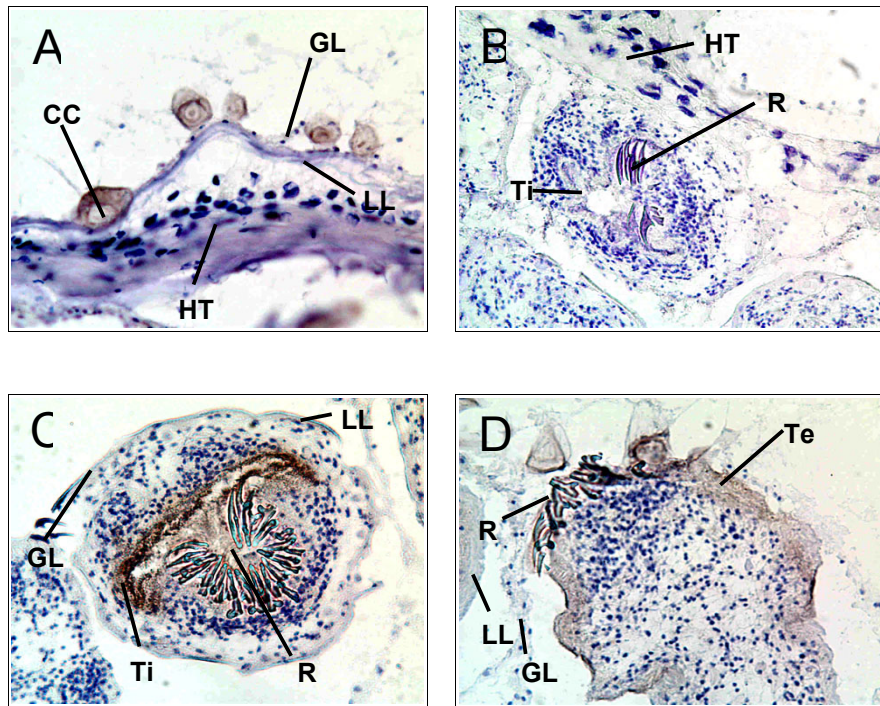


Abb. 33: Immunhistochemischer Nachweis von EmRap1 in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Aus von infizierten Labortieren (*M. unguiculatus*) isolierten Lebern wurden Gefrierschnitte hergestellt ( $\varnothing$  5 $\mu$ m), mit einem anti-Rap1-Antikörper (rabbit anti-Rap1; Stressgen) als Erstantikörper inkubiert und mit einem Peroxidase-konjugierten Maus-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Abb. A,C,D) oder nur mit dem Zweitantikörper entwickelt (Abb. B). Die Pfeile zeigen folgende Strukturen: CC - Kalziumkörperchen, GL - Schicht aus Germinalzellen des Metacestoden, LL - nichtzelluläre Laminatschicht des Metacestoden, T - Tegument, HT - Wirtsgewebe, R - Hakenkranz des Protoscolex (Rostellum).

### 3.5 EmRap2

EmRap2 ist eine 21,7 kDa große farnesylierte GTPase aus *E. multilocularis*, die mit bis zu 47% identischen und 60% ähnlichen Aminosäuren eine hohe Homologie zu bekannten Rap2-Proteinen hat und die in rekombinant exprimierter Form keine NTPs binden kann. Die mRNA von EmRap2 ist in den zwei Larvenstadien Metacestode und Protoscolex nachweisbar. In Yeast-Two-Hybrid-Experimenten interagiert EmRap2 mit EmRaf.

Die für die Charakterisierung von EmRap2 angewandten Methoden und die verwendeten Oligonucleotide sowie die identifizierten Sequenzen des chromosomalen Locus, der cDNA und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich in Kapitel 5.20.

#### 3.5.1 *emrap2* - cDNA und genomischer Locus

Die *emrap2*-cDNA wurde über eine degenerative PCR und eine anschließende 3'- sowie 5'-RACE aus einer cDNA-Bank von *E. multilocularis* isoliert und besitzt in ihrer bisher Form keinen poly(A)-Schwanz. Sie ist 1164 bp lang und enthält ein einziges offenes Leseraster das für das kleine GTP-bindende Protein EmRap2 (200 AS, 21.7 kDa) codiert (Abb. 35A). Neben dieser langen cDNA konnte eine transgespleißte Form isoliert werden, in der der Spliced-Leader am 5'-Ende kurz vor dem Start-ATG liegt (Abb. 35B). Ein Aminosäure-Sequenzvergleich ergab hohe Homologien zu humanen Rap2-GTPasen (HsRap2b: 47/60%) und einem Rap2 aus dem Zebrafisch (Abb. 34). Für die zusätzlichen Aminosäuren zwischen AS 104 und AS 125 konnte in Rap2-Proteinen anderer Organismen bisher keine Entsprechungen gefunden werden (Abb. 34). Aufgrund der Homologien des gesamten Proteins wurde das zugehörige Gen *emrap2* genannt.

Mit Primern aus der cDNA-Sequenz und chromosomaler Echinokokken-DNA als Template wurden über PCR Teile des genomischen Locus von *emrap2* amplifiziert, kloniert und charakterisiert. Dabei konnte die chromosomale DNA-Sequenz im Bereich des Leseraster bis auf 111 bp sowie die Position eines Introns von etwa 4-5 kb bestimmt werden (Abb. 35A). Die Introngrenze ist zwischen EmRap2 und den humanen Rap2-Proteinen nicht konserviert.

	← G1 →	← G2 →	← G3 →	
EmRap2	MDEYKVVVLGGVGSALTVRFVTGRFEEKYDPTIEDFYRKEILVNGKACMLEILD TAGSEQFSSIQDLIYIRNGQGFVLVYSIASLQSLLDLEAVHQEI	100		
BrRap2b	MREYKVVVLGSGGVGKSALTVQFVTGSGFIEKYDPTIEDFYRKEIEVDSSPSVLEILD TAGTEQFASMRDLYIKNGQGFILVYSLVNQSSFQDIKPMRDQI	100		
HsRap2A	MREYKVVVLGSGGVGKSALTVQFVTGTFIEKYDPTIEDFYRKEIEVDSSPSVLEILD TAGTEQFASMRDLYIKNGQGFILVYSLVNQSSFQDIKPMRDQI	100		
HsRap2B	MREYKVVVLGSGGVGKSALTVQFVTGTFIEKYDPTIEDFYRKEIEVDSSPSVLEILD TAGTEQFASMRDLYIKNGQGFILVYSLVNQSSFQDIKPMRDQI	100		
HsRap2C	MREYKVVVLGSGGVGKSALTVQFVTGTFIEKYDPTIEDFYRKEIEVDSSPSVLEILD TAGTEQFASMRDLYIKNGQGFILVYSLVNQSSFQDIKPMRDQI	100		
	← G4 →	← G5 →		
EmRap2	IRFKTKAPSRKSKTSKSPVLP-----PIVLAGNKADLTAVGHREVARADGDAARRWGCCAFVETS AKTGEVMDVFRVVMQM--AQESAKKKGCT	193		
BrRap2b	IRVK-----RYERVPMILVGNKVDLE--GEREVSSGEGKALAEWGC--PFMETS AKNKGSDVDFAEIVRQMNYSAPNGDEQCC	185		
HsRap2A	IRVK-----RYEKVPVILVGNKVDLE--SEREVSSSEGRALAEWGC--PFMETS AKSKTMVDFELFAEIVRQMNYSAAQPKDDPCC	186		
HsRap2B	IRVK-----RYERVPMILVGNKVDLE--GEREVSYGEGKALAEWGC--PFMETS AKNKASVDFELFAEIVRQMNYSAAQSNNGDEGCC	186		
HsRap2C	VRVK-----RYEKVPLILVGNKVDLE--PEREVMSSEGRALVQEWGC--PFMETS AKSKSMVDFELFAEIVRQMNYSLSLPEKQDQCC	186		
	▼	Homologie zu EmRap2		
EmRap2	TGACAIL	-----		200
BrRap2b	S--CAIL	47/59%		192
HsRap2A	S--ACNIQ	47/60%		193
HsRap2B	S--ACVIL	47/59%		193
HsRap2C	T-TCVVQ	48/59%		193

Abb. 34: EmRap2 – Sequenzhomologien.

Abgebildet ist ein Vergleich von EmRap2 mit drei Rap2-GTPasen aus dem Mensch und einer aus dem Zebrafisch. Die angegebenen Sequenzen beziehen sich auf *H. sapiens* Rap2A (HsRap2A; GenBank Accession No. P10114), Rap2B (HsRap2B; X52987) und Rap2C (HsRap2C; Q9BTS0) sowie Rap2B von *B. rerio* (BrRap2B; Q7SY59). Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz aller 5 Proteine übereinstimmen sind grau unterlegt. Mit weißen Pfeilen auf schwarzem Grund sind die katalytisch wichtigen Regionen G1 – G5 markiert. Ein schwarzes Dreieck (▼) markiert das bei allen Ras-GTPasen konservierte Cystein, das prenyliert wird. Die Homologien zwischen EmRap2 und den anderen Rap2-Proteinen ist am Ende der Sequenz in Prozent angegeben.





### 3.5.2 *emrap2* - Echinokokkenspezifität

Der Echinokokken-Spliced-Leader, der am 5'-Ende der *emrap2* mRNA liegt deutet darauf hin, dass *emrap2* tatsächlich ein Faktor des Parasiten und nicht des Wirts ist. Für eine genaue Bestätigung wurden auf chromosomale DNAs des Parasiten *E. multilocularis* und des Laborwirts *M. unguiculatus* PCRs durchgeführt, wobei *emrap2*-spezifische PCR-Produkte nur in der Echinokokken-DNA nachgewiesen werden konnten. Auf der anderen Seite konnte das für den Wirt spezifische  $\beta$ -tubulin [46] nicht aus Echinokokken-DNA sondern nur aus der chromosomalen DNA von *M. unguiculatus* (Gerbil) amplifiziert werden (Abb. 36). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass *emrap2* ein Echinokokkengens ist.

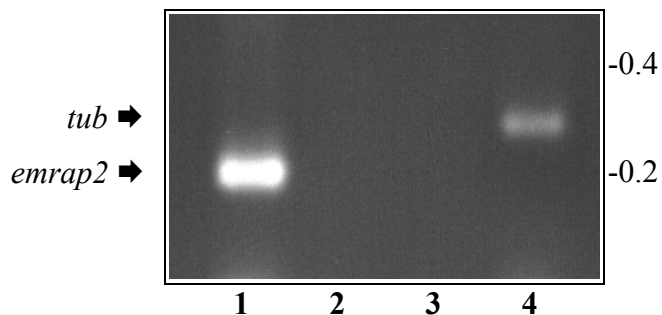


Abb. 36: Nachweis für die Echinokokkenspezifität von *emrap2* über PCR.

Mit chromosomaler DNA aus *in vitro* kultivierten Echinokokken (Spur 1 + 2) und aus dem Gehirn eines uninfizierten Gerbils (Spur 3 + 4) als Template wurden PCRs gegen *emrap2* (Spur 1 + 3) und das wirtsspezifische  $\beta$ -tubulin (Spur 2 + 4) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größenmarker ist rechts in kb angegeben.

### 3.5.3 *emrap2* - Expression in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*

Über RT-PCR wurde die Expression von *emrap2* aus *in vivo* und *in vitro* kultivierten *E. multilocularis*-Larven untersucht. Da *in vivo* gewachsenes *E. multilocularis*-Parasitenmaterial aus zwei Larvenstadien, nämlich dem Metacestoden und dem Protoscolex, besteht, stellte sich die Frage, ob *emrap2* in beiden Stadien exprimiert wird. Dafür wurde RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskelen und aus frisch isolierten Protoscolices (aus *in vivo* kultiviertem Material) isoliert. Ein Teil der Protoscolices wurde aktiviert. Abb. 37 zeigt deutlich die Expression von *emrap2* in beiden Larvenstadien.

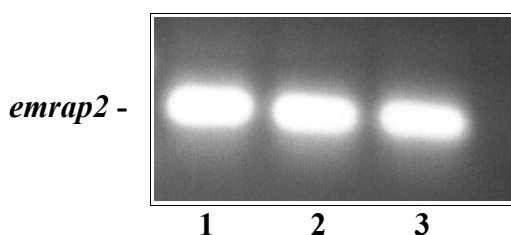


Abb. 37: Expression von *emrap2* in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Gesamt-RNA wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskelen (Spur 1), *in vivo* kultivierten Protoscolices (Spur 2) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten Protoscolices (Spur 3) isoliert. Nach einer genspezifischen RT-PCR wurden die PCR-Produkte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### 3.5.4 EmRap2 bindet kein GTP

Die Sequenzanalysen ergaben, dass EmRap2 zur Rap-Unterfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTP-bindenden Proteine gehört. Um heraus zu finden, ob EmRap2 GTP binden kann, wurde das *emrap2*-Leseraster als 5'-Fusion in den Vektor pBAD/Thiofusion (Invitrogen) kloniert und in *E. coli* rekombinant exprimiert und mit dem resultierenden Protein dann ein GTP-Bindungsassay durchgeführt [170]. Wie in Abb. 38 zu sehen ist, konnte EmRap2 erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden, zeigte jedoch keine GTP-Bindungsaktivität. In einem weiteren Versuch wurde statt [<sup>32</sup>P]-markiertem GTP ein Gemisch aus [<sup>32</sup>P]-markiertem ATP, CTP, TTP und GTP eingesetzt, führte jedoch auch zu keinem positiven Signal.

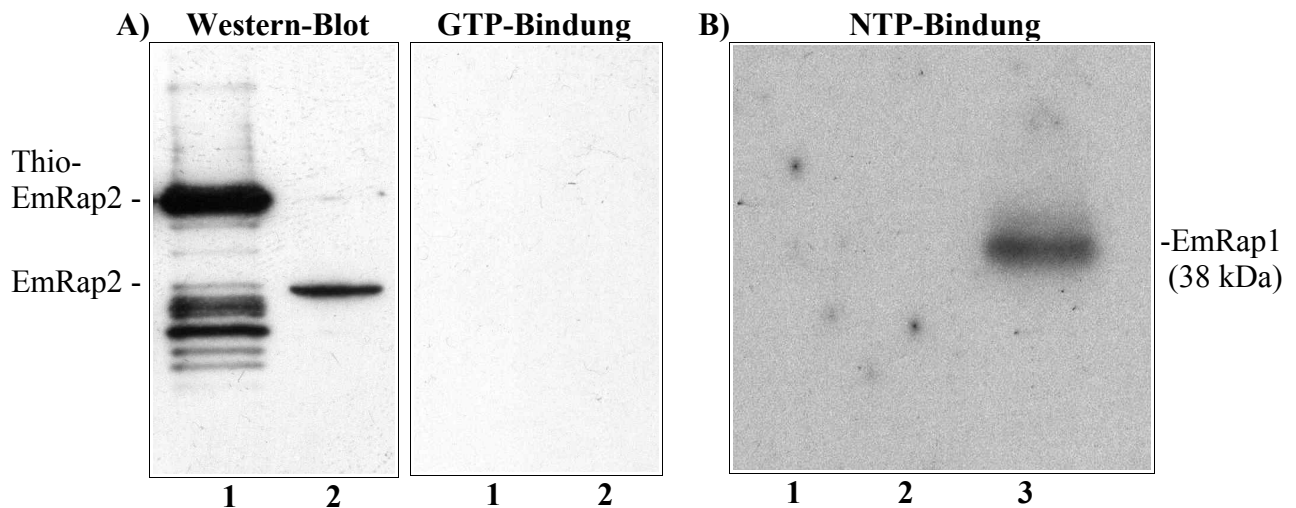


Abb. 38: Rap2 GTP-Bindungsaktivität.

A) EmRap2 (21.7 kDa) wurde translationell am 5'-Terminus mit Thioredoxin und am 3'-Ende mit dem V5-Epitop und einem 6×His-Tag (3 kDa) fusioniert (Spur 1) sowie nur 3'-Terminal mit dem V5-Epitop und einem 6×His-Tag (Spur 2) und dann rekombinant unter der Kontrolle eines arabinoseinduzierbaren Promoters in *E. coli* exprimiert. Das gesamte Zellysate nach der Expressions-Induktion in einem 12.5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Im linken Blot (Western) wurde das rekombinante Protein mit dem anti-V5-Antikörper nachgewiesen. Der rechte Blot (GTP-Bindung) wurde mit  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-GTP inkubiert, gewaschen und für 24 Stunden auf einem Röntgenfilm gelegt. B) EmRap2 wurde wie unter A beschrieben exprimiert und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Spuren 1 + 2). Zusätzlich wurde rekombinant exprimiertes EmRap1 (Spur 3) aufgetragen. Der Blot (NTP-Bindung) wurde mit  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-NTP (ATP, GTP, CTP, TTP) inkubiert, gewaschen und für 24 Stunden auf einen Röntgenfilm gelegt.

### 3.5.5 EmRap2 ist farnesyliert und geranyl-geranyliert

Für die Funktion von Rap2 ist wie bei allen Ras-ähnlichen GTPasen eine Verankerung in zellulären Membranen über kovalent gebundene lipophile Prenylgruppen essentiell [261, 307]. Wie in Abb. 34 und 35 sehen ist, hat EmRap2 am C-Terminus ein kanonisches Prenylgruppen-Bindungsmotiv (C<sup>197</sup>AIL) und davor einen charakteristischen Abschnitt basischer Aminosäuren. Dieses Prenylgruppen-Bindungsmotiv kann entweder durch das Anhängen von Farnesyl oder von Geranylgeranyl modifiziert werden. Um heraus zu finden, welche dieser Prenylgruppen posttranskriptionell an EmRap2 gebunden wird, wurden *in vitro* Prenylierungsexperimente durchgeführt [237, 322]. Dafür wurde EmRap2 rekombinant als C-terminale Fusion von Thioredoxin in *E. coli* exprimiert. Das aufgereinigte Fusionsprotein wurde mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach einer Anfärbung mit Ponceau-Rot wurde die EmRap1-Proteinbande ausgeschnitten und in vier Abschnitte geteilt. Die einzelnen Abschnitte wurden in der Gegenwart von [ $^3$ H] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat in Kaninchen-Reticulocytenextrakt oder Echinokokkenlysate inkubiert. Der Nachweis einer Prenylierung wurde über eine Röntgenfilmexposition erbracht. Sowohl in Kaninchen-Reticulocytenextrakt als auch in Echinokokkenlysate konnte eine starke Farnesylierung sowie eine schwache Geranylgeranylierung beobachtet werden. Die angewandte Methode funktionierte schnell und war im Materialverbrauch sehr sparsam. Die Ergebnisse sind in Abb. 39 dargestellt.

	Geranyl-Geranylierung	Farnesylierung
EmRap1	—	+++
EmRap2	+	+++
EmRas	—	+++
EmRal	+++	—

Abb. 39: Prenylierung der kleinen GTP-bindenden Proteine

Gezeigt ist eine Zusammenstellung der prenylierungs-Experimente der kleinen GTP-bindenden Proteine, die in dieser Arbeit für *E. multilocularis* identifiziert wurden. Markiert ist eine starke (+++), schwache (+) oder keine (—) Prenylierungsreaktion mit eingesetztem Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat oder Farnesyl-Pyrophosphat.

### 3.5.6 EmRap2- *in vivo* Interaktionsstudien mit EmRaf über Yeast-2-Hybrid

Über das Yeast-Two-Hybrid-Systeme lassen sich *in vivo* Interaktionen von kleinen GTP-bindenden Proteinen wie Ras mit Raf oder anderen Faktoren untersuchen [203]. Da mit EmRaf ein potentieller Downstreamfaktor von EmRap2 für *E. multilocularis* charakterisiert wurde, sollten Yeast-Two-Hybrid-Experimente eine Interaktion dieser beiden Faktoren nachweisen. Die Beschreibung und die beobachteten Ergebnisse des durchgeführten Versuchs sind in Kapitel 3.6.5 ausführlich dargestellt (Abb. 45). Für EmRap2 und EmRaf konnte dabei eine starke Interaktion festgestellt werden.

### 3.6 EmRaf

EmRaf ist ein 87 kDa großes Raf-Homolog (40%/67%) aus *E. multilocularis*, das als single-copy-Gen vorliegt und das über die meisten, zur Interaktion mit anderen Proteinen wichtigen, AS-Reste verfügt. Die mRNA von EmRaf ist in den zwei Larvenstadien Metacystode und Protoscolex nachweisbar. Im Y2H interagiert EmRaf mit den GTPasen EmRas, EmRap1 und EmRap2, sowie mit dem potentiellen Effektor EmMKK.

Die für die Charakterisierung von EmRaf angewandten Methoden und die verwendeten Oligonucleotide sowie die identifizierten Sequenzen des chromosomalen Locus, der cDNA und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich in Kapitel 5.17.

#### 3.6.1 *emraf* - Charakterisierung der cDNA

Über eine degenerative PCR, mit Primern die gegen konservierte Regionen der Kinase-Domäne (Abb. 40) gerichtet waren, konnte ein 261 bp langes Fragment aus *E. multilocularis*-cDNA amplifiziert werden. Die fehlenden Sequenzen der cDNA wurde über 5'- und 3'-RACE aus einer plasmidbasierten cDNA-Bibliothek [159] isoliert. Die vollständige *emraf*-cDNA besteht ohne poly(A)-Schwanz aus 2432 bp und enthält ein offenes Leseraster, das für ein 780 AS langes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 87 kDa codiert (Abb. 41). Da dieser Faktor Sequenzhomologien zu bekannten Raf-ähnlichen Kinasen (Abb. 40) aufweist und mit kleinen GTPasen der Ras-Familie interagiert wurde er EmRaf genannt.

Abb. 51 zeigt einen Aminosäurevergleich zwischen EmRaf und Raf-Orthologen aus Säugetier, Nematode und Insekt. Obwohl die Homologien (36 – 41% identisch und 61 – 67% ähnlich) über das gesamte Protein im Verhältnis zu Ras-Orthologen (75 – 78% identisch, vergl. Abb. 11) der gleichen Spezies verhältnismäßig gering sind, sind verschiedene Regionen von EmRaf und der Raf-Kinasen verschiedenen phylogenetischen Ursprungs hoch konserviert (Abb. 40, 41). Das sind die Regionen CR1, in der die Ras-bindungs-Domäne (RBD) und eine Cystein-reiche Domäne (CRD) liegt, die beide für die Interaktion mit Ras-ähnlichen GTPasen wichtig sind, die Region CR2, die reich an Serin- und Threoninresten ist, die von verschiedenen regulierenden Kinasen modifiziert werden und die Region CR3, in der die Tyrosin-Kinasedomäne liegt [205, 83, 137]. Phosphorylierung ist ein wichtiger Mechanismus über den die Aktivität von Raf reguliert wird und über Studien, die vor allem an dem humanen Raf-1 durchgeführt wurden, konnten verschiedene AS-Reste identifiziert werden, die daran beteiligt sind. Die zwei Reste Ser<sup>259</sup> und Ser<sup>621</sup> sind im unstimulierten Zustand von Raf-1 phosphoryliert und bilden die Bindungsstelle für Mitglieder der 14-3-3 Proteinfamilie [205, 83, 137]. Wie in Abb. 40 zu sehen ist sind beide Serin-Reste in EmRaf (Ser<sup>364</sup>, Ser<sup>729</sup>) konserviert und Teil eines 14-3-3 Bindungsmotivs (RxxSxP) [6]. Für die Interaktion von 14-3-3-Proteinen mit Raf-1 sind zudem die zwei Cysteine Cys<sup>165</sup> und Cys<sup>168</sup> wichtig, die Teil eines Zink-Finger-Motiv-bildenden Cystein-Repeats sind [209]. Wie in Abb. 40 gezeigt, sind in EmRaf die entsprechenden Cysteine Cys<sup>237</sup> und Cys<sup>240</sup> vorhanden. Fünf aktivierende, durch Ras induzierbare Phosphorylierungsstellen sind in Raf-1 die Reste Ser<sup>338</sup>, Tyr<sup>340</sup>, Tyr<sup>341</sup>, Thr<sup>491</sup> und Ser<sup>494</sup> [205, 83, 93, 137]. Ser<sup>338</sup> wird von PAK (p21 aktivierte Kinase) phosphoryliert und ist entscheidend für die Aktivierung von Raf [205, 83, 137]. Wie in Abb. 40 gezeigt, ist in EmRaf das entsprechende Ser<sup>450</sup> und Thr<sup>602</sup> auch vorhanden. In Säugerzellen werden die Raf-1-Tyrosine Tyr<sup>340</sup> und Tyr<sup>341</sup> von Src und JAK (Janus aktivierte Kinase) phosphoryliert [205, 83, 93, 137]. In EmRaf sind diese Reste durch Asparaginsäure (Asp<sup>452</sup>) und Lysin (Lys<sup>453</sup>) ersetzt (Abb. 40), was gegen eine Beteiligung von Src- und JAK-Homologen bei der EmRaf-Regulation spricht. Bei Raf-1 führt ein Austausch des Tyr<sup>340</sup> durch ein Asp zu einer nachgeahmten Phosphorylierung was zu einer Steigerung der katalytischen Aktivität der Kinase führt [205] und in humanem B-Raf sind beide Reste durch phosphomimetische Aspartate ersetzt. In EmRaf könnte das Asp<sup>452</sup> eine ähnliche Rolle übernehmen und somit für eine, im Vergleich zu Raf-1, höhere Aktivität im Grundzustand führen.





Die Reste Thr<sup>491</sup> und Ser<sup>494</sup> im Aktivierungs-Loop der Raf-1-Tyrosinkinasedomäne werden Mitogen-induziert phosphoryliert und sind an der Raf-1-Aktivierung beteiligt [205, 83, 137]. Thr<sup>491</sup> ist hoch konserviert unter den Raf-Kinasen verschiedenen phylogenetischen Ursprungs (Abb. 40) und ist auch in EmRaf (Thr<sup>602</sup>) vorhanden. Das Ser<sup>494</sup> von Raf-1 ist in EmRaf durch ein Threonin ersetzt (Thr<sup>605</sup>), ebenso in Raf-Kinasen von *Drosophila* und *C. elegans* (Abb. 40) und da dieses Threonin (Thr<sup>629</sup>) in Lin-45 von *C. elegans* phosphoryliert wird [72], könnte das entsprechende Thr<sup>605</sup> von *E. multilocularis* auch phosphoryliert werden.

Die Kinase KSR (Kinase Suppressor von Ras) ist ein Regulator von Raf-Kinasen in Säugetieren, Insekten und Nematoden [205] und deren Phosphorylierung von Thr<sup>269</sup> in Raf-1 ist nötig für die vollständige Aktivierung von Raf-1 in Antwort auf eine Stimulation durch EGF [341]. In EmRaf, wie auch den Homologen von *Drosophila* und *C. elegans*, ist dieses Threonin nicht vorhanden (Abb. 40), was darauf hindeutet, dass Interaktionen von EmRaf mit einem putativen Echinokokken-KSR-Homolog entweder nicht existieren oder unabhängig von einer Phosphorylierung erfolgen, wie es schon für Ksr-Raf-Interaktionen in *C. elegans* gezeigt wurde [234].

Für die Bindung von MKK1/2 (MEK1/2) sind für Raf-1 die Aminosäuren Ser<sup>338</sup>Ser<sup>339</sup>Tyr<sup>340</sup>Tyr<sup>341</sup> beschrieben, wobei Ser<sup>338</sup> und Tyr<sup>341</sup> phosphoryliert sein müssen. Für eine MKK-Bindung können die Reste Y<sup>340</sup> und Y<sup>341</sup> auch durch phosphomimetische Aspartate ersetzt sein. Durch die Phosphorylierung des Ser<sup>338</sup> und Y<sup>341</sup> kommt es zu einer Konformationsänderung in Raf-1 die zur Bildung von zwei MKK-Bindungsstellen zwischen den AS 325-349 und AS 350-648 führt [339]. In EmRaf sind beide Serine vorhanden und eines der beiden Tyrosine durch ein phosphomimetisches Aspartat ersetzt. Nur für das Lysin an Position K<sup>453</sup> konnte keine Entsprechung in orthologen Raf-Kinasen gefunden werden (*E.m.* S<sup>450</sup>S<sup>451</sup>D<sup>452</sup>K<sup>453</sup>). Durch das Fehlen der beiden regulatorischen Reste Y<sup>340</sup> und Y<sup>341</sup> in EmRaf, gleicht dieses dem B-Raf eines Säugers, in dem diese Reste ebenfalls nicht vorhanden sind.

Eine letzte Gruppe von AS-Resten, die für die Funktion von Raf sehr wichtig sind, sind die Aminosäuren der Ras-Bindungs-Domäne (RBD), die den direkten Kontakt zwischen Ras-ähnlichen GTPasen in Ras/Raf- und Rap/Raf-Komplexen vermitteln. In kristallographischen Studien konnten für Raf-1 sieben dieser Reste bestimmt werden: Arg<sup>89</sup>, Lys<sup>84</sup>, Thr<sup>68</sup>, Arg<sup>67</sup>, Gln<sup>66</sup>, Asn<sup>64</sup> und Arg<sup>59</sup> wobei Gln<sup>66</sup>, Lys<sup>84</sup> und Arg<sup>89</sup> absolut essentiell sind [147, 223]. Wie in Abb. 40 zu sehen ist, sind in EmRaf fünf dieser Reste hoch konserviert und die folgenden zwei ausgetauscht: Asp<sup>137</sup> an Stelle eines Asn (entsprechend Asn<sup>64</sup> im humanen Raf-1) und Phe<sup>140</sup> an Stelle eines Arg (entsprechend Arg<sup>67</sup> im humanen Raf-1).

Sämtliche Ergebnisse der Sequenzanalyse sprechen dafür, dass das hier charakterisierte Protein ein Raf-Homolog aus *E. multilocularis* ist. Es konnten hohe Homologien zwischen EmRaf und anderen Raf-Kinasen in den konservierten Bereichen CR1, CR2 und CR3 sowie den meisten Aminosäure-Resten, die an der Ras/Raf-Interaktion und/oder der Raf-Regulation über Phosphorylierung beteiligt sind, festgestellt werden. Unterschiede betrafen vor allem Phosphorylierungsstellen.

### 3.6.2 *emraf* - Charakterisierung des chromosomalen Locus und Southern-Blot

Die Sequenz des gesamten chromosomalen Locus besteht aus 12.3 kbp und konnte aus überlappenden Fragmenten bestimmt werden, die über PCR mit Primern, die gegen die cDNA-Sequenz von *emraf* gerichtet waren, amplifiziert wurden. Die codierende Region, die von 8 Introns mit Größen zwischen 77 – 2589 bp unterbrochen wird, besteht aus 9 Exons mit Größen zwischen 69 und 743 bp (Abb.41). Alle Introns haben die kanonischen Dinucleotid-Sequenzen GT und AG an ihren Spleißdonor- und ihren Spleißakzeptorstellen. Die 4 Introns I5 – I8, die in der Tyrosinkinase-Domäne lokalisiert sind, teilen mit dem humanen Gen für Raf-1 hochkonservierte Exon-Intron Gren-



zen (Abb. 41). Das deutet stark darauf hin, dass die Raf-Gene des Fuchsbandwurms und des Menschen von einem gemeinsamen evolutionären Vorläufer stammen.

Säugetiere exprimieren drei verschiedene Gene, die für die eng verwandten Raf-Isoformen Raf-1, A-Raf und B-Raf codieren [205, 137]. Um zu überprüfen, ob in *E. multilocularis* neben *emraf* noch weitere Raf-Gene vorhanden sind, wurden Southern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. Dafür wurden eine Sonde aus der Ras-bindungs-Domäne im 5'-Bereich (Sonde A) und eine aus der Tyrosinkinase-Domäne im 3'-Bereich (Sonde B) von EmRaf gewählt. Wenn *emraf* ein single-copy-Gen ist, sollte mit jeder Sonde nur ein Hybridisierungs-Fragment, in mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittener chromosomaler DNA von *E. multilocularis*, nachweisbar sein. Wie in Abb. 42 zu sehen ist, führte eine Hybridisierung mit der Sonde A in chromosomaler DNA, die mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, zu jeweils einem Fragment der erwarteten Größe. Auch die Hybridisierung mit der Sonde B ergab jeweils ein stark reagierendes Fragment der erwarteten Größe, dazu jedoch auch einen Hintergrundschmier von 2 – 12 kb, was am wahrscheinlichsten von Kreuzhybridisierungen der Sonde mit anderen Genen von *E. multilocularis* herrührt, die Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen exprimieren. Trotz dieser Kreuzhybridisierungsfragmente sprechen die Analysen dafür, dass *emraf* als single-copy-Gen in *E. multilocularis* vorliegt.

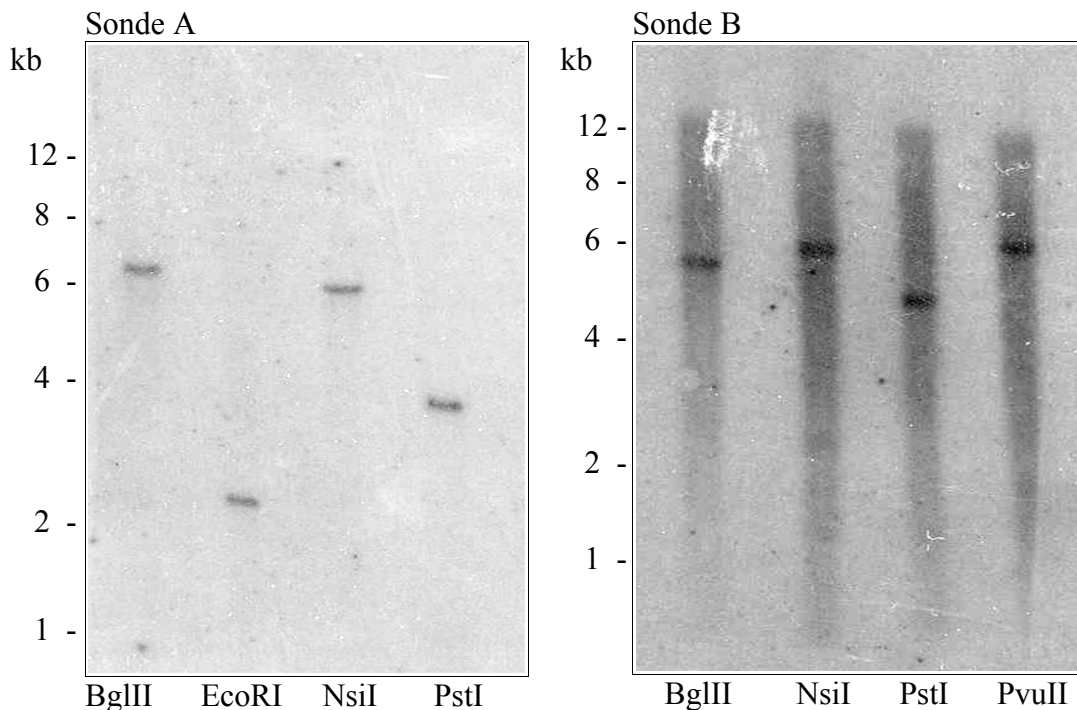


Abb. 42: *emraf*- Southern Hybridisierungen.

Chromosomale DNA von *E. multilocularis* wurde mit den unter den Blots gezeigten Restriktionsenzymen verdaut, in einem 0.8 % Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Membran wurde dann mit Sonden gegen die Ras-bindungs-Domäne (Sonde A) und die Tyrosinkinase-Domäne (Sonde B) von *emraf* untersucht. Die Blots wurden 48 h auf Röntgenfilme gelegt. Links sind die Größenmarker angegeben. Der Hintergrundschmier in B entstand am wahrscheinlichsten durch Kreuzhybridisierungen der Sonde mit anderen Kinase-codierenden Genen von *E. multilocularis*.

### 3.6.3 *emraf* - Echinokokkenspezifität

Da die cDNA-Bibliothek, über die *emraf* isoliert wurde, aus Parasitenmaterial stammte das in Labortieren (*M. unguiculatus*) kultiviert wurde, musste ausgeschlossen werden, dass *emraf* ein Wirtsfaktor ist. Dafür wurden auf die chromosomale DNA von axenisch *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln des Parasiten *E. multilocularis* und auf die chromosomale DNA, die aus der Leber eines uninfizierten Laborwirts *M. unguiculatus* isoliert wurde, PCRs durchgeführt, wobei *emraf*-spezifische PCR-Produkte nur in der Echinokokken-DNA nachgewiesen werden konnten. Auf der anderen Seite konnte das für den Wirt spezifische  $\beta$ -*tubulin* [46] nicht aus Echinokokken-DNA sondern nur aus der chromosomalen DNA von *M. unguiculatus* (Gerbil) amplifiziert werden (Abb: 43). Diese Ergebnisse zeigen, dass *emraf* ein Echinokokkengen ist.

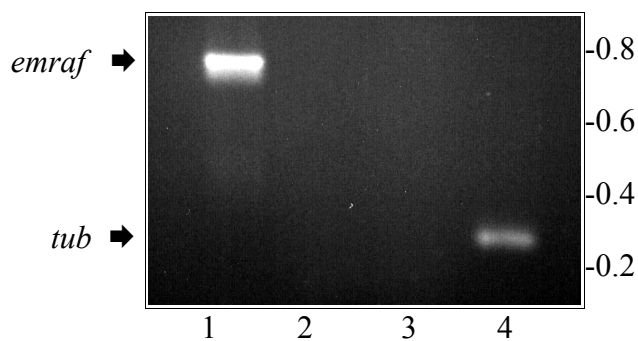


Abb. 43: Nachweis für die Echinokokkenspezifität von *emraf* über PCR.

Mit chromosomaler DNA aus *in vitro* kultivierten Echinokokken (Spur 1 + 2) und aus dem Gehirn eines uninfizierten Gerbils (Spur 3 + 4) als Template wurden PCRs gegen *emraf* (Spur 1 + 3) und das wirtsspezifische  $\beta$ -*tubulin* (Spur 2 + 4) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größenmarker ist rechts in kb angegeben.

### 3.6.4 *emraf* - Expression in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*

In verschiedenen Versuchsansätzen wurde über RT-PCR die Expression von *emraf* aus *in vivo* und *in vitro* kultivierten *E. multilocularis*-Larven untersucht. Zuerst wurde RNA aus Gesamtlarvenmaterial von infizierten Laborwirten (*M. unguiculatus*) isoliert. Wie in Abb. 44 zu sehen ist, konnte die Expression der korrekt gespleißten mRNA in drei verschiedenen natürlichen und klinischen Isolaten (H95, Süddeutschland; K188, Südösterreich; MP1, Patientenisolat aus Süddeutschland) unterschiedlicher geographischer Herkunft nachgewiesen werden. Da *in vivo* gewachsenes *E. multilocularis*-Parasitenmaterial aus zwei verschiedenen Entwicklungsstadien, nämlich dem Metacestoden und dem Protoscolex, besteht, stellte sich die Frage, ob *emraf* in beiden Stadien exprimiert wird. Dafür wurde RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln und aus frisch isolierten Protoscolices (aus *in vivo* kultiviertem Material) isoliert. Abb. 44 zeigt deutlich die Expression von *emraf* in beiden Larvenstadien.

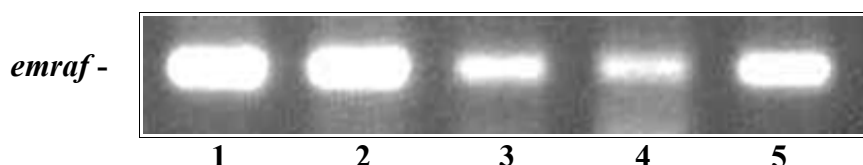


Abb. 44: Expression von *emraf* in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Gesamt-RNA wurde aus dem Larvenmaterial der drei Echinokokken-Isolate K188 (Spur 1), H95 (Spur 2) und MP1 (Spur 3) nach Kultivierung in Labortieren, oder aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (Spur 4) und Protoscolices (Spur 5). Nach einer genspezifischen RT-PCR wurden die PCR-Produkte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### 3.6.5 EmRaf - *In vivo* Interaktionen mit verschiedenen *E. multilocularis*-Faktoren

In der MAP-Kinase-Kaskade nimmt Raf eine zentrale Stellung ein. Signale werden durch kleine GTP-bindende Proteine der Ras-Familie in Verbindung mit verschiedenen anderen Faktoren, wie z.B. 14-3-3, über Raf an das nachfolgende MKK und schlussendlich auf die MAP-Kinase übertragen (siehe Einleitung). In den, im Folgenden beschriebenen, Yeast-Two-Hybrid-Versuchen wurden *in vivo* Interaktionen zwischen EmRaf und den GTPasen EmRas, EmRap1, EmRap2 und EmRal, sowie dem potentiellen EmRaf-Interaktor Em14-3-3.2 und dem möglicherweise als nachfolgenden Effektor dienenden EmMKK untersucht. Eine genaue Beschreibung des Gal4-basierten Yeast-Two-Hybrid-Systems ist in Kapitel 5.7 zu finden und die Beschreibung der eingesetzten Plasmide unter 5.13.5.

	Gal4-AD-Fusionen		
	AD-EmRaf	AD-T-Ag	AD
Gal4-BD-Fusionen			
BD-EmRas	+++	—	—
BD-EmRap1	+	—	—
BD-EmRap2	+++	—	—
BD-EmRal	—	—	—
BD-Em1433.2	(■)	—	—
BD-EmMKKA	+++	—	—
BD-EmMKKB	—	—	—
BD-Lamin	—	—	—
BD-p53		+++	
BD	—		

Abb. 45: EmRaf - Yeast-Two-Hybrid Experimente mit verschiedenen *E. multilocularis*-Faktoren.

Es wurden Translationsfusionen von EmRaf mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und den GTPasen EmRas, EmRap1, EmRap2 und EmRal sowie Em1433.2, EmMKKA und EmMKKB mit der Gal4-Bindungsdomäne (BD) hergestellt. Doppeltransformatanten des Hefestamms AH109 wurden dann nach 3 Tagen Inkubation auf Koloniewachstum überprüft. Als Kontrollen wurden Plasmide des MATCHMAKER-Y2H-Kits (Clontech) benutzt, die eine Fusion zwischen der Aktivierungsdomäne AD und dem großen Antigen des Simianvirus 40 (T-Ag) und der Bindungsdomäne BD mit murinem p53 (Positivkontrolle) oder mit humanem Lamin C (Negativkontrolle) exprimieren. Gezeigt ist entweder kein Wachstum (—) oder Wachstum unter mittleren (+) oder stark (+++) stringenten Bedingungen. Leere Felder zeigen nicht durchgeführte Kombinationen an. Leichtes Wachstum der Kombination AD-EmRaf x BD-Em14-3-3.2 ist in Klammern (■) dargestellt und wahrscheinlich unspezifisch.

Die Interaktion zwischen Raf und GTPasen der Ras-Familie ist einer der Hauptauslöser der MAPK-Kaskade in tierischen Zellen [205, 116, 137, 178]. In verschiedenen Studien wurde das Y2H-System ausführlich für die Untersuchung dieser Interaktionen und zur Identifizierung von AS-Resten, die wichtig für die Ras/Raf-Komplexbildung sind, angewendet [320]. Für die entsprechenden Versuche wurde jeweils eine EmRaf-AD-Fusion mit einer EmRas-BD-, EmRap1-BD-, EmRap2-BD- oder EmRal-BD-Fusion in Hefen exprimiert und deren Wachstum auf selektiven Nährböden erfasst. Aufgrund der AS-Sequenzen in den Effektordomänen der GTPasen wurden für alle, außer EmRal, Interaktionen mit EmRaf erwartet. Wie in Abb. 45 gezeigt, konnten starke Interaktionen zwischen EmRaf und EmRas sowie für EmRaf und EmRap2 beobachtet werden, eine mittelstarke Interaktion fand zwischen EmRaf und EmRap1 statt und wie erwartet war keine Reaktion zwischen EmRaf und EmRal nachweisbar.

Säugetier-Raf-1 wird durch ein phosphoryliertes Ser<sup>259</sup> in eine sich selbst inhibierende Form überführt, die durch 14-3-3-Dimere stabilisiert wird [361]. Der Versuch eine Interaktion zwischen EmRaf und Em14-3-3.2 nachzuweisen konnte nicht erbracht werden, was vermutlich an der fehlenden Phosphorylierung lag, denn das entsprechende Serin ist bei EmRaf an Position Ser<sup>364</sup> vorhanden (Abb. 45). Während des Versuchs konnte jedoch unter nicht stringenten Bedingungen ein, im Vergleich zu den Kontrollen, sehr starkes Wachstum und unter mittelstarken Bedingungen ein leicht stärkeres Wachstum der Hefen, die ein Em-14-3-3.2 enthielten, beobachtet werden.

Im ERK-Signalweg wird MKK durch Raf aktiviert [358]. Diese Interaktion konnte auch für EmRaf und EmMKK-A eindeutig nachgewiesen werden. Für die differentiell gespleißte Variante EmMKK-B, der ein großer Teil der Kinasedomäne fehlt, konnte dagegen keine Interaktion mit EmRaf nachgewiesen werden (Abb. 45).

Über die Yeast-Two-Hybrid-Versuche konnten die drei, im Signalweg oberhalb liegenden, GTPasen EmRas, EmRap1 und EmRap2 sowie die nachfolgende EmMKK-A-Spleißform als Interaktionspartner von EmRaf bestimmt werden. Eine Interaktion von EmRaf mit Em14-3-3-2 ist nicht deutlich und vermutlich ein Artefakt, hervorgerufen durch die beobachtete wachstumsanregende Wirkung in der Hefe.

### 3.7 Em14-3-3.2

Em14-3-3.2 ist ein 27.8 kDa großes 14-3-3-Homolog aus *E. multilocularis*. Die mRNA von Em14-3-3.2 ist in den zwei Larvenstadien Metacestode und Protoscolex nachweisbar. Im Y2H interagiert Em14-3-3.2 schwach mit EmRaf sowie mit sich selbst, außerdem führt die alleinige Anwesenheit von Em14-3-3.2 in Hefen zu einem deutlich stärkeren Wachstum.

Die für die Charakterisierung von Em14-3-3.2 angewandten Methoden und die verwendeten Oligonucleotide sowie die identifizierten Sequenzen des chromosomalen Locus, der cDNA und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich in Kapitel 5.22.

#### 3.7.1 *em14-3-3.2* - cDNA und genomischer Locus

Ausgehend von der codierenden Sequenz für Em14-3-3.1 [288] sollte ein möglicher Interaktionspartner für EmRaf aus Echinokokken-cDNA isoliert werden. Die beschriebene Sequenz konnte jedoch nicht über PCR amplifiziert werden. Daher wurden mit den 5'- und 3'-Primern der *em14-3-3.1*-Sequenz 5'-Prime- und 3'-Prime-Races durchgeführt. Im Anschluss konnte dann mit einem neuen 5'-Primer und dem vorhandenen 3'-Primer eine cDNA-Sequenz von 914 bp (ohne poly(A)-Schwanz) amplifiziert werden, die ein Leseraster für eine bis dahin unbekannte Em14-3-3-Isoform enthielt (vergleiche cDNA- und AS-Sequenz in Kapitel 5.22). Das daraus abgeleitete Protein ist 248 AS lang, hat eine Masse von 27.8 kDa und wurde Em14-3-3.2 genannt. Die Abbildung 46 zeigt, dass *em14-3-3.2* ein echinokokkenspezifischer Faktor ist und in Abbildung 47 ist die Expression von *em14-3-3.2* in verschiedenen Larvenstadien zu sehen.

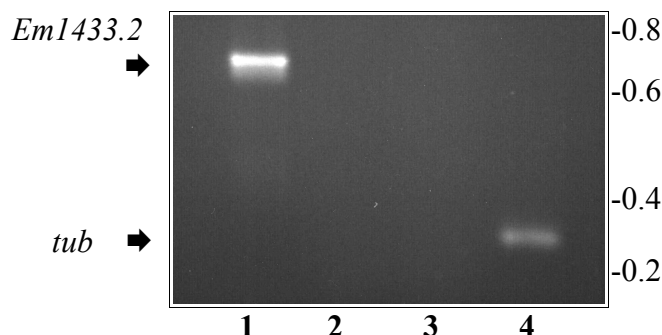


Abb. 46: Nachweis für die Echinokokkenspezifität von *em14-3-3.2* über PCR.

Mit chromosomaler DNA aus *in vitro* kultivierten Echinokokken (Spur 1 + 2) und aus dem Gehirn uninfizierter Rennmäuse (Spur 3 + 4) als Template wurden PCRs gegen *em1433-2* (Spur 1 + 3) und das wirts-spezifische  $\beta$ -*tubulin* (Spur 2 + 4) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel auf-getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größen-marker ist rechts in kb angegeben.

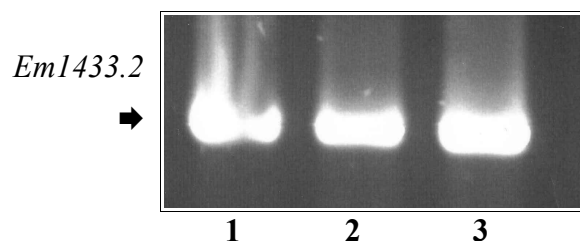


Abb. 47: Expression von *em14-3-3.2* in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Gesamt-RNA wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (Spur 1), *in vivo* kultivierten Protoscolices (Spur 2) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten Protoscolices (Spur 3) isoliert. Nach einer genspezifischen RT-PCR wurden die PCR-Produkte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die Sequenz des chromosomalen Locus von *em14-3-3.2* besteht aus 981 bp und konnte über eine einzelne PCR-Amplifikation bestimmt werden. Die codierende Sequenz wird von zwei kleinen Introns mit 43 bzw. 42 bp unterbrochen. Beide Introns haben die kanonischen Dinucleotid-Sequenzen GT und AG an ihren Spleißdonor- und ihren Spleißakzeptorstellen (vergl. Sequenz in Kapitel 5.22)

Nach der Veröffentlichung von Em14-3-3.2 durch eine andere Arbeitsgruppe [229] wurde eine weiterführende Charakterisierung abgebrochen.

### 3.7.2 Em14-3-3.2 - *in vivo* Interaktionsstudien über Yeast-2-Hybrid-Experimente

Humanes Raf-1 wird durch ein phosphoryliertes Ser<sup>259</sup> in eine sich selbst inhibierende Form überführt, die durch 14-3-3-Dimere stabilisiert wird [361]. Eine genaue Beschreibung des Gal4-basierten Yeast-Two-Hybrid-Systems ist in Kapitel 5.7.3 zu finden und die Beschreibung der eingesetzten Plasmide unter 5.13.5.

In den, im Folgenden beschriebenen, Yeast-Two-Hybrid-Versuchen wurden *in vivo* Interaktionen zwischen EmRaf und dem potentiellen EmRaf-Interaktor Em14-3-3.2 untersucht. Außerdem sollte über den Yeast-Two-Hybrid eine Dimerisierung von Em14-3-3.2 nachgewiesen werden (Abb.: 48). Eine spezifische Interaktion unter stringenten Bedingungen konnte weder für die Kombination AD-EmRaf x BD-Em14-3-3.2 noch für die Kombination AD-Em14-3-3.2 x BD-Em14-3-3.2 nachgewiesen werden. Unter mittel stringenten Wachstumsbedingungen konnte für beide Kombinationen schwaches Wachstum beobachtet werden (Abb.: 48). Zusätzlich konnte, unter Wachstumsbedingungen für die Selektion der Doppeltransformanden, in Anwesenheit von Em14-3-3.2 (AD- oder BD-Fusion) ein deutlich stärkeres Wachstum der Hefen festgestellt werden.

		Gal4-AD-Fusionen			
		AD-EmRaf	AD-Em1433.2	AD-T-Ag	AD
Gal4-BD-Fusionen	BD-Em1433.2	(■)	+	—	—
	BD-Lamin	—	—	—	—
	BD-p53		—	+++	—
	BD		—	—	—

Abb. 48: Yeast-Two-Hybrid Experimente mit Em14-3-3.2.

Es wurden Translationsfusionen von EmRaf und Em1433.2 mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD), sowie von Em1433.2 mit der Gal4-Bindungsdomäne (BD) hergestellt. Doppeltransformanden des Hefestamms AH109 wurden dann nach 3 Tagen Inkubation auf Koloniewachstum überprüft. Als Kontrollen wurden Plasmide des MATCHMAKER-Y2H-Kits (Clontech) benutzt, die eine Fusion zwischen der Aktivierungsdomäne AD und dem großen Antigen des Simianvirus 40 (T-Ag) und der Bindungsdomäne BD mit murinem p53 (Positivkontrolle) oder mit humanem Lamin C (Negativkontrolle) exprimieren. Gezeigt ist entweder kein Wachstum (—) oder Wachstum unter mittleren (+) oder stark (+++) stringenten Bedingungen. Leere Felder zeigen nicht durchgeführte Kombinationen an. Leichtes Wachstum der Kombination AD-EmRaf x BD-Em14-3-3.2 ist in Klammern (■) dargestellt und wahrscheinlich unspezifisch.

### 3.8 EmMKK-A/B

EmMKK-A ist ein 38 kDa großes MKK-Homolog (43%/63%) aus *E. multilocularis*, das als single-copy-Gen vorliegt. Zusätzlich konnte mit *mkk-B* eine zweite Spleißvariante isoliert werden, der ein Teil der Kinasedomäne fehlt, und die für das 29 kDa große Protein MKK-B codiert. Die mRNA von EmMKK-A und EmMKK-B ist in den zwei Larvenstadien Metacestode und Protoscolex nachweisbar. Im Y2H interagiert nur EmMKK-A mit EmRaf. Keine Interaktion konnte zwischen EmMKK-A/B und EmERK-A nachgewiesen werden.

Die für die Charakterisierung von EmMKK-A/B angewandten Methoden und die verwendeten Oligonucleotide sowie die identifizierten Sequenzen des chromosomalen Locus, der cDNAs und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen finden sich in Kapitel 5.16.

#### 3.8.1 *emmkk* - Charakterisierung der cDNA

Die vollständige cDNA von *emmkk* konnte während der Sequenzierung einer cDNA-Bank isoliert werden. Sie ist ohne Poly(A)-Schwanz 1298 bp lang und enthält ein offenes Leseraster, das für ein 339 AS langes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 38 kDa codiert (Abb. 49). Ein Aminosäure-Sequenzvergleich ergab Homologien zu MKK-Proteinen verschiedenen phylogenetischen Ursprungs (Abb. 50), daher wurde das zugehörige Gen *emmkk* genannt. Da neben der, dem Leseraster entsprechenden, cDNA noch eine um 215 bp kürzere Spleißvariante isoliert werden konnte (Abb. 49 + 50) wurde das resultierende Protein der langen Form EmMKK-A und das der kurzen EmMKK-B genannt.

In Abbildung 50 ist ein Aminosäurevergleich zwischen EmMKK-A und MKK-Orthologen aus Säugetier, Nematode und Insekt gezeigt. Die Homologien (39 – 43% identisch und 59 – 63% ähnlich) sind über die gesamte Sequenz des Proteins, vor allem aber in der Kinasedomäne hoch. Die im N-terminalen Bereich der Kinasedomäne lokalisierte ATP-Bindungsstelle (EmMKK-A, AS 60 - 68) zeigt zwischen EmMKK-A und den MKK-Orthologen große Homologien, aber keine Konsensussequenz. Der für die ATP-Bindung relevante Protonenakzeptor Asp<sup>180</sup> mit den vergleichbaren Resten aller gezeigten MKK an identischer Stelle vorhanden. Die für die Kinasefunktion wichtigen Reste Asp<sup>179</sup> und Lys<sup>181</sup> sind vorhanden, während statt des erwarteten Glu<sup>99</sup> in EmMKK-A und allen MKK-Orthologe außer CeSek1 (*C. elegans*) an dieser Stelle ein Asp gefunden wurde. Mehrere Serinreste, deren Phosphorylierung einen Einfluß auf die Aktivität von besser untersuchten MKK-Orthologen zeigt, konnten in EmMKK-A an gleicher Stelle gefunden werden. Vorhanden sind die Serine Ser<sup>207</sup> und Ser<sup>211</sup> im Aktivierungsloop, für die bei humanem MKK1 und MKK2 beschrieben ist, daß sie durch Raf phosphoryliert werden und dadurch MKK aktivieren [8]. Zwei weitere, regulative Serinreste sind für humanes MEK1 beschrieben und in EmMKK-A konserviert vorhanden. Ser<sup>331</sup> wird in humanem MKK1 von PAK1 phosphoryliert, unterstützt die Aktivierung von MKK1 durch Raf-1 [75] und ist in EmMKK-A (Ser<sup>285</sup>) konserviert. Ser<sup>212</sup> wird in humanem MKK1 von einer bisher unbekanntenen Kinase phosphoryliert, hemmt die Aktivierung durch Raf-1 [124] und ist in EmMKK-A (Ser<sup>101</sup>) konserviert. Die Bindung von MKK an Interaktionspartner erfolgt über ein N-terminales Kinase-Interaktionsmotiv (KIM) mit der Konsensussequenz **RR XXX V/L X L** [178]. Wie in Abbildung 63 zu sehen ist, besitzt EmMKK-A im N-Terminus zwei dieser KIM-Sequenzen.

Abb. 49 S. 62 o.: cDNA-Sequenz, abgeleitete Aminosäuresequenz und Struktur des genomischen Locus von *emmkkA*.

Gezeigt ist die gesamte cDNA-Sequenz (oben) von *emmkkA* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des EmMCKA-Proteins (unten, fett). Ein Punkt am Ende der Aminosäuresequenz markiert das Stop-Codon. Die Positionen der Introns des genomischen Locus sind mit Pfeilen markiert. Für jedes Intron ist die Größe sowie die Sequenz angegeben. Sämtliche Ergebnisse der Sequenzanalyse sprechen dafür, dass das hier charakterisierte Protein ein MKK-Homolog aus *E. multilocularis* ist. Es konnten hohe Homologien zwischen EmMCKK und MKK-Orthologen anderer Organismen im gesamten konservierten Bereich der Kinasedomäne, vor allem den wichtigen Phosphorylierungsstellen, festgestellt werden. Zusätzlich besitzt EmMCKK-A zwei N-terminale Kinase-Interaktionsmotive (**RR XXX L/V X L**). Start- und Stop-Codon sind unterstrichen. Grau unterlegt ist das Exon 4, das im Fall von *emmkkB* gemeinsam mit Intron 3 und Intron 4 herausgespleißt wird. Die Aminosäuren der Kinasedomäne sind weiß auf schwarzem Grund markiert.

GTTTGCCTTGTGTGTAATATCGAGTTCGGCTGTGCCTCCGCATTATTTTCCCTCACTCTGGATGTCAGCCGTTTCGTTAGGCCATTGCCGCTGAATCTTG	100
<b>M S A V R R P L P L N L</b>	<b>12</b>
<b>R R X X X V X L</b>	
GCGAAACTCGTCCGATTCCTGGTGTATATTGCGGTTGAAATTGGACCTAGCACTCAGCTCAGCAATCGTACTGATGTCAATTATTAACGGTCAGAAAGT	200
<b>G E T R R I P G V I L P V E I G P S T Q L S N R T D V I I N G Q K V</b>	<b>46</b>
<b>Intron 1 (2705 bp):</b> ↓GTGCG...TGAAG	
CACAATAGATGCAAGAGATTTGGAGGTGAAAGAAGAAATTAGGTCGAGGAGAAATATGCGGGTCCATCGGATGTACCACGCCAGCAAGTGTGAATTT	300
<b>T I D A R D L E V K E E L G R G E Y A R V H R M Y H A P S K C E F</b>	<b>79</b>
GCGGTAAAGAGACTGCCATTTGAAGTAGAGACTCGGATCGCTACGCATTCTTAACGACTGGAATGTGAGCATGCGCACCAGCACCTGCCCTACGCCG	400
<b>A V K R L P F E V E T S D R S R I L N D W N V S M R T S T C P Y A</b>	<b>112</b>
<b>Intron 2 (2525 bp):</b> GTATC...TTCAG ↓	
TCCTTCCTACGGCGCCCTTTCCGTCGGTGGGAGTTTTGGGTGGTCATGGAAGTCTGATGACTCCCTAGATAAATTTCTCCAAAAGGTTTACGCACA	500
<b>V L S Y G A L S V G C E F W V V M E L M D D S L D K F L Q K V Y A Q</b>	<b>146</b>
AGGAAAAATAATCCCGGAGAACTTCTAGCCTACGTTGCTTTTTGTGTAGTCACTGCGTGGAGTACCTGCGAAAGGATCTTGTACTATGCACCCGGAT	600
<b>G K I I P E N L L A Y V A F C V V T A L E Y L R K D L V T M H R D</b>	<b>179</b>
<b>Intron 3 (1011 bp):</b> ↓GTAG...CGAAG	
GTCACGCCCTCCAACATCTCTATTGACCGCGCCGACGTAAGGTTTGGCAGTACCGCGTTCGGGAGAGTTGAAGAAGTCCATGCCCGAGCAACA	700
<b>V K P S N I L I D R A G H V K V C D Y G V S G E L K N S M A Q S N</b>	<b>212</b>
CGGGCACCTGTGCTATATGGCGCCGAGCGTATTGATCCAGTCCGAGCGCCGGTGGTGGTTCCGTATTCAAGCGGACGCTGGAGTTGGGACTCAC	800
<b>T G T C R Y M A P E R I D P S R S A G G G F R I Q A D V W S L G L T</b>	<b>246</b>
<b>Intron 4 (3626 bp):</b> ↓GTAAG...TGTAAG	
GCTTCTTGAAGTGGTACTGGTAAACACCCCTACGAAAGCTTCGTCAATCAGTTTGAAGTCTTCAAAACATGTTGGTTCACGAGCACCCGCAAAATGTGCCG	900
<b>L L E L A T G K H P Y E S F V N Q F E L L K H V V H E A P P N V P</b>	<b>279</b>
GAATCGGTGCCCTACTCGCAAGACTTTCGAGACATTGTGTGCGAGTGTCTAGTGAAGGAGAACTGCTCGCGCCAACTACCTGCGTCTCTCGACTCGC	1000
<b>E S V P Y S Q D F R D I V S Q C L V K E E S A R A N Y L R L L D S</b>	<b>312</b>
CCTTCTTCGCGAGTGTCTGCGTGAACGCGATGCACCCCTCATGGCCAAATTTGTCTCTTCCATTCTTGATCACCATAATGCACTCGCCCTCTTCACTCTTC	1100
<b>P F L R S V C V E R D A P L M A Q F V S S I L D H Q .</b>	<b>338</b>
CCCTCAAGGCACCCACACTGTCTCTCTCCCTTTCTCTCTCCCATGTACCACCGCCAAATCGCTCTCAATTCCGCTACAGCTACAGCGAGAGCA	1200
CCTTAGCGCTTTTTTAAATACCCCTTCTCTCTCTCCCTGCTGCTCCGAGTCAAAACCTACCTTGTAGTAACTAAATAAGCAACTGATTGTGATGAGAA	1300
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

Abb. 49: cDNA-Sequenz, Aminosäuresequenz und Struktur des genomischen Locus von *emmkA* (s. vorherige Seite)

EmMkK	<b>MSAVRRPLPLN</b> -----L <b>GETRRIPGVILE</b> -----VEIGPSTQLSNRTDVIINGQK--VTIDARDLEVKELGRGEYARVHRMYHAPSKEFAV	81
CeSek1	<b>MERK</b> -----GREERKLPGMKIV-----MPTFVETPTMNELEDCLIKLNFSEEEIEIAADLVVLEELGKGGYIVEKMQHRQSGIIMAV	79
DmMkK	<b>MS</b> -----KRHLTPFTIA----KEPEAAIVPPRNLDSRATIQIGDRT--FDIDADSLKICDLGRGAYGIVDKMRHKQTDVTLAV	75
HsMkK6	<b>MSQSK</b> -----GK-KRNPLGKIPKEAFEPQTSSTPPRDLDSKACTISIGNQN--FEVKADDLEPIMELGRGAYGVVEKMRHVPSGQIMAV	82
HsMkK3	<b>MGVQTLMSRDSQTPHLLSILGKSKRKKDLRISCMS-KPPAENPTPPRNLDSRTFTITGDRN--FEVEADDLVTISELGRGAYGVVEKVRHAQSGTIMAV</b>	97
<b>A E P K</b>		
EmMkK	<b>KRLPFVEVTSDRSRIIENDWNVSMRTSTCPYAVLSYGALSVGCFEWWVMELMDDSLDKFLQKVYAQGKIIIPENLLAYVAFVVTVALEYLRKDLVTMHRDVK</b>	181
CeSek1	<b>KRIKSSINDSQKQKMLNELDACRRSDCCPQMVRFYGFAMFREGDVMICMEVMDTSLDKFYRHYAKIGKHIPEPFIGKMAISVIEGLNFMKEQLNLIHRDVK</b>	178
DmMkK	<b>KRIPMTVINIREQHLRVLMDLIDSMRSSDCPYTVHFGYAMVREGDVMICMEVMDTSLDKFYRHYAKIGKHIPEPFIGKMAISVIEGLNFMKEQLNLIHRDVK</b>	174
HsMkK6	<b>KRIRATVNSQEQKRLMLDLIDSMRTVDCPFTVTFYGFALFREGDVMICMEVMDTSLDKFYRHYAKIGKHIPEPFIGKMAISVIEGLNFMKEQLNLIHRDVK</b>	181
HsMkK3	<b>KRIRATVNSQEQKRLMLDLIDSMRTVDCPFTVTFYGFALFREGDVMICMEVMDTSLDKFYRHYAKIGKHIPEPFIGKMAISVIEGLNFMKEQLNLIHRDVK</b>	197
<b>S S S</b>		
EmMkK	<b>PSNILIDRAGHVKCDYGVSGELKNSMAQSNVTGTCR-YMAPERIDPFRSAGGGFRIQADVWSLGLTLELATGKHPYESFVNOFELKLVVHEAPNPVPE</b>	281
CeSek1	<b>PSNILINRAGQVKICDFGISGHLTNSMARTVQAGCKPYMPPERIDG--TKSAYDVRADVWSLGIITIEIATVGHYANWKTPEFQLKQVVEKPPPKLPM</b>	277
DmMkK	<b>PSNILINRAGQVKICDFGISGVLVDSIAKTIDAGCKPYMAPERIDGQ-GNPAQYDIRSDVWSLGIEMATGRYPYDNWRTPEFQLRQVVEDSPPRLP-</b>	274
HsMkK6	<b>PSNVLLINALGQVKMCDFGISGVLVDSVARTIDAGCKPYMAPERINPE-LNQGYSVKSIDWSLGIEMELAILRFPYDSWGTPEFQLKQVVEEPPSPQLP-</b>	281
HsMkK3	<b>PSNVLLINKEGHVKMCDFGISGVLVDSVARTMDAGCKPYMAPERINPE-LNQGYNVKSVDVWSLGIEMELAILRFPYDSWGTPEFQLKQVVEEPPSPQLP-</b>	297
<b>S</b>		
EmMkK	<b>SVPYSDFRDIVSQCLVKEESARANYLRLLDSFFLRSVVCVERDAPLMAQFVSSILDH---</b>	338
CeSek1	<b>ESGFSVDCQYFVKRCLEKDYNERPKYPELLAMPFMEQARNEKQFSM-ARFINEILDVWRR</b>	335
DmMkK	<b>EGTFSPEFEDFIAVCLQKEYMARPNYEQLLKHSFIVE-HLQRNTDI-SEFVARILDLPDAQPAQ</b>	334
HsMkK6	<b>ADKFSAEFVDFTSQCLKNSKERPTYPELMOHPFFTL-HESKGTDV-ASFVKLILG--D</b>	334
HsMkK3	<b>ADRFSPPEFVDFTAQCLRKNPAERMSYLELMEHPFFTL-HKTKKTDI-AAFVKILG-EDS</b>	352
		Homologie zu EmMkK-A

Abb. 50: EmMkK - Sequenzvergleich.

Gezeigt sind die Sequenzen der *E. multilocularis* EmMkK, der MKK von *C. elegans* (CeSek1; GenBank Accession No. Q95Y19) und *D. melanogaster* (DmMkK3; Af035546-Af035552) sowie die der humanen MKK6 (HsMkK6; U39065) und MKK3c (HsMkK3; U66840). AS-Reste, die mit der Konsensussequenz aller Sequenzen übereinstimmen, sind grau unterlegt. Die Aminosäuren, die von Exon 4 codiert werden, dass im Fall von *emmkB* gemeinsam mit Intron 3 und Intron 4 herausgespleißt wird, sind unterstrichen. Der graue Balken markiert die Threonin/Tyrosin-Kinasedomäne, in dem die für die ATP-Bindung nötigen AS-Reste mit einem A gekennzeichnet sind. P markiert den Protonenakzeptor. E, P und K sind die katalytisch wichtigen Reste der Kinase. Mit einem S sind die u.a. für humanes MEK-1 beschriebenen regulatorischen Serinreste markiert. Die Homologiewerte am Ende der Sequenzen geben den prozentualen Wert an identischen und ähnlichen (in Klammer) Aminosäuren der verschiedenen MKK-Orthologen zu EmMkK-A an.



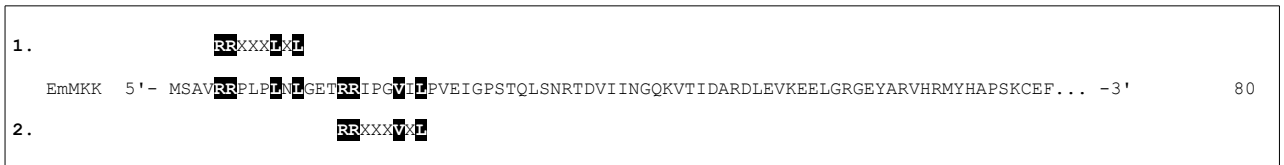


Abb. 51: EmMKK - KIM (Kinase Interaction Motif)

Gezeigt ist die AS-Sequenz des N-terminalen Bereichs von EmMKKA/B (vergl. auch Abb. 49 + 50). Schwarz auf weißem Grund sind die 2 putativen, n-terminal lokalisierten Kinase-Interaktions-Motive (KIM [178]) markiert, über die eine Bindung an Interaktionspartner erfolgt.

### 3.8.2 *emmkk* - Charakterisierung des chromosomalen Locus und Southern-Blot-Analysen

Die Sequenz des gesamten chromosomalen Locus von *emmkk* besteht aus 11135 bp und konnte aus 3 überlappenden Fragmenten bestimmt werden, die über PCR mit Primern, die gegen die cDNA-Sequenz von *emmkkA* gerichtet waren, amplifiziert wurden. Die codierende Sequenz, die von 4 Introns mit Größen zwischen 1011 – 3626 bp unterbrochen wird, besteht aus 5 Exons mit Größen zwischen 156 und 412 bp. Alle Introns haben die kanonischen Dinucleotid-Sequenzen GT und AG an ihren Spleißdonor- und ihren Spleißakzeptorstellen (Abb. 49). Für keines der Introns konnten konservierte Exon-/Introngrenzen mit humanem MEK1, MKK3 und MKK6 oder Sek1 von *C. elegans* festgestellt werden. Einzig die Position von Intron 4 ist mit der in MKK3 von *D. melanogaster* identisch.

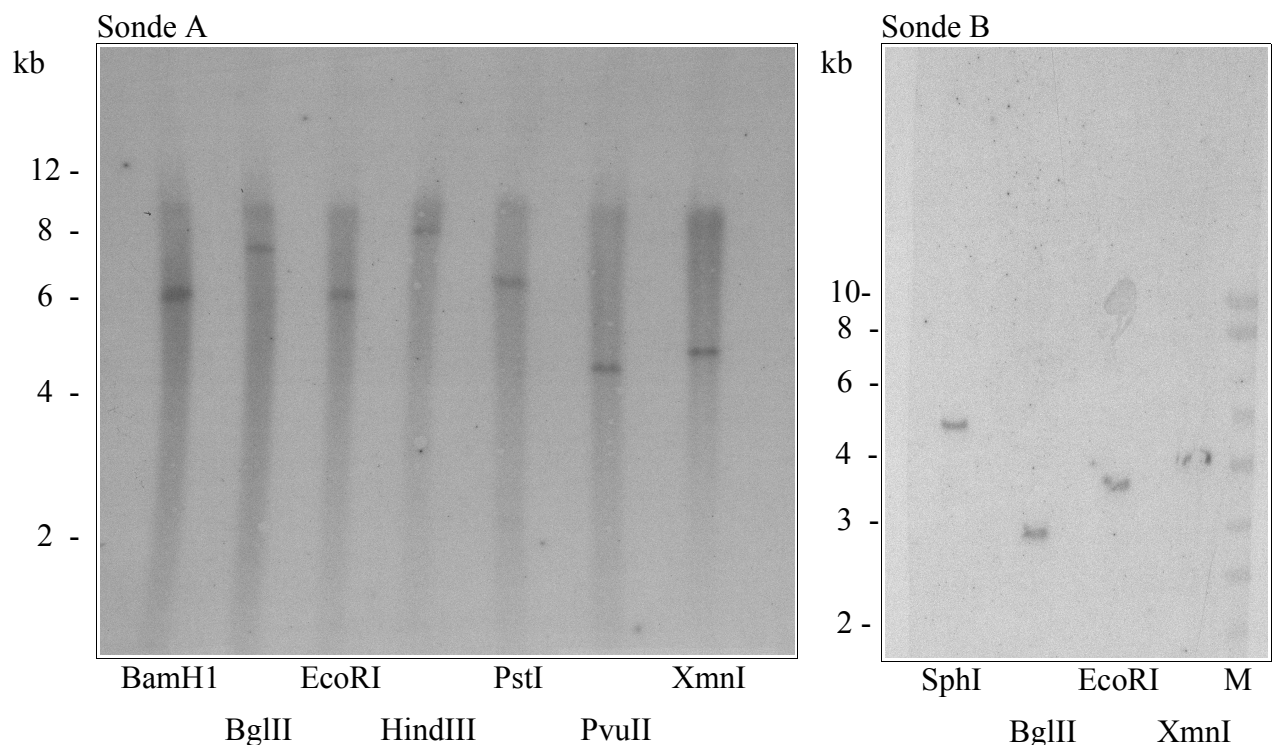


Abb. 52: *emmkk* - Southern-Blot-Hybridisierungen.

Chromosomale DNA von *E. multilocularis* wurde mit den unter den Blots gezeigten Restriktionsenzymen verdaut, in einem 0.8 % Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Membran wurde dann mit Sonden gegen den N-terminalen Teil des Proteins (Sonde A) und die Kinase-Domäne (Sonde B) von *emmkk* untersucht. Die Blots wurden 48 h auf Röntgenfilmen exponiert. Links sind die Größenmarker angegeben. M im rechten Blot gibt den mit der Sonde kreuzhybridisierenden Größenmarker an.

Säugetiere exprimieren verschiedene Gene, die für eng verwandten MKK-Isoformen codieren, wie zum Beispiel MEK1 und MEK2, die beim Menschen 80% identische Aminosäurereste besitzen [358]. Um zu überprüfen, ob in *E. multilocularis* neben *emmkk* noch weitere MKK-Gene vorhanden sind, wurden Southern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. Dafür wurden zwei Sonden amplifiziert, die entweder im N-terminalen Bereich (Sonde A) oder der Kinase-Domäne (Sonde B) von *emmkk* bindet. Wie in Abb. 52 zu sehen ist, führte die Hybridisierung mit der Sonde in chromosomaler DNA, die mit 7 verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, zu jeweils einem Fragment der erwarteten Größe. Auch die Hybridisierung mit der Sonde B ergab jeweils nur ein Fragment der erwarteten Größe. Da jeweils nur ein Fragment detektiert werden konnte, sprechen die Analysen dafür, dass *emmkk* als single-copy-Gen in *E. multilocularis* vorliegt.

### 3.8.3 *emmkk* - differentielles Spleißen führt zu zwei cDNA-Varianten

Bisher konnten von *emmkk* die zwei Spleißvarianten *emmkk-A* (339 AS, 38.0 kDa) und *emmkk-B* (264 AS, 29.8 kDa) isoliert werden. Im Gegensatz zu *emmkk-A* werden bei *emmkk-B* die beiden Introns I3 und I4 nicht getrennt herausgespleißt als ein Fragment gemeinsam mit dem Exon E4. Dadurch verliert *emmkk-B* unter anderem den Teil seiner Kinase-Domäne, der die Serinreste enthält, die in humanem MEK1 durch Raf -1 phosphoryliert werden und dadurch MEK1 aktivieren [339, 8]. In den Abbildungen 49 und 50 ist der Bereich markiert, der in *emmkk-B* herausgespleißt wird. Die Sequenz des resultierenden Proteins EmMCK-B ist in Kapitel 5.16.3 dargestellt. In Abbildung 54 B ist deutlich zu sehen, dass *emmkk-B* in den Larvenstadien Metacestode, Protoscolex und aktiviertem Protoscolex exprimiert wird. Interessanterweise konnte *emmkk-B* nicht im Echinokokkenmaterial eines infizierten Laborwirtes nachgewiesen werden.

### 3.8.4 *emmkk* - Echinokokkenspezifität

Da die cDNA-Bibliothek, über die *emmkk* isoliert wurde, aus Parasitenmaterial stammte das in Labortieren (*M. unguiculatus*) kultiviert wurde, musste ausgeschlossen werden, dass *emmkk* ein Wirtsfaktor ist. Dafür wurden auf die chromosomale DNA von axenisch *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln des Parasiten *E. multilocularis* und auf die chromosomale DNA, die aus der Leber eines uninfizierten Laborwirts *M. unguiculatus* isoliert wurde, PCRs durchgeführt, wobei *emmkk*-spezifische PCR-Produkte nur in der Echinokokken-DNA nachgewiesen werden konnten. Auf der anderen Seite konnte das für den Wirt spezifische  $\beta$ -*tubulin* [46] nicht aus Echinokokken-DNA sondern nur aus der chromosomalen DNA von *M. unguiculatus* (Gerbil) amplifiziert werden (Abb: 53). Diese Ergebnisse zeigen, dass *emmkk* ein Echinokokkengen ist.

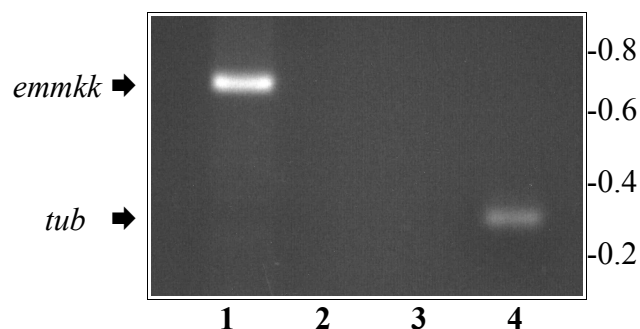


Abb. 53: Nachweis für die Echinokokkenspezifität von *emmkk* über PCR.

Mit chromosomaler DNA aus *in vitro* kultivierten Echinokokken (Spur 1 + 2) und aus dem Gehirn eines uninfizierten Gerbils (Spur 3 + 4) als Template wurden PCRs gegen *emmkk* (Spur 1 + 3) und das wirtsspezifische  $\beta$ -*tubulin* (Spur 2 + 4) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größenmarker ist rechts in kb angegeben.

### 3.8.5 *emmkk* - Expression in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*

Über RT-PCR wurde die Expression von *emmkk* aus *in vivo* und *in vitro* kultivierten *E. multilocularis*-Larven untersucht. Da *in vivo* gewachsenes *E. multilocularis*-Parasitenmaterial aus zwei Larvenstadien, nämlich dem Metacestoden und dem Protoscolex, besteht, stellte sich die Frage, ob *emmkk* in beiden Stadien exprimiert wird. Dafür wurde RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodovesikeln, aus Gesamtlarvenmaterial von *in vivo* kultivierten Echinokokken und aus frisch isolierten Protoscolices (aus *in vivo* kultiviertem Material) isoliert. Ein Teil der Protoscolices wurde aktiviert. Abb. 54 A zeigt deutlich die Expression von *emmkk* in beiden Larvenstadien, während Abb. 54 B die Produkte einer PCR zeigt, über die der Nachweis beider Spleißformen in den verschiedenen Larvenstadien gelang.

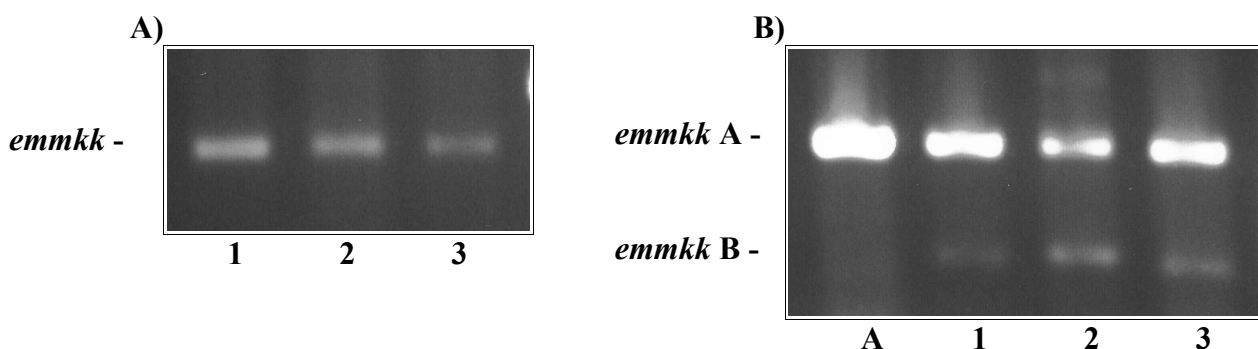


Abb. 54: Expression von *emmkk* in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Gesamt-RNA wurde aus *in vivo* kultiviertem Echinokokken-Material (Spur A) *in vitro* kultivierten Metacestodovesikeln (Spur 1), *in vivo* kultivierten Protoscolices (Spur 2) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten Protoscolices (Spur 3) isoliert. Nach einer RT-PCR wurden die PCR-Produkte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. **A)** Gezeigt sind PCR-Produkte, die *emmkk* ohne Unterscheidung des Spleißstatus nachweisen, da Primer aus dem N-Terminus von *emmkk* gewählt wurden. **B)** Gezeigt sind PCR-Produkte, die die beiden Spleißformen *emmkkA* und *emmkkB* nachweisen.

### 3.8.6 EmMKK - *in vivo* Interaktionen mit EmRaf und EmERK (Yeast-Two-Hybrid)

Im ERK-Signalweg wird MKK durch Raf aktiviert und gibt das Signal an ERK weiter [334]. Um heraus zu finden, ob EmRaf, EmMKK und EmERK Teil einer gemeinsamen Signalkaskade sind, wurde versucht, *in vivo* Interaktionen der genannten Proteine über das Yeast-Two-Hybrid-System (Clontech) nachzuweisen. Die Beschreibung des EmMKK-EmRaf-Experiments ist in Kapitel 3.6.5 beschrieben (Abb. 45). Dafür wurden *emmkk-A* und *emmkk-B* in den BD-Vektor von Clontech kloniert und jeweils mit einem AD-Raf-Vektor in Hefen co-transfiziert. Nach Auswertung des Versuchs konnte für EmRaf und EmMKK-A eine starke Interaktion nachgewiesen werden. Für die differentiell gespleißte Variante EmMKK-B, der ein großer Teil der Kinasedomäne fehlt, konnte dagegen keine Interaktion mit EmRaf nachgewiesen werden (Abb. 45 + 55).

In einem weiteren Experiment wurden Interaktionsstudien mit EmMKK-A/B und EmERK-A/B durchgeführt. Dafür wurden sowohl für EmERK-A/B als auch für EmMKK-A/B AD- und BD-Vektoren konstruiert, anschließend in Hefen transformiert und auf unterschiedlich selektive Agarplatten ausgestrichen. Eine Interaktion zwischen EmMKK-A/B und EmERK-A/B konnte nicht festgestellt werden (Abb. 55).

		Gal4-AD-Fusionen						
		AD-Em Raf	AD-Em MKK-A	AD-Em MKK-B	AD-Em ERK-A	AD-Em ERK-B	AD-T- Ag	AD
Gal4-BD-Fusionen	BD-EmMKK-A	+++			-	-	-	-
	BD-EmMKK-B	-			-	-	-	-
	BD-EmERK-A		-	-			-	-
	BD-EmERK-B		-	-			-	-
	BD-Lamin	-	-	-	-	-	-	
	BD-p53	-	-	-	-	-	+++	
	BD	-	-	-	-	-		

Abb. 55: EmMKK - Yeast-Two-Hybrid Experimente mit EmRaf und EmERK.

Es wurden Translationsfusionen von EmRaf, EmMKKA/B und EmERK-A/B mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und von EmMKKA/B sowie EmERK-A/B mit der Gal4-Bindungsdomäne (BD) hergestellt. Doppeltransformatanten des Hefestamms AH109 wurden dann nach 3 Tagen Inkubation auf Koloniewachstum überprüft. Als Kontrollen wurden Plasmide des MATCHMAKER-Y2H-Kits (Clontech) benutzt, die eine Fusion zwischen der Aktivierungsdomäne AD und dem großen Antigen des Simianvirus 40 (T-Ag) und der Bindungsdomäne BD mit murinem p53 (Positivkontrolle) oder mit humanem Lamin C (Negativkontrolle) exprimieren. Gezeigt ist entweder kein Wachstum (—) oder Wachstum unter mittleren (+) oder stark (++) stringenten Bedingungen. Leere Felder zeigen nicht durchgeführte Kombinationen an.

### 3.9 EmERK-A/B/C

Von EmERK existieren bisher 3 Spleißvarianten (EmERK-A: 42.2 kDa, EmERK-B: 38.01 kDa, EmERK-C: 37.98 kDa) die alle die gleiche Kinasedomäne besitzen und sich nur am C-Terminus unterscheiden. In der Kinasedomäne zeigen EmERK-A/B/C große Homologien zu ERK-Proteinen anderer Organismen (70/81%), an den alternativen C-Termini zeigt nur EmERK-A große Homologien. Funktionell aktiv sind aus Echinokokken-Lysat immunpräzipitierte EmERK und aktivierte rekombinant exprimierte EmERK-A, die in einer Kinasereaktion MBP phosphorylieren können.

Die für die Charakterisierung von EmERK-A/B/C angewandten Methoden und die verwendeten Oligonucleotide sowie die identifizierten Sequenzen des chromosomalen Locus, der cDNAs und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen finden sich in Kapitel 5.15.

#### 3.9.1 *emerk* - Charakterisierung der cDNA und differentielles Spleißen

Über eine degenerative PCR, mit Primern die gegen konservierte Regionen der Kinase-Domäne (Abb. 57) gerichtet waren, konnte ein 411 bp langes Fragment aus *E. multilocularis*-cDNA amplifiziert werden. Die fehlenden Sequenzen der cDNA wurden über 5'- und 3'-RACE aus einer plasmidbasierten cDNA-Bibliothek [159] isoliert. Die vollständige cDNA ist 1209 bp lang und enthält ein offenes Leseraster, das für ein 361 AS langes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 42.2 kDa codiert (Abb. 56). Ein Aminosäuresequenzvergleich zwischen diesem Faktor und ERK-Orthologen aus Säugern, Nematoden und Insekten ergab vor allem in der Kinasedomäne signifikante Homologien (70% identisch und 82% ähnlich mit HsERK1). Aufgrund dieser sehr hohen Sequenzhomologien zu bekannten ERK-ähnlichen Kinasen (Abb. 57) wurde der isolierte Faktor EmERK genannt.

Abb. 57 zeigt einen Aminosäurevergleich zwischen EmERK-A und ERK-Orthologen aus Säugetier, Nematode und Insekt. Die Homologien (65 – 70% identisch und 79 – 81% ähnlich) sind über die gesamte Sequenz des Proteins, vor allem aber in der Kinasedomäne (AS 22 - 310) sehr hoch. In der Kinasedomäne von EmERK-A sind die, für die ATP-Bindung nötigen, Reste IGEGAYGMV<sup>28-36</sup> und Lys<sup>51</sup> sowie der Protonenakzeptor Asp<sup>146</sup> mit den vergleichbaren Resten aller gezeigten ERK identisch [swissprot-Datenbank]. Die für die Funktion von Serin/Threonin-Kinasen wichtigen Reste Glu<sup>68</sup> Asp<sup>146</sup> und Lys<sup>148</sup> sind vorhanden. Die Voraussetzung für die Aktivität von MAP-Kinasen, wozu auch ERK gehört, ist die Phosphorylierung des Threonins (T) und des Tyrosins (Y) im TXY-Motiv des Activation-Loops der Kinasedomäne. Innerhalb der MAP-Kinasen werden die verschiedenen Unterfamilien anhand über die Sequenz dieses TXY-Motivs unterschieden, wobei ERK-Faktoren die Sequenz TEY, JNK/SAPK-Faktoren die Sequenz TGY und p38-MAP-Kinasen die Sequenz TPY aufweisen. Die Phosphorylierung dieser Reste erfolgt in Antwort auf verschiedenste Signale über dualspezifische MAP-Kinase-Kinasen (MKK oder MEK), die beide Reste phosphorylieren. [334]. Wie in Abb. 57 zu sehen ist, besitzt EmERK-A das für die ERK-Unterfamilie beschriebene TEY-Motiv an Position Thr<sup>182</sup>-Glu<sup>183</sup>-Tyr<sup>184</sup>, das identisch mit jenen der drei orthologen ERK-Faktoren ist. Die Interaktion zwischen ERK und anderen Proteinen erfolgt über die CD- und die ED-Domäne. Die CD-Domäne (common docking domain) an der fast alle Proteine, die mit ERK interagieren, binden können liegt im C-Terminus der MAP-Kinasen direkt nach der Kinase-Domäne und besteht aus 2-3 negativ geladenen Aminosäuren deren Sequenz zwischen den verschiedenen MAP-Kinasen variiert [309 + 310]. Für ERK1 und ERK2 der Ratte wurde die Sequenz DXXD [309] beschrieben, die wie in Abb. 57 gezeigt, mit den Resten Asp<sup>335</sup> (D<sup>335</sup>) und Asp<sup>338</sup> (D<sup>338</sup>) in allen drei Spleißformen vorhanden ist. Die für die Spezifität der Bindung zwischen ERK und Proteinfaktoren wichtige ED-Domäne hat keine Konsensussequenz [310]. Wie in Abb. 57 zu sehen ist, entsprechen die ED-Domänen des humanen ERK1 und des *C. elegans*-MPK1 mit den Aminosäuren TT der ED-Domäne des Ratten-ERK2 während in den ED-Domänen des *Droso-*

*phila*-ERKA (K<sup>172</sup>T<sup>173</sup>) und des Echinokokken-ERK-A (R<sup>156</sup>M<sup>157</sup>) bisher nicht beschriebene Sequenzen auftauchen.

Neben dieser ersten, als *emer*k-A bezeichneten cDNA konnten noch zwei weitere *emer*k-cDNAs isoliert werden (*emer*k-B und *emer*k-C), die durch differentielles Spleißen ein am C-Terminus verkürztes Leseraster aufwiesen (Abb.62). Auf die genauen Unterschiede der drei Spleißformen und die daraus resultierenden Eigenschaften wird in Kapitel 3.9.5 eingegangen

Sämtliche Ergebnisse der Sequenzanalyse sprechen dafür, dass das hier charakterisierte Protein ein ERK-Homolog aus *E. multilocularis* ist. Es konnten hohe Homologien zwischen EmERK und ERK-Orthologen anderer Organismen in den konservierten Bereichen der Kinasedomäne sowie den meisten Aminosäure-Resten, die an der Interaktion mit upstram oder downstream gelegenen Faktoren beteiligt sind, festgestellt werden. Unterschiede betrafen vor allem die bisher wenig charakterisierte ED-Domäne.

<i>emer</i> k-A	
CGCTGTTAACATTGTCATTCCCTTGGACTAAGTAATCTTAATAAACTGGCCATTCTAATTCACCAATAATGAGTGGTGATATTTCTGATCCATATACA	100
M S G D I S D P Y T	10
Intron 1 (37 bp): ↓ GTAAG...CGCAG	
ATCAAGGGACAGGTGTTTCGACATTGGTCCGCGTTTTACGAATCTTAATTACATTTGGTGAAGGCGCTTATGGAATGGTTATTCTGCATTTGATCATCAGC	200
I K G Q V F D I G P R F T N L N Y I G E G A Y G M V I S A F D H Q	43
GCAATGAGAGGGTTGCCATTAAGAGAATCACACCATTGAGCACCAAAACATATTTGTCAACGTACCTATCGGGAGATTTCGAATCCTTAGTCGTTTAGACCA	300
R N E R V A I K R I T P F E H Q T Y C Q R T Y R E I R I L S R L D H	77
↓ Intron 2 (34 bp): GTATG...CTTAG	
Intron 3 (28 bp): ↓ GTAAG...TCTAG	
CGAGAACATTATCCACTGTACGATGTTTTTACAACGTCAAATTTTGGAGATATGAAGGAAGTTTACATTGTGAAAAATACATGGAACCTGATCTTTAC	400
E N I I P L Y D V F T T S N F E D M K E V Y I V E K Y M E T D L Y	110
Intron 4 (31 bp): ↓ GTAAC...TTTAG	
AAGTTTTTAAAAGTACAGCAGTTGAGTCGCGAGCACACCTGTTACTTCCCTTTACCAAATGCTTCGAGGCTTGAATAATATACATTCGCCGAACGTTTTGC	500
K F L K V Q Q L S R E H T C Y F L Y Q M L R G L K Y I H S A N V L	143
Intron 5 (425 bp): ↓ GTAGG...TCGAG	
ACCGTGATTTGAAGCCAAGTAATATACTTTTGAATCGAATGTGTGATTGAGGATATGTGATTTGGGCTCGCACGAATTGCCGATCCCCAATGCGATCA	600
H R D L K P S N I L L N R M C D L R I C D D F G L A R I A D P Q C D Q	177
GGCTGGATTGCTGACTGAGTACGTGGCCACTCGCTGGTACCCTGCGCCAGAAATATGCTCACATCGAAAGTCTACACCAAGCCATCGACCTCTGGTCC	700
A G L L T E Y V A T R W Y R A P E I M L T S K V Y T K A I D L W S	210
Intron 6 (579 bp): ↓ GTATC...TCTAG	
ATCGGTTGCATCTAGCCGAGATGTATAGCAACCGGTTCTTTTCCGGGAAACATTATATTGACCAGTTGAAGATGATCTTCTGAGGTTCTCGGTTCCG	800
I G C I L A E M Y S N R V L F P G K H Y I D Q L K M I L E V L G S	243
Intron 7 (2446 bp): ↓ GTGGG...TTTAG	
CTCATCAAGAGGACATCAACTCCATAAGTAACACAAAGGCTAGAACGTACCTGGAGCAGTTGCCAAAACGGAAAAAATACCTGGCAGCAACTCTTCCC	900
P H Q E D I N S I S N T K A R T Y L E Q L P K R K K I P W Q Q L F P	277
Intron 8 (859 bp): ↓ GTACG...TCCAG	
ATTTGCAGACCCAAAGGGTTGGATCTGCTTGATCGTTTACTTTGTTTCGCTCCCTCGCGTCAATAACGGTGAAGAAGCACTGCCCATCCTTACCTG	1000
F A D P K G L D L L D R L L C F A P S R R I T V E E A L A H P Y L	310
Intron 9 (808 bp): ↓ GTGCG...CCCAG ( <i>erk</i> -A-spez.)	
GCACAATACTACGATCCATCTGACGAGCCGACTTGCCCCATCCGTTTGCACACGAAGCAGACGATCTTCCAAGGAGCGTCTTAAGGTTCTTGTTTGGG	1100
A Q Y Y D P S D E P T C P H P F A H E A D D L P K E R L K V L V W	343
Intron 10 (454 bp): ↓ GTATG...TTTAG	
AAGAAATTCAGCATCTGAAGGGGATGAGCAGGCTGAGCCTATAGATGCAGGTTGAAAGTGATCCCATGAAGTGAATCGAATTCAAACGCTATCTTCAA	1200
E E I Q H L K G D E Q A E P I D A G .	361
TGATGAACG	1209

Abb. 56: *emer*k-A, cDNA und abgeleitete Proteinsequenz.

Gezeigt ist die vollständige cDNA-Sequenz von *emer*k-A (oben) und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (unten, fett). Die Kinasedomäne ist grau unterlegt und ein Punkt am Ende der Aminosäuresequenz markiert das Stop-Codon. Die Positionen der Introns im genomischen Locus sind mit Pfeilen markiert. Für jedes Intron ist die Größe sowie die Sequenz des 5'-Donors und des 3'-Akzeptors angegeben.

EmERKA	MS-----GDISDPYTIKGVFDIGPRFTNLNYIGEGAYGMVISAFDHQRNERVAIKRITPFEHQTYCQRTYREIRILSRDLHENI	80
CeMPK1	MADGEAVISTVN-----NVEEVHGQLFEVAPRYVNLVSYIGEGAYGMVASALDITRDRVAIKKISPFHQTYFCQRTLREIKILNRFKHENI	86
DmERKA	MEEFNSSGSSVNVGTGSTVEP---QSNAEVIRGQIFEVGPRYIKLAYIGEGAYGMVVSADDTLTNRVAIKKISPFHQTYCQRTLREITILTRFKHENI	96
HsERK1	MAAAAQGGGGGEPRTTEGVGPGVPGVEVMVKGQPFVGVPRYTQLQYIGEGAYGMVSSADHVRKTRVAIKKISPFHQTYCQRTLREIQILLRFRHENV	100
	.....>	
EmERKA	IPLYDVFTTSNFEDMKEVYIVEKYMETDLYKFLKVQOLSREHTCYFLYQMLRGLKYIHSANVLRDLKPSNILLNRVCDLRLICDFGLARIADPCCDOAGL	180
CeMPK1	INIQEIIRSETVDSLKDIYIVQCLMETDLYKLLKTQKLSNDHVCYFLYQILRGLKYIHSANVLRDLKPSNLLNLTCDLKIICDFGLARVTDPTDHTGF	186
DmERKA	IDIRDILRVDSIQMRDVYIVQCLMETDLYKLLKTQRLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLRDLKPSNLLNLTCDLKIICDFGLARIADPEHDHTGF	196
HsERK1	IGIRDILRASTLEAMRDVYIVQCLMETDLYKLLKKSQOLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLRDLKPSNLLNLTCDLKIICDFGLARIADPEHDHTGF	200
	<.....	
EmERKA	LLEIVATRWRVRAPEIMLNSKYTKSIDVWSVGCILAEMLSNRPLFPGKHYLDQLNLILA VVGSNSADLQCI INDKARSYLISLPHKPKQPWARLYPGAD	280
CeMPK1	LLEIVATRWRVRAPEIMLNSKYTKSIDVWSVGCILAEMLSNRPLFPGKHYLDQLNLILA VVGSNSADLQCI INDKARSYLISLPHKPKQPWARLYPGAD	286
DmERKA	LLEIVATRWRVRAPEIMLNSKYTKSIDVWSVGCILAEMLSNRPLFPGKHYLDQLNLILA VVGSNSADLQCI INDKARSYLISLPHKPKQPWARLYPGAD	296
HsERK1	LLEIVATRWRVRAPEIMLNSKYTKSIDVWSVGCILAEMLSNRPLFPGKHYLDQLNLILA VVGSNSADLQCI INDKARSYLISLPHKPKQPWARLYPGAD	300
	<.....	
EmERKA	PKGLDLLDRLLCFAPSRRITVEEALAHPYLAQYYDPSDEPTCPHFF--AHEADLPKERLKVLVWEEIQHLKGDEQAE---PIDAG	381
CeMPK1	PRALDLLKMLTFNPHNRIDIEQALAHPYLEQYYDPSDEPTCPHFF--AHEADLPKERLKVLVWEEIQHLKGDEQAE---PIDAG	376
DmERKA	ALALDLLGKMLTFNPHKRIPVEEALAHPYLEQYYDPSDEPTCPHFF--AHEADLPKERLKVLVWEEIQHLKGDEQAE---PIDAG	386
HsERK1	SKALDLLRMLTFNPNKRITVEEALAHPYLEQYYDPSDEPTCPHFF--AHEADLPKERLKVLVWEEIQHLKGDEQAE---PIDAG	389
	<.....	
	Homologie zu EmERK-A	
EmERKA	-----	
CeMPK1	65 / (79) %	
DmERKA	64 / (77) %	
HsERK1	70 / (81) %	

Abb. 57: Aminosäurevergleich von EmERK-A mit ERK-Proteinen verschiedenen phylogenetischen Ursprungs.

Gezeigt sind die Sequenzen der *E. multilocularis* EmERK-A, der humanen ERK1 (HsMK03; GenBank Accession No. P27361), der ERK von *D. melanogaster* (DmERKA; P40417, Q9W5M2, Q9W5M3) und der ERK von *C. elegans* (CeMPK1; A36978). AS-Reste, die mit der Konsensussequenz aller Sequenzen übereinstimmen, sind grau unterlegt. Der graue Balken markiert die Serin/Threonin-Kinasedomäne, in der die katalytisch wichtigen Reste des TXY-Motivs weiß auf schwarzem Grund markiert sind. In dem grauen Balken der Kinase-Domäne zeigen A die für die ATP-Bindung nötigen AS-Reste an, während P den Protonenakzeptor markiert. E, P und K sind die katalytisch wichtigen Reste der ST-Kinasen. In direktem Anschluss an die Kinasedomäne liegt die CD-Domäne, deren konservierte negativ geladenen AS-Reste ebenfalls weiß auf schwarzem Grund markiert sind. In der Kinasedomäne liegt die ED-Domäne, deren Reste auch weiß auf schwarzem Grund markiert sind. Die gepunkteten Pfeile markieren die konservierten Regionen gegen die die degenerierten Primer gerichtet wurden. Die Homologiewerte am Ende der Sequenzen geben den prozentualen Wert an identischen und ähnlichen (in Klammer) Aminosäuren der verschiedenen ERK-Kinasen zu EmERK an.

### 3.9.2 *emerk* - Charakterisierung des chromosomalen Locus und Southern-Blot

Die Sequenz des gesamten chromosomalen Locus von *emerk* besteht aus 6896 bp und konnte aus 5 überlappenden Fragmenten bestimmt werden, die über PCR mit Primern, die gegen die cDNA-Sequenz von *emerk-A* gerichtet waren, amplifiziert wurden. Die codierende Sequenz, die von 10 Introns mit Größen zwischen 28 – 2446 bp unterbrochen wird, besteht aus 11 Exons mit Größen zwischen 56 und 214 bp (Abb. 56). Alle Introns haben die kanonischen Dinucleotid-Sequenzen GT und AG an ihren Spleißdonor- und ihren Spleißakzeptorstellen (Abb. 56), auch das differentiell gespleißte Intron 9, das einen Spleißdonor und drei alternative Spleißakzeptoren hat (vergl. folgendes Kapitel). Die Introns 1,3,5 und 8 haben zwischen EmERK und HsERK1 konservierte Intronengrenzen, für Intron 9 trifft das dann zu, wenn es vollständig herausgespleißt wird. Das deutet stark darauf hin, das die ERK-Gene des Fuchsbandwurms und des Menschen von einem gemeinsamen evolutionären Vorläufer stammen.

Säugetiere exprimieren zwei verschiedene Gene, die für die eng verwandten ERK-Isoformen ERK1 und ERK2 codieren, zusätzlich gibt es noch zahlreiche weitere eng verwandte MAP-Kinasen [30]. Um zu überprüfen, ob in *E. multilocularis* neben *emerk* noch weitere ERK-Gene vorhanden sind, wurde eine Southern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Dafür wurden eine Sonde aus der Kinase-Domäne von EmERK gewählt. Wenn *emerk* ein single-copy-Gen ist, sollte jeweils nur ein Hybridisierungs-Fragment, in mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittener chromosomaler DNA von *E. multilocularis*, nachweisbar sein. Wie in Abb. 58 zu sehen ist, führte eine Hybridisierung mit der Sonde in chromosomaler DNA, die mit sechs verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, zu jeweils einem Fragment, dazu jedoch auch zu einem Hintergrund-

schmier von 2 – 10 kb, was am wahrscheinlichsten von Kreuzhybridisierungen der Sonde mit anderen Genen von *E. multilocularis* herrührt, die Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen exprimieren. Trotz dieser Kreuzhybridisierungsfragmente sprechen die Analysen dafür, dass *emer*k als single-copy-Gen in *E. multilocularis* vorliegt.

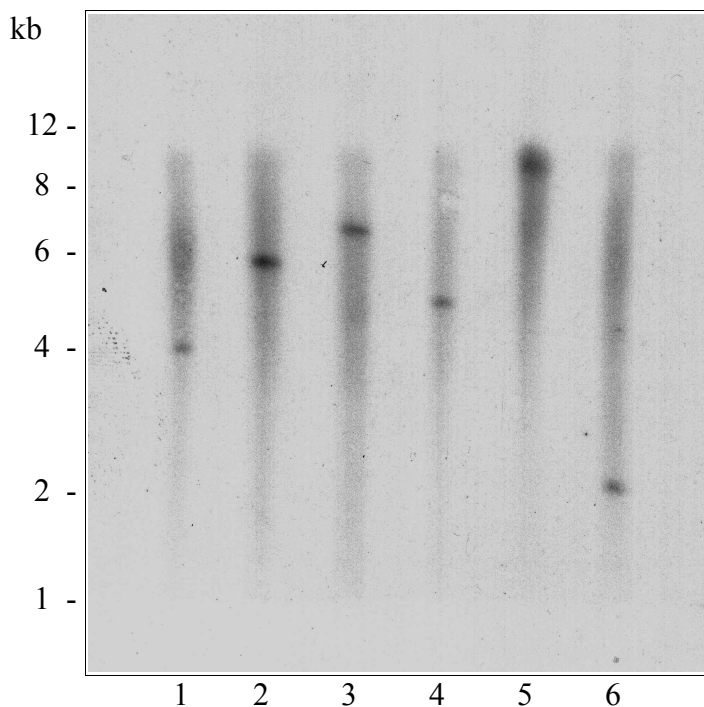


Abb. 58: *emer*k - Southern Hybridisierungen.

Chromosomale DNA von *E. multilocularis* wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII (Spur 1), KpnI (Spur 2), NsiI (Spur 3), PstI (Spur 4), SphI (Spur 5) und XmnI (Spur 6) verdaut, in einem 0.8 % Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Membran wurde dann mit einer Sonde gegen *emer*k untersucht. Der Blot wurde 48 h auf einen Röntgenfilm gelegt. Links ist der Größenmarker angegeben. Der Hintergrund-schmier entstand am wahrscheinlichsten durch Kreuzhybridisierungen der Sonde mit anderen Kinase-codierenden Genen von *E. multilocularis*.

### 3.9.3 *emer*k - Echinokokkenspezifität

Da die cDNA-Bibliothek, über die *emer*k isoliert wurde, aus Parasitenmaterial stammte das in Labortieren (*M. unguiculatus*) kultiviert wurde, musste ausgeschlossen werden, dass *emer*k ein Wirtsfaktor ist. Dafür wurden auf die chromosomale DNA von axenisch *in vitro* kultivierten Metacystoden-Vesikeln des Parasiten *E. multilocularis* und auf die chromosomale DNA, die aus der Leber eines uninfizierten Laborwirts *M. unguiculatus* isoliert wurde, PCRs durchgeführt, wobei *emer*k-spezifische PCR-Produkte nur in der Echinokokken-DNA nachgewiesen werden konnten. Auf der anderen Seite konnte das für den Wirt spezifische  $\beta$ -*tubulin* [46] nicht aus Echinokokken-DNA sondern nur aus der chromosomalen DNA von *M. unguiculatus* (Gerbil) amplifiziert werden (Abb: 66). Diese Ergebnisse zeigen, dass *emer*k ein Echinokokkengen ist.

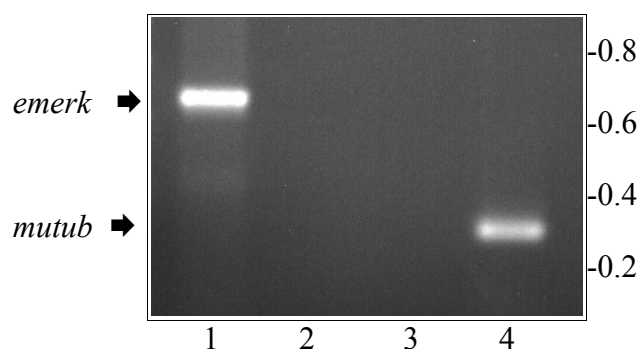


Abb. 59: Nachweis für die Echinokokkenspezifität von *emer*k über PCR.

Mit chromosomaler DNA aus *in vitro* kultivierten Echinokokken (Spur 1 + 2) und aus dem Gehirn eines uninfizierten Gerbils (Spur 3 + 4) als Template wurden PCRs gegen *emer*k (Spur 1 + 3) und das wirtsspezifische  $\beta$ -*tubulin* (Spur 2 + 4) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Größenmarker ist rechts in kb angegeben.



### 3.9.4 *emerk* - Expression in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*

Über RT-PCR wurde die Expression von *emerk* aus *in vivo* und *in vitro* kultivierten *E. multilocularis*-Larven untersucht. Da *in vivo* gewachsenes *E. multilocularis*-Parasitenmaterial aus zwei Larvenstadien, nämlich dem Metacestoden und dem Protoscolex, besteht, stellte sich die Frage, ob *emerk* in beiden Stadien exprimiert wird. Dafür wurde RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskeln und aus frisch isolierten Protoscolices (aus *in vivo* kultiviertem Material) isoliert. Ein Teil der Protoscolices wurde aktiviert. Zusätzlich wurden aktivierte und nichtaktivierte Protoscolices von *E. granulosus* eingesetzt. Abb. 60 zeigt deutlich die Expression von *emerk* in beiden Larvenstadien, sowie in *E. granulosus*.

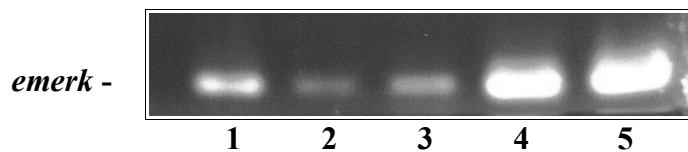


Abb. 60: Expression von *emerk* in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis* und *E. granulosus*.

Gesamt-RNA wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskeln (Spur 1), *in vivo* kultivierten Protoscolices (Spur 2) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten Protoscolices (Spur 3) von *E. multilocularis* und aus *in vivo* kultivierten Protoscolices (Spur 4) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten Protoscolices (Spur 5) von *E. granulosus* isoliert. Nach einer genspezifischen RT-PCR wurden die PCR-Produkte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### 3.9.5 *emerk* - differentielles Spleißen führt zu drei cDNA-Varianten

Bisher konnten von *emerk* die drei Spleißvarianten *emerk-A* (361 AS, 42.2 kDa), *emerk-B* (325 AS, 38.01 kDa) und *emerk-C* (325 AS, 37.98 kDa) isoliert werden. Die verschiedenen Spleißvarianten entstehen durch das differentielle Spleißen von Intron 9, wobei ausgehend vom gemeinsamen Spleißdonor (GT) drei verschiedene Spleißakzeptoren (AG) genutzt werden. Das variable Intron 9 wird dafür in drei verschiedenen Längen herausgespleißt (Abb. 61). Wird das größte Fragment von 808 bp entfernt, entsteht *emerk-A*, beim 313 bp großen Fragment *emerk-B* und beim 590 bp großen Fragment *emerk-C*. Als Folge des differentiellen Spleißens variiert auch das nachfolgende Exon 10 zwischen 116 bp für *emerk-A*, 333bp für *emerk-C* und 611 bp für *emerk-B* (Abb. 61 + 62).

TCCGGTATCTATTGGCTAAG	ATAAATTAGAACACTGATTT	TTTATTTCCAGGTTGGATC	TGCTTGATCGTTTACTTTGT	TTCCGCTCCCTCGCGTCGAAT	5400
<b>AACGGTGGAGAAGCACTTG</b>	<b>CCCATCCTTACCTGGCACAA</b>	<b>TACTACGATCCATCTGACGA</b>	<b>GGT</b> GCGTTGTCTGAAAAAAC	GAATAAGCCTTTAGAAACGT	5500
AACCCAAAGTTAAAGTTGC	TTTCATCAAGACCCTCTATC	GTCTGTAAGAATTGTTTCA	CGTAAAAATTCCTACAACT	AGCCATTCTCCGAATATACT	5600
GATCTGGAATAAGTTATTT	TTGATTAATTCACCAGCACA	AAACATGCACCTTTCTGCGA	AAGTTTCATACATTCCGACGC	TATTTTATTGAGTGGATTTT	5700
GAAGTAGCTTAGGTTGCTAG	TAATAGACTGCTTAACCTTGT	GCTTTGTTTAAGCGCATGTG	CCTTTTATGCCCA <b>CGATTTC</b>	<b>AGCATTGTCGTATGA</b> GAGA	5800
TGCCAACGCCGACAATTGTT	GTACTTTCATTATAATACGT	TCTTAAACCTTACAAAAATA	ACTGCAGCAAGTGTAAACCAT	TTTCTGTGAACCTGGTAGAC	5900
GGATTTAAGGCTATGAAAGG	CATGAGGCCTTTTACCTGA	ATACACTATTTATCTAACCTG	TATGCGTTTTTCGCCTTCAT	ATGTGTATATTC AATTC TTT	6000
GATCTCACGTACTTCCGATT	GAGTCGCTTCTTTCGCATGT	TTCATATTT <b>AGCTCTACCCC</b>	<b>TAAGGGAGTATAG</b> CCTTTTCA	GCAAAATGATTACTTTTCCCT	6100
CGCCACCGGTGTCGCCCGTT	GACTATGCTTGTATTGTGTA	AAATACAAATCTTTGCTGTG	AGAAACTCGCGTTTTTTTACA	AAACCATATGTTTTGAAAGG	6200
CTGGGGAACTGATAACACT	GTTCCAGACTAAATGGACTGT	TAATTACTTGTTTACTTTTA	CCTTTAA <b>AGCCGACTTGCCC</b>	<b>CCATCCGTTTGCACACGAAG</b>	6300
<b>CAGACGATCTTCCAAAGGAG</b>	<b>CGTCTTAAGGTTCTTTGTTTG</b>	<b>GGAAAGAAATTCAGCATCTGA</b>	<b>AGGGGGATGAGCAGGCTGAG</b>	<b>CCTATG</b> TATGTTTTCCTTTAC	6400
GTTGGCCAATTTGGCTGTTT	GCTGGACCGCTTTTGTATGTA	AGTAGCAAATTTGTTTAGTG	GACGTGATCACGTGATCTTC	ACGGGATGGCGTTAGCTGGT	6500
TGATTGCGTGCCGAACCTTCT	CGTGTTGAATTTGCCCATGC	TACCTCTCTACTTCTGCGCA	ATTCTTAAGAAAATGTGGCT	TTACTAAGTTGATGATAAAC	6600
AATTGGTTTTTAACCCCTCGA	AATAACGGAAGACTTATTGC	GTAGAGATGGTTAGGATTCT	ACTTAAGTTAAATAAATATT	AACCTGGTTTTACAATGGAG	6700
ATAAAGTGTGCAATATGCATG	GTGCTTTTAAAAATAAATGC	ATGTGCAATTTGCCCTTTTT	ACGGATGTTGTCCCGAGAAC	TGATTTATTTTGTCCCTTTT	6800
TTGCATCCCATCTCTGCTTA	TTATGTTGCATCATTTTACA	<b>GATGCAGGTTGAAAGTGATC</b>	<b>CCATGAAGTGTAAATCGAATT</b>	<b>CAAACGCTATCTTTCAA</b>	6896

Abb. 61: *emerk-A/B/C*, differentielles Spleißen im Intron 9.

Gezeigt ist ein Ausschnitt des chromosomalen Locus von *emerk*. Die von *emerk-A* abweichenden Spleißformen *emerk-B* und *emerk-C* entstehen durch differentielles Spleißen im Intron 9 (bp 5462 – 6268). Dort sind der für alle Spleißvarianten gleiche Spleißdonor (GT, bp 5462) und die verschiedenen Spleißakzeptoren (AG an bp 6268 für *emerk-A*, an bp 5773 für *emerk-B* und an bp 6051 für *emerk-C*) weiß auf schwarzem Grund markiert. Durch das differentielle Spleißen ist das Intron 9 im Fall von *emerk-A* 808 bp lang, bei *emerk-B* 313 bp und bei *emerk-C* 590 bp. Fett markiert sind das für alle Varianten gleiche Exon 9 (bp 5352 – 5461) und die für *emerk-A* spezifischen Exons 10 (bp 6270 - 6385) und 11 (bp 6840 - 6896). Im Exon 10 von *emerk-B* (ab bp 5775) ist die codierende Sequenz und das TGA-Stop-Codon grau unterlegt, im Exon 10 von *emerk-C* (ab bp 6053) ist die codierende Sequenz und das TAG-Stop-Codon unterstrichen und grau unterlegt, im Exon 11 von *emerk-A* (ab bp 6839) ist die codierende Sequenz grau unterlegt und das TGA-Stop-Codon unterstrichen.

Die cDNA-Sequenz ist in allen drei Varianten bis bp 1027 (AS 319) identisch und ändert sich erst ab Exon 10. Die abgeleitete Aminosäuresequenz führt neben EmERK-A zu den C-terminal verkürzten Proteinen EmERK-B und EmERK-C (Abb. 62). In allen drei Varianten ist die CD-Domäne, die für die Interaktion von ERK mit anderen Proteinen wichtig ist [309] und vom C-terminalen Teil des Introns 9 codiert wird, vorhanden (Abb. 62). Für das humane ERK2 wurden Modifikationen des C-Terminus und deren Auswirkungen beschrieben, wonach der Austausch von 7 AS in Alanine nach der CD-Domäne die Translokation von ERK2 in den Nucleolus beeinträchtigt [269]. Einen Überblick der C-Termini der verschiedenen EmERK-Spleißvarianten bietet Abb. 63.

In zwei verschiedenen PCR-Ansätzen konnten die differentiell gespleißten Varianten in der cDNA verschiedener Larvenstadien von *E. multilocularis* eindeutig nachgewiesen werden. Zudem ergab sich aus der Größe der Fragmente, dass auch in den Spleißvarianten *emerck-C* und *emerck-B*, das für die beiden abgeleiteten Proteine eigentlich unwichtige Intron 10, herausgespleißt wurde (Abb. 64).

<b><i>emerck-A</i></b>	
Intron 9 (808 bp): ↓ GTGCG...CCAG ( <i>erk-A</i> -spez.)	
GCACAATACTACGATCCATCTGACGAGCCGACTTGCCCCATCCGTTTGCACACGAAGCAGACGATCTTCCAAAGGAGCGTCTTAAGGTTCTTGTTGGG	1100
A Q Y Y <b>D</b> P S <b>D</b> E P T C P H P F A H E A D D L P K E R L K V L V W	<b>343</b>
Intron 10 (454 bp): ↓ GTATG...TTTAG	
AAGAAATTCAGCATCTGAAGGGGGATGACGAGGCTGAGCCTATAGATGCAGGTTGAAAGTGATCCCATGAAGTGAATCGAATTCAAACGCTATCTTCAA	1200
E E I Q H L K G D E Q A E P I D A G .	<b>361</b>
TGATGAACG	1209
<b><i>emerck-B</i></b>	
Intron 9 (313 bp): ↓ GTGCG...TTCAG ( <i>erk-B</i> -spez.)	
GCACAATACTACGATCCATCTGACGAGGATTTTCAGCATTTGTCGTATGAAGAGATGCCAACGCCGACAATTTGTGTACTTTCATTATAATACGTTCTTAAA	1100
A Q Y Y <b>D</b> P S <b>D</b> E D F S I V V .	<b>325</b>
CCTTACAAAAATAACTGCAGCAAGTGTAAACCATTTCTGTGAACTTGGTAGACGGATTTAAGGCTATGAAAGGCATGAGGCCTTTTACCTGAATACACT	1200
ATTTATCTAACTGTATGCGTTTTTTCGCCTTCATATGTGTATATCAATTTCTTGTATCTCAGTACTTCCGATTGAGTCGCTTCTTTCGATGTTTCATAT	1300
TTCAGTCTACCCCTAAGGGAGTATAGCTTTTCAGCAAATGATTACTTTTCCCGCCACGGTGTCCGCGTTGACTATGCTTGTATTGTGTAATAATACA	1400
AATCTTTGCTGTGAGAAACTCGCGTTTTTACAAAACCATATGTTTTGAAAGGCTGGGGAACTGATAACACTGTTTCAGACTAAATGGACTGTTAATTAC	1500
TTGTTTACTTTTACCTTTAAAGCCGACTTGCCCCATCCGTTTTCACACGAAGCAGACGATCTTCCAAAGGAGCGCTTAAAGTCTTGTGTTGGGAAGAA	1600
Intron 10 (454 bp): ↓ GTATG...TTTAG	
ATTTCAGCATCTGAAGGGGGATGACGAGGCTGAGCCTATAGATGCAGGTTGAAAGTGATCCCATGAAGTGAATCGAATTCAAACGCTATCTTCAATGATG	1700
<b><i>emerck-C</i></b>	
Intron 9 (590 bp): ↓ GTGCG...TAAAG ( <i>erk-C</i> -spez.)	
GCACAATACTACGATCCATCTGACGAGTCTACCCTAAGGGAGTATAGCTTTTTCAGCAAATGATTACTTTTCCCGCCACGGTGTCCGCGTTGACTA	1100
A Q Y Y <b>D</b> P S <b>D</b> E S T P L G V .	<b>325</b>
TGCTTGTATTGTGTAATAATACAAATCTTTGCTGTGAGAACTCGCGTTTTTACAAAACCATATGTTTTGAAAGGCTGGGGAACTGATAACACTGTTCA	1200
GACTAAATGGACTGTTAATTACTTGTTTACTTTTACCTTTAAAGCCGACTTGCCCCATCCGTTTGCACACGAAGCAGACGATCTTCCAAAGGAGCGCTCT	1300
Intron 10 (454 bp): ↓ GTATG...TTTAG	
TAAGGTTCTTGTGTTGGGAAGAAATTCAGCATCTGAAGGGGGATGACGAGGCTGAGCCTATAGATGCAGGTTGAAAGTGATCCCATGAAGTGAATCGAAT	1400
TCAAACGCTATCTTCAATGATGAACG	1426

Abb. 62: *emerck-A/B/C*, cDNA und Aminosäuresequenz am C-Terminus.

Gezeigt sind die C-terminalen cDNA-Sequenzen von *emerck-A*, *emerck-B* und *emerck-C* ab bp 1001 (oben), sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (unten, fett). Ein Punkt am Ende der Aminosäuresequenz markiert das Stop-Codon. Die Positionen der Introns im genomischen Locus sind mit Pfeilen markiert. Für das Intron ist die Größe sowie die Sequenz des 5'-Donors und des 3'-Akzeptors angegeben. Innerhalb von Intron 9 gibt es verschiedene Spleißvarianten, die zu unterschiedlichen C-Termini der abgeleiteten AS-Sequenz führen (grau unterlegt). Zwischen den Introns 9 und 10 befindet sich das, durch das differentielle Spleißen variable, Exon 10. Die beiden Aspartate (D) der CD-Domäne, die in allen drei Varianten vorhanden sind, sind weiß auf schwarzem Grund markiert.

	CD-Domäne		
EmERK-A: 311	AQYY <b>D</b> PS <b>D</b> EP	TCPHPFAHEA	DDLPKERLKV LVWEEIQHLK GDEQAEPIDA G 361
EmERK-B: 311	AQYY <b>D</b> PS <b>D</b> ED	FSIVV	325
EmERK-C: 311	AQYY <b>D</b> PS <b>D</b> ES	TPLGV	325

Abb. 63: EmERK-A/B/C; C-terminale Proteinsequenz der verschiedenen Spleißvarianten.

Gezeigt sind die C-Termini der Aminosäuresequenzen der drei Spleißvarianten von EmERK. Die differentiellen C-Termini sind fett hervorgehoben. Die zwei wichtigen Reste der CD-Domäne sind weiß auf schwarzem Grund markiert.

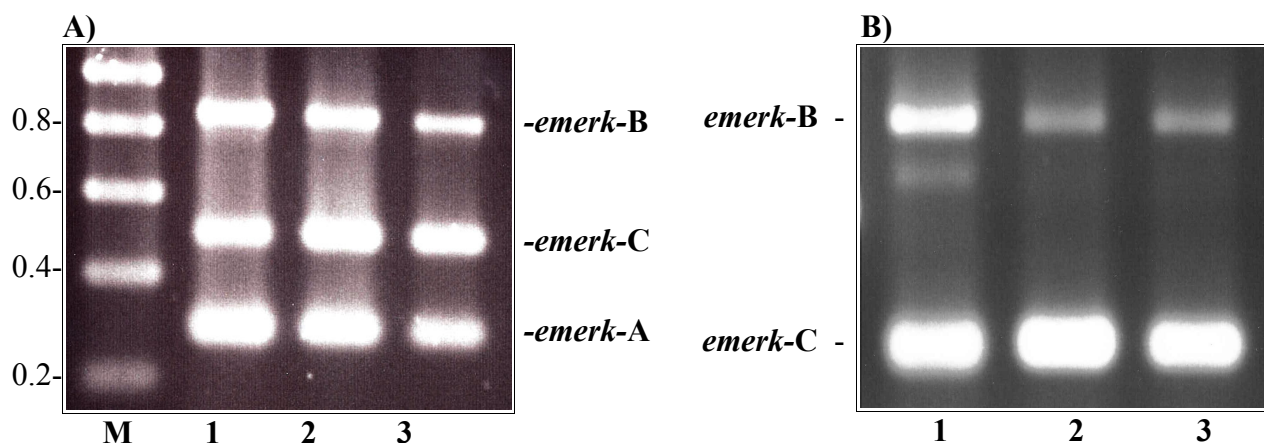


Abb. 64: Nachweis der verschiedenen Spleißformen von *emer*k über RT-PCR in verschiedenen Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Gesamt-RNA wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (Spur 1), *in vivo* kultivierten Protoscolices (Spur 2) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten Protoscolices (Spur 3) isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und diese als Template für eine PCR mit verschiedenen Primern eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. **A)** PCR mit Primern, die alle drei Spleißvarianten umfassen. Erwartete Größe schließt korrektes Spleißen von Intron 10 in allen drei Varianten mit ein. Der dazugehörige Größenmarker ist links angegeben. **B)** PCR mit Primern, die *emer*k-A ausschließt und nur *emer*k-B und *emer*k-C nachweist.

### 3.9.6 EmERK - Proteinexpression

Für den Expressions-Nachweis von EmERK in verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten wurden zwei kommerzielle Antikörper verwendet. Ein phosphospezifischer Antikörper (Anti-P-ERK, Rabbit Anti-Erk1&2 [pTpY<sup>185/187</sup>], Biosource), der gegen das doppelt phosphorylierte TEY-Motiv von ERK gerichtet ist und ein Antikörper (Anti-ERK1/2, Rabbit Anti-Erk1/2(MAPK), StressGen), der den C-terminalen Bereich nach der CD-Domäne erkennt. Dieser Bereich ist zwischen EmERK-A und humanem ERK konserviert und sollte sowohl den Nachweis von phosphoryliertem als auch nicht phosphoryliertem EmERK erlauben. Um zu überprüfen, ob diese Antikörper EmERK detektieren, wurde die codierende Sequenz von EmERK-A in die Expressionsvektoren pBAD und pBAD/Thio von Invitrogen kloniert. In beiden Vektoren erhielt man dadurch eine C-terminale Fusion von *emer*k-A mit dem V5-Antikörperreperitop und einem 6xHis-Tag, sowie bei pBAD/Thio eine zusätzliche N-terminale Fusion mit Thioredoxin. Wie in Abb. 65 zu sehen ist, konnten beide Proteine rekombinant exprimiert und mit dem  $\alpha$ -V5-Antikörper (Invitrogen) im Western-Blot detektiert werden. Unter Verwendung der ERK-spezifischen Antikörper konnte EmERK-A nur Anti-Erk1/2 nachgewiesen werden, jedoch nicht mit Anti-P-ERK. Daraus lässt sich schließen, dass rekombinant exprimiertes EmERK-A in *E. coli* nicht phosphoryliert wird. Ähnliches ist auch schon für humanes ERK beschrieben worden, dass in *E. coli* nur in Gegenwart von aktivem MEK phosphoryliert wurde [173].

Anschließend wurden die Antikörper für Western-Blot-Studien mit Echinokokkenmaterial eingesetzt (Abb. 66). In Lysaten aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln sowie invaginierten oder aktivierten Protoscolices konnten dabei mit dem Anti-ERK1/2-Antikörper zwei Proteine nachgewiesen werden, wobei das kleinere mit 42 kDa der erwarteten Größe von EmERK-A entspricht. Auch der mit 46 kDa größere Faktor war auch in allen drei Lysaten nachweisbar, in den aktivierten Protoscolices jedoch in geringerer Menge (Abb. 66). Da die beiden Isoformen EmERK-B und EmERK-C nicht über das Anti-ERK1/2-Bindungsreperitop verfügen und der Anti-ERK1/2-Antikörper rekombinant exprimiertes EmERK-A erkennt, kann davon ausgegangen werden, dass dieses 42 kDa-Protein EmERK-A repräsentiert. Auch unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers konnte in allen drei Lysaten ein 42 kDa-Protein detektiert werden, dass mit größter Wahrscheinlichkeit der doppelt phosphorylierten Form von EmERK-A entspricht (Abb. 66).

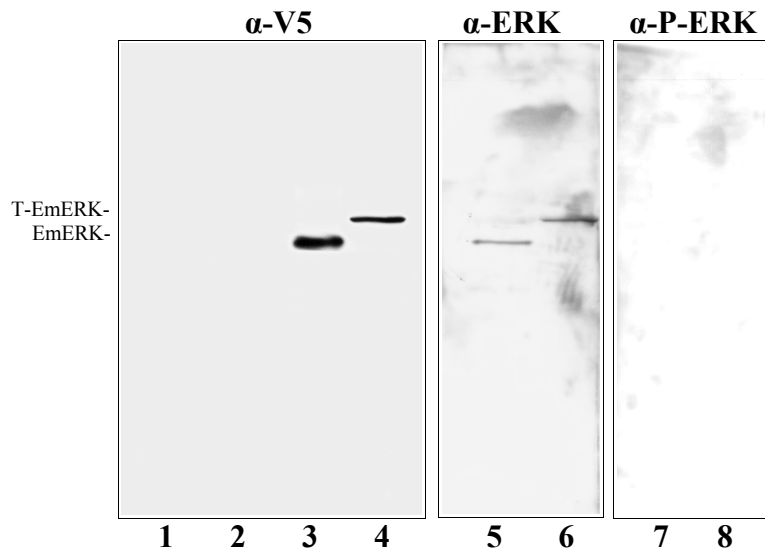


Abb. 65: EmERK: rekombinant exprimiert

EmERK wurde in *E. coli* rekombinant ohne Fusionspartner (EmERK; ~46 kDa: Spuren 1, 3 und 7) und als 5'-Thiofusions-Protein (T-EmERK; ~52 kDa: Spuren 4, 6 und 8) unter der Kontrolle eines arabinoseinduzierbaren Promotors exprimiert, in einem 12,5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. In den Spuren 1 und 2 sind die nichtinduzierten Kontrollen. Spur 1 bis 4 wurde mit dem  $\alpha$ -V5-Antikörper (Invitrogen) entwickelt um die Expression zu überprüfen, Spur 5 und 6 mit dem ERK-spezifischen  $\alpha$ -ERK-Antikörper (StressGen) um zu sehen ob der Antikörper mit dem Echinokokken-ERK kreuzreagiert und Spur 7 und 8 mit einem Phospho-ERK-spezifischen Antikörper (Biosource) um eine mögliche Phosphorylierung von EmERK-A nachzuweisen.

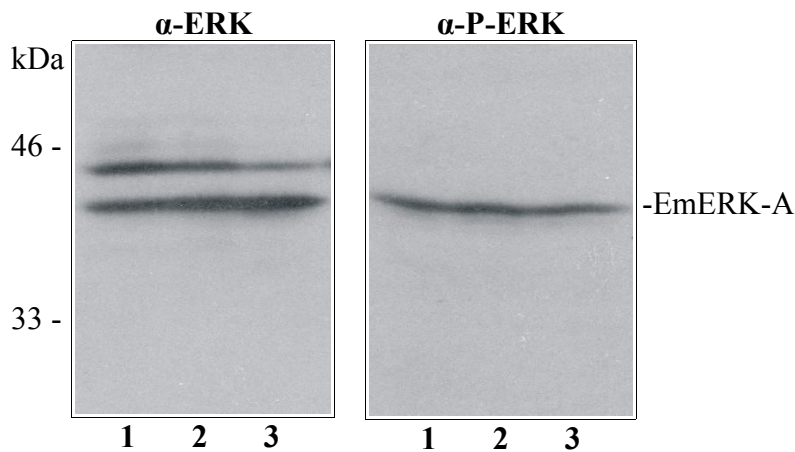


Abb. 66: EmERK: Echinokokkenlysate

Nachweis von EmERK in *E. multilocularis*. In vitro kultivierte Metacystodenvesikel (Spuren 1) und Protoscolices vor (Spuren 2) oder nach (Spuren 3) einer Aktivierung mit Pepsin wurden lysiert, die Proteine in einem 12,5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für die Entwicklung des Westernblots wurde der anti-ERK1/2-Antikörper (links) oder der phosphospezifische anti-P-ERK-Antikörper (rechts) eingesetzt. Der Größenmarker ist links in kDa angegeben und die Position von EmERK-A rechts.

Um zu überprüfen, wo genau EmERK im Parasiten lokalisiert ist, wurden in Zusammenarbeit mit Dennis Tappe (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg) Immunlokalisations-Studien an *in vivo* gewachsenem Parasitenmaterial durchgeführt. Wie in Abb. 67 gezeigt, wurden Strukturen in der Germinalschicht des Metacystoden und Strukturen des Protoscolex von dem Antikörper erkannt. Im Protoscolex wurden hauptsächlich Bereiche um den Hakenkranz und die Saugnäpfe gefärbt. Sowohl im Protoscolex als auch im Metacystoden wurden die Zellkerne besonders stark angefärbt, was im Einklang mit der Lokalisation doppelt phosphorylierter ERK-Kinasen in tierischen Zellen steht [348]. Zusätzlich wurden einige Kalziumkörperchen in der Germinalschicht des Metacystoden angefärbt.

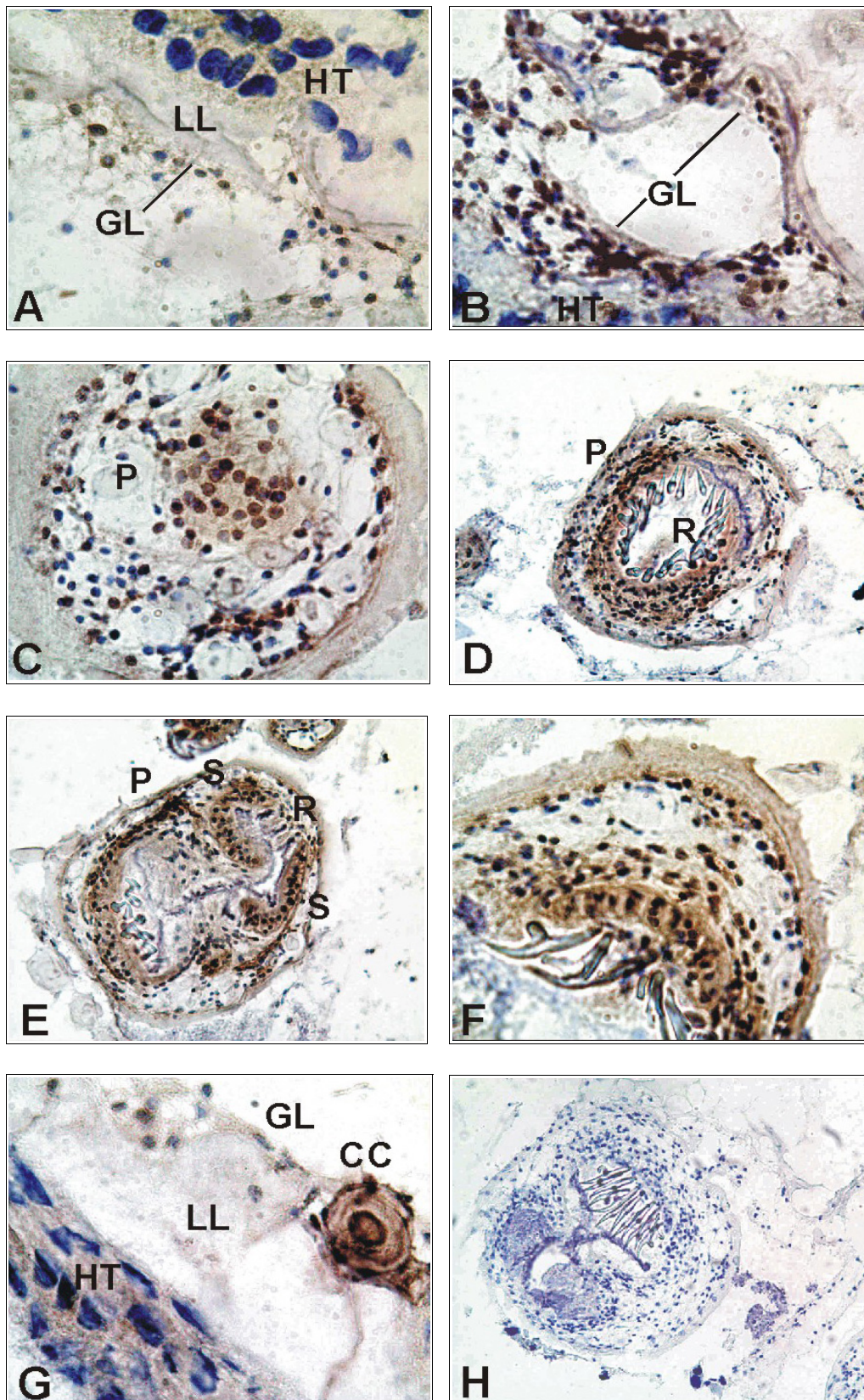


Abb. 67: Immunhistochemischer Nachweis von EmERK in Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Aus von infizierten Labortieren (*M. unguiculatus*) isolierten Lebern wurden Gefrierschnitte hergestellt ( $\varnothing$  5 $\mu$ m), mit dem phosphospezifischen ERK1/2-Antikörper (Biosource) inkubiert und mit einem Peroxidase-konjugierten Maus-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Abb. A-G) oder nur mit dem Zweitantikörper entwickelt (Abb. H). Die Pfeile zeigen folgende Strukturen: CC - Kalziumkörperchen, GL - Schicht aus Germinalzellen des Metacestoden, LL - nichtzelluläre Laminatschicht des Metacestoden, T - Tegument, HT - Wirtsgewebe, P - Protoscolex, S - Saugnapf des Protoscolex, R - Hakenkranz des Protoscolex (Rostellum).

### 3.9.7 EmERK - *in vivo* Phosphorylierungsassays

Die Anwesenheit und die Phosphorylierung von ER-Kinasen ist üblicherweise mit dem Wachstum und der Differenzierung tierischer Zellen assoziiert [263]. In stark proliferierenden Metacestodenvesikeln konnte EmERK-A immer mit dem phosphospezifischen und dem nicht-phosphospezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 66). Wurden intakte Metacestodenvesikel jedoch in Medium mit 0,2% FCS kultiviert, sank die Phosphorylierung von EmERK-A signifikant im Vergleich zu Vesikeln die in konditioniertem Medium kultiviert wurden, zeigten jedoch auch nach 14 Tagen noch eine leichte Phosphorylierung von EmERK-A (Abb. 68A). Dass die Vesikel unter diesen Wachstumsbedingungen noch immer lebensfähig waren, konnte aus der Anwesenheit von EmERK-A geschlossen werden (Abb. 68A). Diese Beobachtung stimmt mit einer älteren Studie überein, in welchem gezeigt werden konnte, dass Metacestodenvesikel auch nach 14 Tagen Kultivierung in FCS-reduziertem Medium lebensfähig waren und Gene transkribierten [Brehm et al. 47]. Auf der anderen Seite konnte in Metacestodenvesikeln, die mit einem Skalpell angeschnitten wurden um die Hydatidenflüssigkeit zu entfernen, schon nach 2 Tagen Kultivierung in FCS-reduziertem Medium (0,2% FCS) keine Phosphorylierung von EmERK-A nachgewiesen werden, obwohl EmERK-A vorhanden war (Abb. 68A). Wie in Abb. 68B gezeigt, bestand ein Zusammenhang dieser Effekte mit dem verwendeten Medium, da in zerstörten Metacestodenvesikeln eine EmERK-A-Phosphorylierung nach zwei Tagen Kultivierung in 10% FCS und 1% FCS nachgewiesen werden konnte, während die Phosphorylierung von EmERK-A in den Metacestodenvesikeln, die in 0,2% FCS kultiviert wurden, nach 2 Tagen reduziert und nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar war. Diese Experimente lassen darauf schließen, dass Serum von Säugetieren einen positiven Effekt auf die Phosphorylierung von EmERK-A hat. Die anhaltende Phosphorylierung von EmERK-A in intakten Vesikeln steht am wahrscheinlichsten im Zusammenhang mit der Anwesenheit von stimulierenden Faktoren der Hydatidenflüssigkeit.

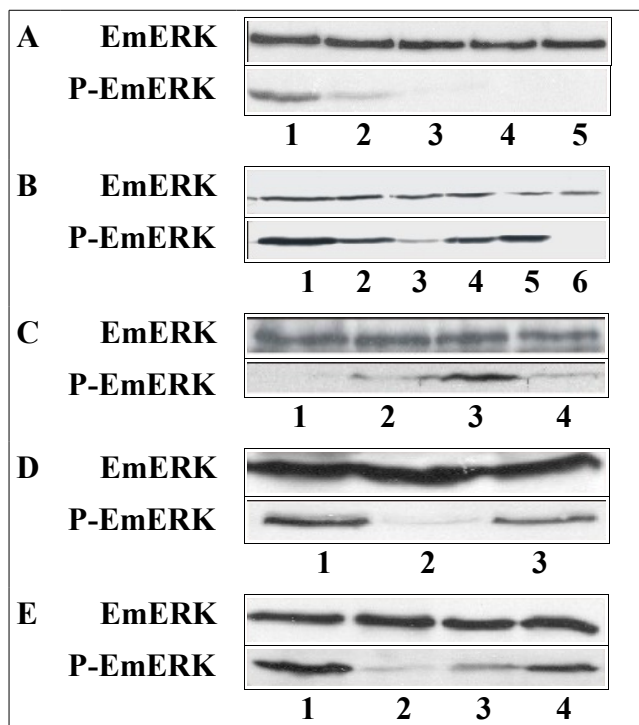


Abb. 68: Immunhistochemischer Nachweis von EmERK in Larvenstadien von *E. multilocularis*.

Lysate von *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden, wurden über Western-Blot mit den Antikörpern Anti-ERK1/2 und phospho-Anti-ERK1/2 analysiert. **(A)** Spuren 1-3, intakte Vesikel wurden in der Gegenwart von konditioniertem Medium inkubiert (10% FCS)(Spur1), oder in Medium mit 0,2% FCS für 2 (Spur2) und für 7 Tage (Spur3). In den Spuren 4 und 5 wurden die Vesikel zerstört um die Hydatidenflüssigkeit zu entfernen und in Medium mit 0,2% FCS für 2 (Spur4) und für 7 Tage (Spur5). **(B)** *In vitro* kultivierte Metacestodenvesikel wurden zerstört um die Hydatidenflüssigkeit zu entfernen und in Medium mit 10% FCS (Spuren 1+4), 1% FCS (Spuren 2+5) oder 0,2% FCS (Spuren 3+6) für 12 Std (Spuren 1-3) oder für 24 Std (Spuren 4-6) inkubiert. **(C)** Intakte Metacestodenvesikel wurden in Medium mit 0,2% FCS für 4 Tage vorkultiviert und dann für 16 Std in Medium mit 0,2% FCS (Spur 1), in Hepatocyten-konditioniertem Medium (incl. 10% FCS)(Spur2) und in Medium mit 10% FCS, in das frisch trypsinisierte Hepatocyten gegeben wurden (In einem Transwellssystem) inkubiert. **(D)** Intakte Vesikel (axenisch kultiviert) wurden für 4 Tage in Hepatocyten-konditioniertem Medium (10% FCS)(Spur1), in Medium mit 0,2% FCS (Spur 2) oder in Medium mit 0,2% FCS, dem 100 nM humanes EGF zugegeben wurde, inkubiert (Spur 3). **(E)** Intakte Vesikel (axenisch kultiviert) wurden für 4 Tage in Medium mit 0,2% FCS inkubiert und wurden dann für 30 min in Medium mit 0,2% FCS (Spur 2), mit 10% FCS (Spur 3) oder mit 0,2% FCS/ 100 nM humanes EGF (Spur 4) inkubiert. Spur 1 zeigt die Metacestodenvesikel vor der Inkubation in Medium mit 0,2% FCS

In einem weiteren Experiment konnte die Phosphorylierung von EmERK-A in Metacestodenvesikeln induziert werden, die 4 Tage in 0,2% FCS kultiviert wurden. Die Zugabe von 10% FCS für 16 Stunden bewirkte eine Phosphorylierung von EmERK-A (Abb. 68C). Ein vergleichbarer Effekt

konnte bei den Metacestodeneskizeln beobachtet werden, wenn sie für 16 Stunden in konditioniertem Medium kultiviert wurden. Eine besonders starke Stimulation von EmERK-A wurde in Metacestodeneskizeln erreicht, wenn sie zuerst für 4 Tage in 0,2% FCS kultiviert wurden und dann in Gegenwart von frisch trypsinierten Hepatocyten. Auch diese Daten wiesen auf einen positiven Effekt des Wirtsserums auf die Phosphorylierung von EmERK-A hin. Zusätzlich zeigten sie, dass die Anwesenheit von Wirtshepatozyten, das heist Konditionen unter welchen die Proliferation des Metacestoden maximal induziert ist [169, 296], auch zu einer maximalen Phosphorylierung von EmERK führt.

Da in Säugerzellen über EGF die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert wird [306] und EGF in Säugerserum nachgewiesen werden konnte [34], wurde überprüft, ob sich die Zugabe von humanem EGF auf die Phosphorylierung von EmERK auswirkt. Zuerst wurden Metacestodeneskizel in 0,2% FCS mit 100nM EGF oder ohne EGF kultiviert. Nach 4 Tagen war die EmERK-A Phosphorylierung in den Vesikeln die nur in 0,2% FCS kultiviert wurden nicht nachweisbar, während die EmERK-A Phosphorylierung bei Anwesenheit von EGF, der von *in vitro* kultivierten Metacestodeneskizeln gleich (Abb. 68D). In einem letzten Experiment wurden Metacestodeneskizel, die für vier Tage in 0,2% FCS kultiviert wurden für 30 Minuten mit humanem EGF stimuliert. Wie in Abb. 68E zu sehen ist, führte die EGF-Stimulation zu einer Phosphorylierung von EmERK-A. Zusammengefasst zeigen diese Experimente das intakte Metacestodeneskizel Wirts-EGF sensieren können und EmERK-A als Folge stärker phosphoryliert wird.

### 3.9.8 EmERK - Kinaseaktivität

EmERK ist eine Map-Kinase und für Map-Kinasen ist beschrieben, dass sie Myelin-Basic-Protein (MBP), ein aus dem zentralen Nervensystem der Maus gewonnenes Proteingemisch, bestehend aus 4 Isoformen zwischen 14 und 21 kDa, *in vitro* phosphorylieren können. Für p38 ist beschrieben, dass es in rekombinant exprimierter Form MBP phosphorylieren kann [132]. Daher stellte sich die Frage, ob Echinokokken-ERK *in vitro* eine Kinaseaktivität aufweist.

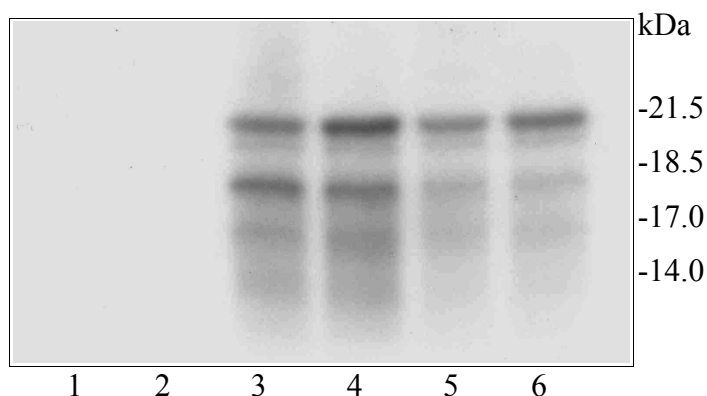


Abb. 69: EmERK - Kinaseaktivität.

Gezeigt ist von EmERK phosphoryliertes Myelin-Basic-Protein. Dafür wurde EmERK-A translationell am 5'-Terminus mit Thioredoxin und am 3'-Ende mit dem V5-Epitop und einem 6×His-Tag fusioniert (Spur 1 + 5) sowie nur 3'-Terminal mit dem V5-Epitop und einem 6×His-Tag (Spur 2 + 6) und dann rekombinant unter der Kontrolle eines arabinoseinduzierbaren Promoters in *E. coli* exprimiert. Die Proteine wurden nativ aufgereinigt, immunpräzipitiert und 1 Std. entweder in frischem Echinokokkenlysate inkubiert (Spur 5 + 6) oder ohne diese Inkubation direkt eingesetzt (Spur 1 + 2). Zusätzlich wurde aus Echinokokkenlysate natives EmERK mit einem ERK-spezifischen (Spur 4) und einem phospho-ERK-spezifischen (Spur 5) Antikörper immunpräzipitiert. Alle 6 Immunpräzipitate wurden für 3 Std. in Gegenwart von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP und Myelin-Basic-Protein (MBP) inkubiert. Die Reaktionen wurden in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und für 5 Tage auf einen Röntgenfilm gelegt.

Für den Kinaseassay wurde EmERK-A rekombinant in *E. coli* exprimiert, immunpräzipitiert ( $\alpha$ -V5 bzw.  $\alpha$ -Thioredoxin, beide Invitrogen) und durch Inkubation in Echinokokkenlysate aktiviert (4 Immunpräzipitate). Zusätzlich wurde EmERK jeweils mit einem Antikörper gegen ERK (Stressgen) und einem gegen die phosphorylierte Form von ERK (Biosource) direkt aus Echinokokkenlysate immunpräzipitiert (2 Immunpräzipitate). Alle sechs Immunpräzipitate wurden in der Gegenwart von  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP mit MBP inkubiert. Wie in Abb. 69 zu sehen ist, konnten sowohl die nativen EmERK-Proteine, als auch das rekombinant exprimierte und aktivierte EmERK-A das Myelin-Basic-Protein phosphorylieren und damit eine funktionelle Kinaseaktivität von EmERK beweisen. Was genau zur Aktivierung der rekombinanten EmERK führte ist noch unklar, denn prinzipiell stehen zwei Möglichkeiten offen. Zum Einen könnte EmERK-A einfach nur phosphoryliert und damit aktiviert worden sein, zum Anderen könnte EmERK, wie es für MAP-Kinasen beschrieben ist [309], ein weiteres Protein (scaffolding-Protein) für die Phosphorylierung von MBP benötigen.

### 3.9.9 EmERK - *in vivo* Interaktionen mit EmMKK (Yeast-Two-Hybrid)

Im ERK-Signalweg wird ERK durch MKK aktiviert [334]. Um heraus zu finden, ob EmERK und EmMKK Teil einer gemeinsamen Signalkaskade sind, wurde versucht, *in vivo* Interaktionen der beiden Proteine über das Yeast-Two-Hybrid-System (Clontech) nachzuweisen. Dafür wurden sowohl für EmERK-A/B als auch für EmMKK-A/B AD- und BD-Vektoren konstruiert und anschließend in Hefen transformiert. Nach dem Wachstum auf unterschiedlich selektiven Agarplatten konnten keine Interaktionen für ERK und MKK nachgewiesen werden (Abb. 70).

		Gal4-AD-Fusionen					
		AD-Em MKK-A	AD-Em MKK-B	AD-Em ERK-A	AD-Em ERK-B	AD-T-Ag	AD
Gal4-BD-Fusionen	BD-EmMKK-A			—	—	—	—
	BD-EmMKK-B			—	—	—	—
	BD-EmERK-A	—	—			—	—
	BD-EmERK-B	—	—			—	—
	BD-Lamin	—	—	—	—	—	—
	BD-p53	—	—	—	—	+++	—
	BD	—	—	—	—		

Abb. 70: EmERK - Yeast-Two-Hybrid Experimente mit EmMKK.

Es wurden Translationsfusionen EmMCKA/B und EmERK-A/B mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) sowie der Gal4-Bindungsdomäne (BD) hergestellt. Doppeltransformatanten des Hefestamms AH109 wurden dann nach 3 Tagen Inkubation auf Koloniewachstum überprüft. Als Kontrollen wurden Plasmide des MATCHMAKER-Y2H-Kits (Clontech) benutzt, die eine Fusion zwischen der Aktivierungsdomäne AD und dem großen Antigen des Simianvirus 40 (T-Ag) und der Bindungsdomäne BD mit murinem p53 (Positivkontrolle) oder mit humanem Lamin C (Negativkontrolle) exprimieren. Gezeigt ist entweder kein Wachstum (—) oder Wachstum unter mittleren (+) oder stark (+++) stringenten Bedingungen. Leere Felder zeigen nicht durchgeführte Kombinationen an.



### 3.10 Optimierung der *in vitro* Co-Kultivierung von Echinokokken-Metacestodenvesikeln

Für die *in vitro* Co-Kultivierung von Echinokokken-Metacestodenvesikeln mit Fütterzellen existierten bisher zwei Möglichkeiten. Entweder wurden kleine Gewebeblöcke aus dem frisch isolierten Metacestoden geschnitten und in Zellkulturflaschen gegeben. Dort entwickelten sich in den Blöcken Metacestodenvesikel, die sich absplatteten und dann frei im Medium schwammen. Die Aufgabe der Fütterzellen übernahmen Zellen des Wirts, die in den Gewebeblöcken enthalten waren [145]. Die Ausbeute an Metacestodenvesikeln ist unter diesen Bedingungen jedoch sehr gering. Eine weitere Möglichkeit Metacestodenvesikel *in vitro* zu kultivieren ist das von Jura et al. beschriebene System, in dem frisch isoliertes Metacestodengewebe mechanisch zerkleinert (Passieren durch ein Teesieb) und gemeinsam mit Hepatocyten in Zellkulturschalen zwischen zwei Kollagenlagen kultiviert wird [169]. Dieses System hat den Vorteil, dass die einzelnen Metacestodenvesikel durch die Kollagenlagen fixiert werden und so einzelne Vesikel über einen sehr langen Zeitraum beobachtet werden können. Die Handhabung ist jedoch sehr aufwendig und die Metacestodenvesikel sind nur sehr schwer zugänglich.

Durch eine Kombination beider Systeme konnte die Ausbeute an Metacestodenvesikeln extrem gesteigert und die Handhabung stark vereinfacht werden. Dafür wurde das frisch isolierte Metacestodengewebe durch ein Teesieb passiert und gemeinsam mit Hepatocyten (RH<sup>-</sup> oder HepG2) in eine Zellkulturflasche gegeben. Innerhalb weniger Tage adhärten die Hepatocyten am Boden der Flasche, während das Parasitenmaterial frei im Medium schwamm. Über einen Zeitraum von 2-4 Wochen bildete sich eine Großzahl an sehr kleinen Metacestodenvesikeln, die in neue Zellkulturflaschen überführt wurden. Für die Bildung und das Wachstum der Metacestodenvesikel ist die Anwesenheit frisch trypsiniertes Hepatocyten essentiell. Nur wenn bei Beginn der Kultivierung und bei jedem Medienwechsel (auch wenn in der Zellkulturflasche schon adhärente Hepatocyten vorliegen) frisch trypsinierte Hepatocyten zugegeben werden, wachsen die Metacestodenvesikel. Abhängig von der Größe der Vesikel mussten diese gesplittet werden (kleine Vesikel höchstens 10 ml und große Vesikel höchstens 20 ml je 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche), da ab einer größeren, bisher noch nicht genau definierten Menge an Echinokokken-Material (abzüglich der Hydatidenflüssigkeit) das Wachstum eingestellt wurde. Unter idealen Bedingungen konnten mit dieser Methode aus 1-2 ml Anfangsmaterial über 400 ml Metacestodenvesikel gewonnen werden (abhängig von der Größe der Vesikel). In Abbildung 71 ist die Kultivierung von Metacestodenvesikeln zwischen zwei Kollagenlagen und die hier beschriebene Kultivierung in Zellkulturflaschen zu sehen.



Abb. 71: *in vitro* Co-Kultursysteme für *E. multilocularis* Metacestodenvesikel.

Im linken Bild ist das von Jura et al. [169] etablierte Co-Kultursystem gezeigt, in dem die Metacestodenvesikel gemeinsam mit Hepatocyten zwischen zwei Kollagenlagen wachsen. Die beiden Schalen zeigen eine frisch angesetzte Kultur (links) und eine Kultur in der nach sechswöchiger Inkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) Metacestodenvesikel gewachsen sind. Im rechten Bild ist die im Text beschriebene Co-Kultivierungsmethode gezeigt, in der die Metacestodenvesikel gemeinsam mit adhärennten Hepatocyten über mehrere Wochen in Zellkulturflaschen kultiviert wurden (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### 3.11 Differenzierung von sterilen Adultwürmern

Metacestodenvesikel, die gemeinsam mit Hepatocyten kultiviert werden, bilden innerhalb mehrerer Wochen Brutkapseln, in welchen sich dann Protoscolices entwickeln. Die eingestülpten Protoscolices sind an der inneren Seite der Metacestodenvesikel lokalisiert und von einer Membran umgeben (Abb. 2, Punkt 6, Seite 5). Werden die Metacestodenvesikel mechanisch zerstört, stülpen sich die Protoscolices aus und bewegen sich im Medium (Abb. 2, Punkt 7+8, Seite 5).

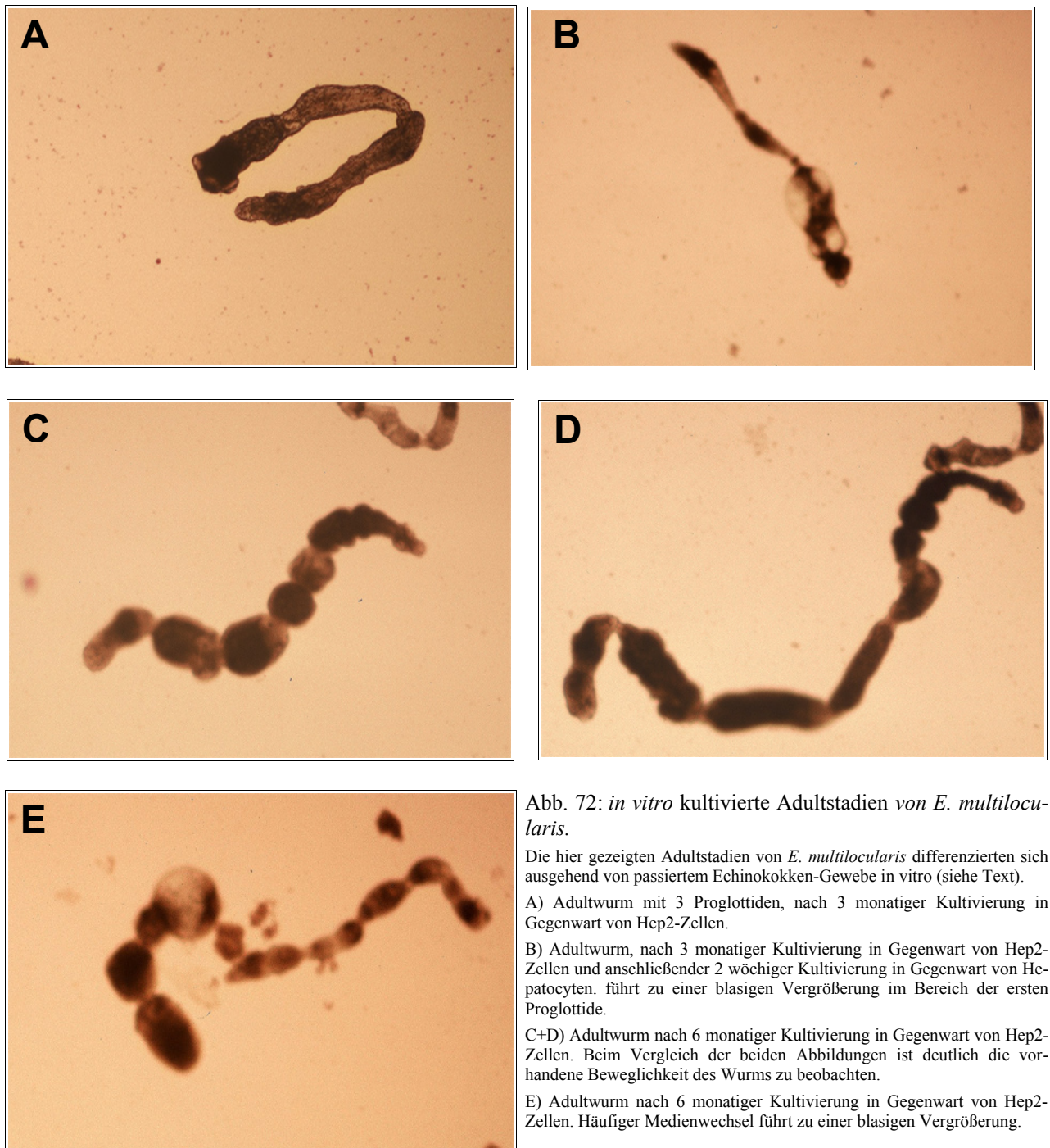


Abb. 72: *in vitro* kultivierte Adultstadien von *E. multilocularis*.

Die hier gezeigten Adultstadien von *E. multilocularis* differenzierten sich ausgehend von passiertem Echinokokken-Gewebe *in vitro* (siehe Text).

A) Adultwurm mit 3 Proglottiden, nach 3 monatiger Kultivierung in Gegenwart von Hep2-Zellen.

B) Adultwurm, nach 3 monatiger Kultivierung in Gegenwart von Hep2-Zellen und anschließender 2 wöchiger Kultivierung in Gegenwart von Hepatocyten. führt zu einer blasigen Vergrößerung im Bereich der ersten Proglottide.

C+D) Adultwurm nach 6 monatiger Kultivierung in Gegenwart von Hep2-Zellen. Beim Vergleich der beiden Abbildungen ist deutlich die vorhandene Beweglichkeit des Wurms zu beobachten.

E) Adultwurm nach 6 monatiger Kultivierung in Gegenwart von Hep2-Zellen. Häufiger Medienwechsel führt zu einer blasigen Vergrößerung.

In Gegenwart von Rattenhepatocyten (RH) oder frisch zugegebenen humanen Hepatocyten (HEP-G2) differenzieren sich die Protoscolices zu blasigen Strukturen, die kleinen Metacestodenesikeln gleichen und nach wenigen Tagen ist keine Bewegungsaktivität mehr feststellbar. In sehr alten Co-Kulturen, in welchen statt Hepatocyten humane Fibroblasten (HEP2) eingesetzt wurden bildeten die Zellen an der der Flaschenwand gelbe Wülste. Unter diesen Bedingungen entwickelten sich Protoscolices, die aus zerstörten Metacestodenesikeln ins Medium gelangten, zu sterilen Adultwürmern, die bis zu 8 Proglottiden hatten und eine Länge von über einem cm erreichten (Abb. 72). Auch nach mehrmonatiger Kultur waren die Würmer beweglich, wie der Vergleich eines Wurmes in den Abbildungen 72 C + D zeigt. Kamen diese Würmer jedoch in Kontakt mit frischen RH- oder HEPG2-Zellen, z.B. nach einem Wechsel der Zellkulturflasche, bilden sich aus den zuvor schlanken Proglottiden blasige, metacestodenartige Strukturen (Abb. 72 B + E). Diese Rückdifferenzierung konnte auch während des Medienwechsels beobachtet werden, wenn das gesamte Medium ausgetauscht wurde. Daher wurde ~1x wöchentlich nur die Hälfte des Mediums ausgetauscht.

Sterile Adultstadien konnten auch aus passiertem Metacestodengewebe einer *in vivo* Kultur kultiviert werden. Dabei wurde das protoscolexhaltige Material in Zellkulturflaschen gegeben, die eine ~ 3 Wochen alte HEP-2-Kultur enthielten. Innerhalb von ~3 Wochen bildeten die Protoscolices dann die ersten zusätzlichen Proglottiden.

### 3.12 Axenisches Kultursystem

Für viele Fragestellungen ist es wichtig, den Einfluß verschiedener Faktoren, wie zum Beispiel die Wirkung von Wachstumshormonen oder Inhibitoren, auf das Wachstum und die Differenzierung der *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikel zu bestimmen. Das *in vitro* Co-Kultivierungssystem, in dem die Echinokokken-Metacestodenvesikel in Gegenwart von Fütterzellen wachsen, ist dafür nur begrenzt nutzbar, da ein Effekt der zugegebenen oder entzogenen Faktoren nicht zwingend auf einer spezifischen Interaktion der Faktoren mit den Metacestodenvesikeln beruhen muß, sondern auch in Antwort auf eine primäre Stimulation der Fütterzellen erfolgt sein kann. Daher wurde ein axenisches Kultursystem entwickelt, über das die Wirkung unterschiedlichster Bedingungen auf das Wachstum und die Differenzierung der Metacestodenvesikel ohne den Einfluß der Fütterzellen beobachtet werden kann. Ein weiterer Vorteil der axenischen Kultivierung von Metacestodenvesikeln besteht in der Möglichkeit, Echinokokkenmaterial zu erhalten, das frei von Wirts- oder Fütterzellen ist und zum Beispiel für die Isolation von Echinokokken-Primärzellen verwendet werden kann.

Über die, in den folgenden Kapiteln näher beschriebenen Versuche, konnten Bedingungen gefunden werden, die eine axenische *in vitro* Kultivierung von Echinokokken-Metacestodenvesikeln über einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten ermöglichen. Die besten Ergebnisse konnten nach der Zugabe von reduzierenden Reagenzien ( $\beta$ -Mercaptoethanol, Bathocuproinedisulfonic-Acid und L-Cystein) in das eingesetzte Medium und der Kultivierung in einer Stickstoffatmosphäre erzielt werden. Während in dMEM (Dulbeccos MEM + 10% FCS) nach 5 Wochen axenischer Kultivierung nur ein geringes Wachstum mit höchstens 60% überlebenden Metacestodenvesikeln beobachtet werden konnte, ermöglicht die Kultivierung in konditioniertem Medium (cMEM) ein starkes Wachstum mit Überlebensraten von bis zu 100% der eingesetzten Vesikel. Konditioniert wird Medium in der Gegenwart von Fütterzellen, die z.B. wachstumsrelevante Faktoren in das Medium abgeben. Das beste Wachstum ist in neutralem Medium zu beobachten, daher sollte das, durch die Stoffwechselprodukte der Metacestodenvesikel, angesäuerte Medium 3x wöchentlich gewechselt werden (cMEM) und alkalische Medien (pH > 7.5) nicht eingesetzt werden.

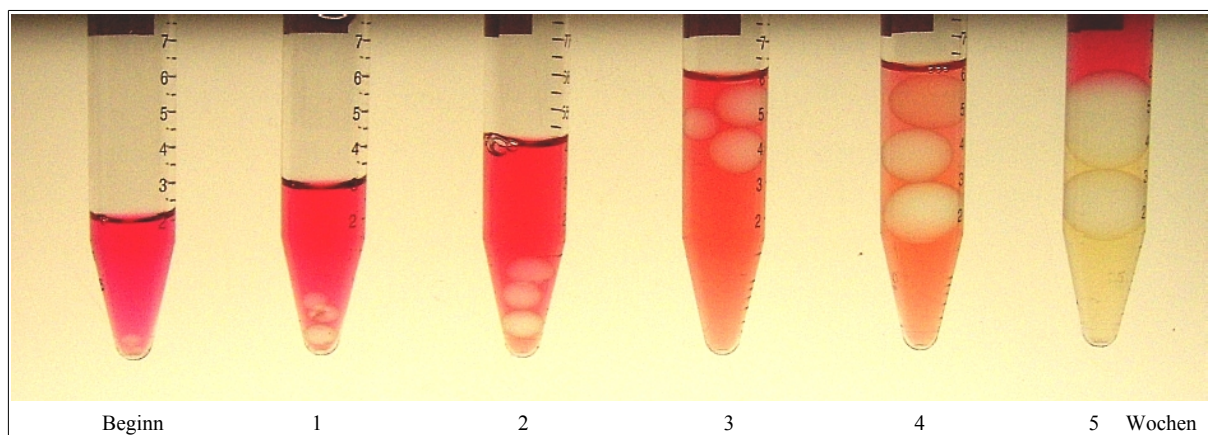


Abb. 73: Axenische Kultivierung von Echinokokken-Metacestodenvesikeln

Gezeigt ist die Nachstellung wachsender Metacestodenvesikel unter axenischen Bedingungen. Zu Beginn werden mehrere Vesikel (1-10) eingesetzt, 3x wöchentlich das Medium gewechselt und das Volumen der Vesikel über einen Zeitraum von mehreren Wochen bestimmt. Tote und absterbende Vesikel wie zum Beispiel das oberste Metacestodenvesikel in Woche 4 (dunkle Verfärbung) können entfernt werden.

In Abbildung 73 ist die axenischen Kultivierung von Metacestodenvesikeln über einen Zeitraum von 5 Wochen nachgestellt. Deutlich ist die Volumenzunahme der Metacestodenvesikel zu erkennen. Für die Volumenbestimmung wird zuerst das Medium abgenommen und dann das Volumen der Vesikel an der Skala des Greinerröhrchens abgelesen. Wenn sehr große Metacestodenve-

sikel vorhanden sind, bleibt unter dem untersten Vesikel ein Mediumrest übrig, der vom Volumen abgezogen werden muß. Im Laufe der Entwicklung des axenischen Kultursystems wurde das Wachstum der Vesikel auf unterschiedliche Weise gemessen, daher unterscheiden sich die Volumenangaben in den nachfolgenden Versuchen.

Zu Beginn wurde nur das Gesamtvolumen der eingesetzten Vesikel bestimmt. Da aufgrund verschiedener Ursachen einige der eingesetzten Vesikel starben, wurde das Volumen der überlebenden Vesikel auf die Zahl der eingesetzten Vesikel hochgerechnet. Diese Methode eignet sich für exakte Messungen jedoch nur bedingt, darum wurde in allen weiteren Versuchen das Durchschnittsvolumen eines einzelnen Vesikels berechnet, in dem das Gesamtvolumen durch die Anzahl an verbleibenden Vesikeln geteilt wurde. Für die neuesten Versuche (u.a. Einfluß von Wachstumsfaktoren) wurde nur ein Vesikel je Röhrchen kultiviert und das Volumen aus mehreren, dadurch unabhängigen Einzelversuchen, gemessen und durch die Anzahl beteiligter Metacestodenvesikel geteilt, um das Durchschnittsvolumen eines Vesikels zu erhalten. Unabhängig der Messmethode konnten für die einzelnen, in den folgenden Kapiteln beschrieben, Wachstumsbedingungen vergleichbare Wachstumskurven und Überlebensraten ermittelt werden.

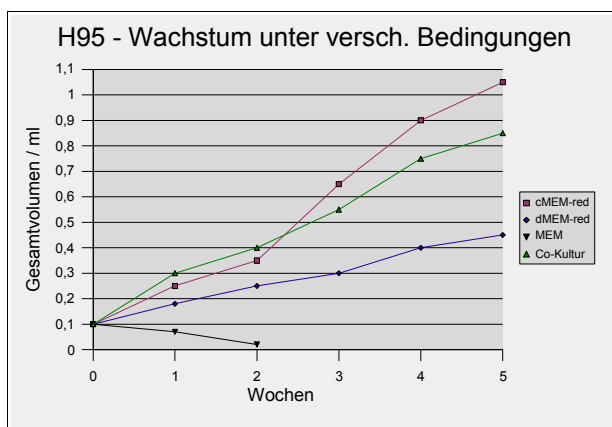


Abb. 74: Wachstum von Metacestodenvesikeln (H95)

Gezeigt sind Wachstumskurven von axenisch unter reduzierenden Bedingungen kultivierten Metacestodenvesikeln des Echinokokkenisolats H95. Zusätzlich ist die Volumenzunahme von Metacestodenvesikeln einer Co-Kultur mit einbezogen. Zu Beginn des Versuchs wurden jeweils 100 µl kleine Metacestodenvesikel (~10 Vesikel) in 15 ml Greiner-Röhrchen gegeben (Ausnahme: die Co-Kultur wurde in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen durchgeführt) und auf jeden Ansatz 2 ml Medium gegeben. Den verwendeten Medien (MEM = Dulbeccos MEM, dMEM = MEM + 10% FCS und cMEM = 7 Tage in Gegenwart von RH-Zellen konditioniertes dMEM) wurden die reduzierenden Reagentien β-Mercaptoethanol (ME, 0,01%, Bathocuproinedisulfonic-Acid (Bat, 10 nM) und L-Cystein (Cys, 100 nM) zugegeben. (Ausnahme Co-Kultur).

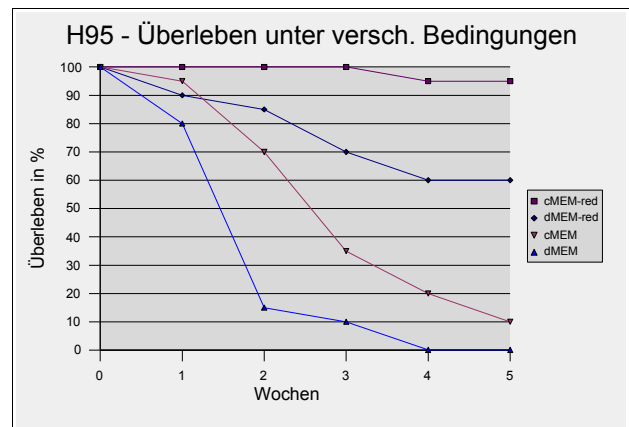


Abb. 75: Überleben von Metacestodenvesikeln (H95) im zeitlichen Verlauf eines axenischen Kultivierungsversuchs in Abhängigkeit von reduzierenden Bedingungen.

Gezeigt sind die überlebenden Metacestodenvesikel einer axenischen Kultivierung unter reduzierenden Bedingungen (cMEM-red, dMEM-red, reduzierende Zusätze und Stickstoffatmosphäre) und unter nicht reduzierenden Bedingungen (cMEM, dMEM, keine reduzierenden Zusätze und keine Stickstoffatmosphäre). Eingesetzt wurden je Ansatz für beide Bedingungen 100 µl kleine Metacestodenvesikel (~10 Vesikel), die unter reduzierenden Bedingungen von Fütterzellen befreit wurden. Das Medium wurde 3x wöchentlich gewechselt (2 ml) und die Gasphase in den Ansätzen cMEM-red und dMEM-red durch Stickstoff ersetzt.

In Abbildung 117 ist das Wachstum von Metacestodenvesikeln in Co-Kultur mit Hepatocysten (Co-Kultur) sowie das axenische Wachstum unter reduzierenden Bedingungen in cMEM und dMEM gezeigt. Deutlich ist zu erkennen, dass die Vesikel innerhalb des 5 wöchigen Beobachtungszeitraumes zu unterschiedlichen Endvolumen heranwuchsen. Während die Vesikel der axenischen dMEM-Fraktion ihr Volumen vervierfachten, wuchs der cMEM-Ansatz auf ein zehnfaches Volumen des Startwertes und übertraf damit sogar das Volumen der co-kultivierten Metacestodenvesikel, die ein achtfaches Volumen erreichten. Vesikel, die in MEM kultiviert wurden, starben innerhalb von 2 Wochen. Die Volumenzunahmen der gleichzeitig durchgeführten Versuchsansätze, welchen keine reduzierenden Reagenzien zugesetzt wurden, sind in der Abbildung nicht berücksichtigt, da eine Vielzahl der Vesikel starb. Die Zeitpunkte, an welchen die Vesikel während des Versuchs starben sind in Abbildung 118 wiedergegeben. Ohne die Zugabe reduzierender Reagenzi-

en starben sowohl in cMEM als auch in dMEM über 60% der Vesikel innerhalb der ersten 3 Wochen. Am Ende des Versuchs waren in dMEM alle Vesikel tot und in cMEM überlebten nur 10%. Unter reduzierenden Bedingungen überlebten dagegen in dMEM 60% und in cMEM 95% der Vesikel. Dieser Versuch zeigt deutlich, dass für eine axenische Kultivierung von Echinokokken-Metacestodenvesikeln reduzierende Bedingungen essentiell sind und das stärkste Wachstum in konditioniertem Medium erfolgt.

### 3.12.1 Axenisches Kultursystem: Auswahl und Entfernung der Fütterzellen

Prinzipiell ist es möglich *E. multilocularis* - Metacestodenvesikel *in vitro* in Gegenwart verschiedener Fütterzellen zu kultivieren. Für die axenische Kultivierung der Metacestodenvesikel müssen die Fütterzellen jedoch vollständig entfernt werden können (vergl. Kapitel 5.11). Im folgenden Versuch wurde getestet, welche der beiden Zelllinien RH<sup>-</sup> (Reuber Leberzellen der Ratte) und Hep2 (humane Leberzellen), die von uns für die Co-Kultivierung vorrangig verwendet werden, gut von den Metacestodenvesikeln zu trennen sind. Dafür wurden die Metacestodenvesikel Meta-A (Isolat: H95, Alter: 2 Wochen, Durchmesser 0.1 bis 0.5 mm) und Meta-B (Isolat: H95, Alter: 3 Monate, Durchmesser 3 - 5 mm) nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS und anschließendem Sieben durch ein Teesieb, in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt und 50 ml Medium zugegeben (MEM + 10% FCS + PenStrep). Alle 3 Tage wurden die Metacestodenvesikel in eine neue Flasche überführt und das Medium gewechselt. In die alten Flaschen wurde frisches Medium gegeben und diese für 5 Tage im 37°C Brutschrank bebrütet. Anhand der Zellen, die in diesen Flaschen adherent wuchsen, konnte die Verunreinigung der Metacestodenvesikel durch Fütterzellen verfolgt werden. Außerdem wurden die Metacestodenvesikel mikroskopisch auf Fütterzellen überprüft, die an deren Oberfläche adhärten. Nach durchschnittlich 6 Medienwechseln (2 Wochen) konnten weder bei den kleinen (Meta-A) noch bei den großen Metacestodenvesikeln (Meta-B) RH<sup>-</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Die Entfernung der Hep2-Zellen gelang nicht, da sie an der Oberfläche der Metacestodenvesikel adhärten. Innerhalb dieser 2 Wochen starben zwischen 30% (Meta-B) und 70% (Meta-A) aller eingesetzten Metacestodenvesikel (eingefallene oder faltige Oberfläche, Ablösung der Zellschicht, Verfärbung durch eindringendes Medium) und die Überlebenden starben häufig bald darauf in den nachfolgenden Versuchen. Durch den Einsatz von konditioniertem Medium (Dulbeccos MEM +10% FCS, in dem für 3-7 Tage Fütterzellen kultiviert werden), der Zugabe von reduzierenden Reagenzien ( $\beta$ -Mercaptoethanol, Bathocuproinedisulfonic-Acid, L-Cystein) und einem Wachstum unter Sauerstoffabschluss (die Gasphase des Gefäßes wird durch Stickstoff ersetzt) konnte dann die Sterblichkeit aller eingesetzten Metacestodenvesikel auf unter 5% gesenkt werden. Die so hergestellten axenischen Metacestodenvesikel überlebten, abhängig von den Wachstumsbedingungen in den Folgeversuchen 12 Wochen und länger. Außerdem verkürzte sich die Entfernung der Fütterzellen (RH<sup>-</sup>) auf 2 bis 3 Medienwechsel (1 Woche).

### 3.12.2 Axenisches Kultursystem: ideale Wachstumsbedingungen

In einer Reihe von Versuchen, in welchen das Volumen der eingesetzten *E. multilocularis*-Metacestodenvesikel (Isolat H95) zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde, wurde nach Wachstumsbedingungen gesucht, die ein möglichst langes Überleben der Vesikel ermöglichen. Da auch in der Co-Kultivierung der Metacestodenvesikel mit Fütterzellen mehrere Wochen vergehen bis sie auf einen Durchmesser von 5 - 10 mm heranwachsen, ist ein langes Überleben unter axenischen Bedingungen wichtig um zum Beispiel die Wirkung eines Wachstumsfaktors auf das Wachstum und die Differenzierung verfolgen zu können. Im Versuchsaufbau wurden pro Ansatz jeweils 10 Metacestodenvesikel (~100  $\mu$ l) in ein 15 ml Greinerröhrchen gegeben und deren Volumenzunahme über mehrere Wochen verfolgt. Verwendet wurden Metacestodenvesikel, die über 1-2 Wochen unter Zugabe von reduzierenden Reagentien ( $\beta$ -Mercaptoethanol, Bathocuproinedisulfonic-Acid, L-

Cystein) und unter einer Stickstoffatmosphäre von Fütterzellen befreit wurden. Zusätzlich wurden die Vesikel mikroskopisch auf die Bildung von Brutkapseln untersucht und der Allgemeinzustand protokolliert. Getestet wurden, wie im Folgenden beschrieben, das Wachstum in verschiedenen Medien (MEM, dMEM, cMEM), die Empfindlichkeit der Vesikel gegenüber Sauerstoff durch die Zugabe reduzierender Reagenzien und der Einfluß des Medien-pH-Wertes auf das Wachstum. Zusätzlich wurde getestet, zu welchen Zeitpunkten das Medium gewechselt werden muß (1x, 2x oder 3x pro Woche). Als Kontrollen wurde in allen Versuchen das Wachstum der Metacestodenvesikel mit co-kultivierten Vesikeln und solchen verglichen, die nur MEM (ohne FCS) zur Verfügung hatten. Die co-kultivierten Vesikel dienten dabei als Positivkontrolle und die Vesikel in MEM (ohne FCS) als Negativ- bzw. Totkontrolle. Sämtliche Versuche wurden mit vergleichbaren Ergebnissen mehrmals durchgeführt.

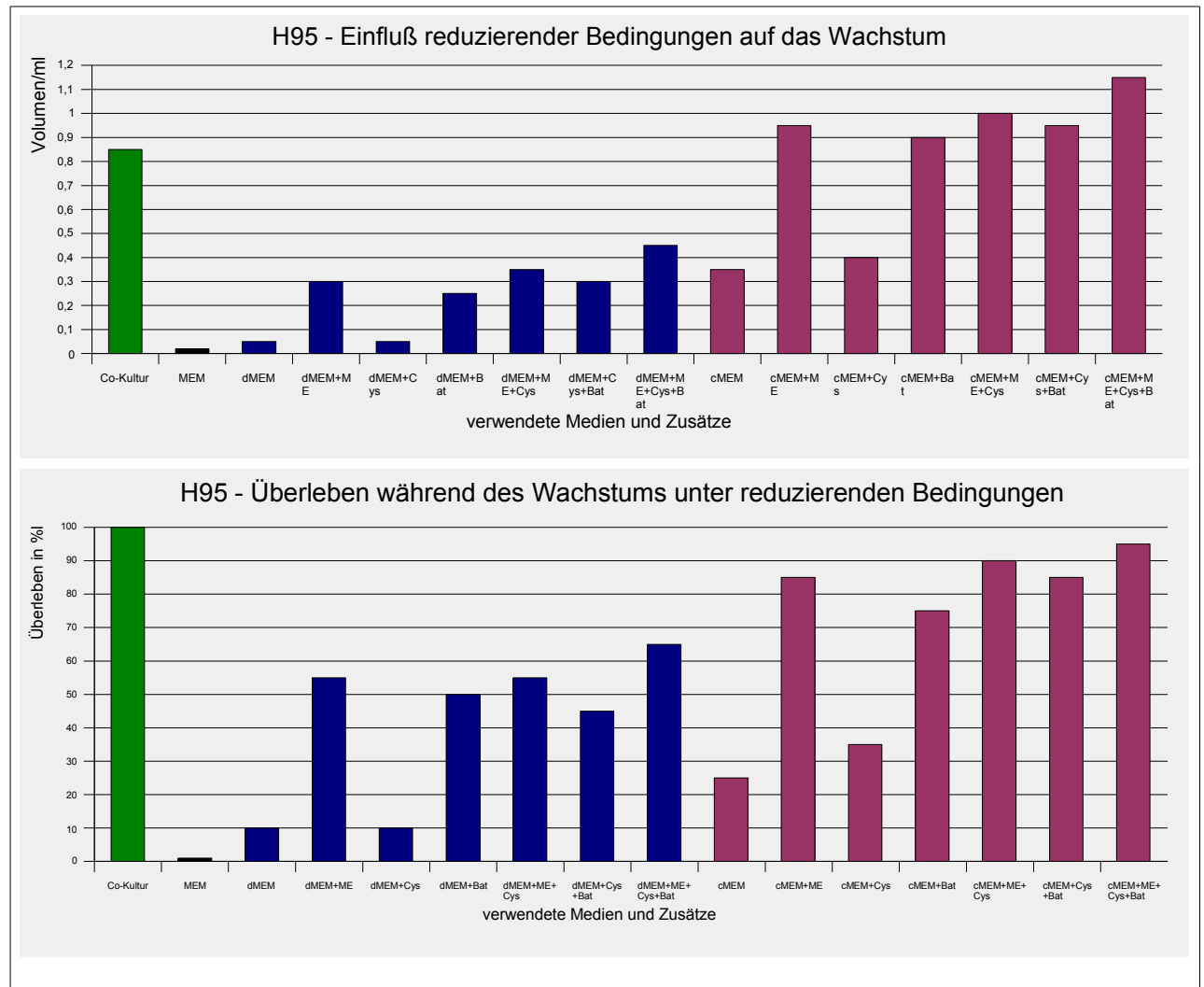


Abb. 76: Einfluß reduzierender Bedingungen auf das Wachstum und das Überleben von Metacestodenvesikeln (H95)

In der oberen Tabelle ist die Volumenzunahme der Vesikel in einem Beobachtungszeitraum von 5 Wochen gezeigt. Zu Beginn des Versuchs wurden je Ansatz 10 Metacestodenvesikel mit einem Gesamtvolumen von ~0.1 ml eingesetzt. Zu den verwendeten Medien cMEM, dMEM und MEM wurden die reduzierenden Reagenzien  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME, 0.001%, Bathocuproinedisulfonic-Acid (Bat, 10 nM) und L-Cystein (Cys, 100 nM) in unterschiedlichen Kombinationen gegeben. Die verschiedenen Kombinationen wurden auch für MEM eingesetzt, führten aber nicht zum Überleben der Vesikel, daher steht MEM hier für alle Kombinationen. Das Volumen der überlebenden Vesikel wurde auf eine Gesamtzahl von 10 Vesikeln je Ansatz hochgerechnet. Die untere Tabelle zeigt, wieviel Prozent der eingesetzten Vesikel am Ende des fünfwöchigen Beobachtungszeitraumes noch lebten. Das Medium wurde 3x wöchentlich gewechselt (2 ml) und die Gasphase durch Stickstoff ersetzt (Ausnahme Co-Kultur).

### 3.12.2.1 Einfluß reduzierender Bedingungen

Da sich anwesender Sauerstoff schädlich auf das Wachstum und das Überleben der axenisch kultivierten Metacestodenesikel auswirkt (siehe Abb. 118, 77 + 78) mussten Bedingungen gefunden werden, die eine Kultivierung ermöglichen. Dafür wurden den Kulturen die drei reduzierenden Zusätze  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME, 0.001%), Bathocuproinedisulfonic-Acid (Bat, 10 nM) und L-Cystein (Cys, 100 nM) in unterschiedlichen Kombinationen zugegeben und das Wachstum der eingesetzten Metacestodenesikel über einen Zeitraum von 5 Wochen protokolliert.

Die Abbildung 76 zeigt das am Ende des Versuchs erreichte Gesamtvolumen der Metacestodenesikel, die in Co-Kultur mit Hepatocyten (Co-Kultur) sowie axenisch unter reduzierenden Bedingungen in cMEM, dMEM und MEM kultiviert wurden. Im Vergleich zur Co-Kultur ist das Volumen der dMEM-Ansätze deutlich geringer, während es in den meisten cMEM-Ansätze sogar darüber liegt. In den MEM-Ansätzen konnte am Ende des Versuchs kein Volumen bestimmt werden, da alle Vesikel unabhängig der zugegebenen Zusätze innerhalb kurzer Zeit (~1-2 Wochen) starben. Die unterschiedlichen Kombinationen der zugegebenen reduzierenden Zusätze führen sowohl in den dMEM-Ansätzen als auch in den cMEM-Ansätzen zu einer vergleichbaren Volumenzunahme. Nach Zugabe von L-Cystein ist kein Unterschied zur Kontrolle ohne Zusätze feststellbar. Bathocuproinedisulfonic-Acid und  $\beta$ -Mercaptoethanol führen separat zugegeben zu einer deutlichen Volumenzunahme (dMEM: 3x, cMEM: 9x). Diese Volumenzunahme kann durch eine Kombination mit L-Cystein leicht gesteigert werden. Die besten Ergebnisse werden jedoch durch die gemeinsame Verwendung aller drei Zusätze erreicht (dMEM: 3x, cMEM: 11-12x). Dies ist auch die Kombination, bei welcher sowohl in dMEM als auch in cMEM die meisten Vesikel überleben. Daher wurden die drei Zusätze in allen folgenden axenischen Kultivierungen eingesetzt.

### 3.12.2.2 Auswirkung von Sauerstoff im Medium und in der Gasphase

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluß von Sauerstoff im Medium und der Gasphase auf das Wachstum und das Überleben von axenisch in vitro kultivierten Metacestodenesikeln untersucht. Dafür wurden in verschiedenen Kombinationen entweder dem Medium reduzierende Reagenzien ( $\beta$ -Mercaptoethanol, Bathocuproinedisulfonic-Acid, L-Cystein) zugegeben oder die sauerstoffhaltige Gasphase durch Stickstoff ersetzt. Insgesamt wurden 4 verschiedene Bedingungen (**A**: Medium und Gasphase + O<sub>2</sub>, **B**: Medium + O<sub>2</sub> und Gasphase + N<sub>2</sub>, **C**: Medium + reduzierende Reagenzien und Gasphase + O<sub>2</sub>, **D**: Medium + reduzierende Reagenzien und Gasphase + N<sub>2</sub>) getestet und in verschiedenen Versuchsansätzen ausgewertet.

Die Abbildung 77 zeigt die Kultivierungsbedingungen **C** und **D**. Im Versuch wurde das Wachstum von Metacestodenesikeln in verschiedenen Medien (MEM, dMEM, cMEM) nach Zugabe von reduzierenden Reagentien ( $\beta$ -Mercaptoethanol, Bathocuproinedisulfonic-Acid, L-Cystein) über einen Zeitraum von 5 Wochen unter normalen Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub> und ~20% O<sub>2</sub> in der Atmosphäre) und unter sauerstoffreduzierten Bedingungen, die durch eine Stickstoffatmosphäre erreicht wurden (37°C, N<sub>2</sub>-Atmosphäre) verfolgt. Unter beiden Bedingungen starben die Vesikel, die in MEM (Dulbeccos Minimal Essential Medium) kultiviert wurden innerhalb der ersten zwei Wochen. Sowohl in Anwesenheit von Sauerstoff, als auch unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre ist die Volumenzunahme der Vesikel, die in cMEM kultiviert wurden deutlich stärker als die der Vesikel, die in dMEM kultiviert wurden. Innerhalb der ersten 2-3 Wochen sind die Unterschiede in der Volumenzunahme bei den Vesikeln, die in cMEM (N<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>) bzw. in dMEM (N<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>) kultiviert wurden vergleichbar. Ab der dritten Woche zeigten sich deutliche Unterschiede. Während das Volumen der Vesikel, die unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre wuchsen stark zunahm, nahm das Volumen der Vesikel, die unter Sauerstoffeinfluß wuchsen, in den drei Folgewochen nur noch gering zu. Nach Beendigung des Versuchs überlebten in den Ansätzen mit Sauerstoff in der Gasphase in dMEM 25% und in cMEM 55%. In den Ansätzen mit Stickstoff in der Gasphase überlebten in dMEM 65% und in cMEM 95% der eingesetzten Metacestodenesikel (Abb. 78). Me-



tacestodenvesikel die axenisch unter nicht reduzierenden Bedingungen kultiviert werden wachsen sehr schlecht und sterben sehr früh. Die Abbildung 118 zeigt einen Vergleich der Überlebensrate von Metacestodenvesikeln, die nach Zugabe von reduzierenden Reagenzien unter einer Stickstoffatmosphäre kultiviert wurden, mit solchen, die ohne Zugabe der reduzierenden Reagenzien unter normalen Zellkulturbedingungen (Kultivierungsbedingung A) kultiviert wurden. Innerhalb von 2 Wochen starb dabei ein Großteil der eingesetzten Vesikel, die in Gegenwart von Sauerstoff im Medium und der Gasphase kultiviert wurden. Am Ende des fünfwöchigen Versuchs haben dabei 10% der in cMEM und keine der in dMEM kultivierten Metacestodenvesikel überlebt (Abb. 78). In Abbildung 76 ist das Endvolumen von Metacestodenvesikeln gezeigt, die ohne Zugabe von reduzierenden Reagenzien fünf Wochen unter einer Stickstoffatmosphäre kultiviert wurden (Kultivierungsbedingung B, Ansatz dMEM und cMEM). Am Ende des Versuchs überlebten 35% der in cMEM- und 10% der in dMEM-kultivierten Vesikel (Abb. 78).

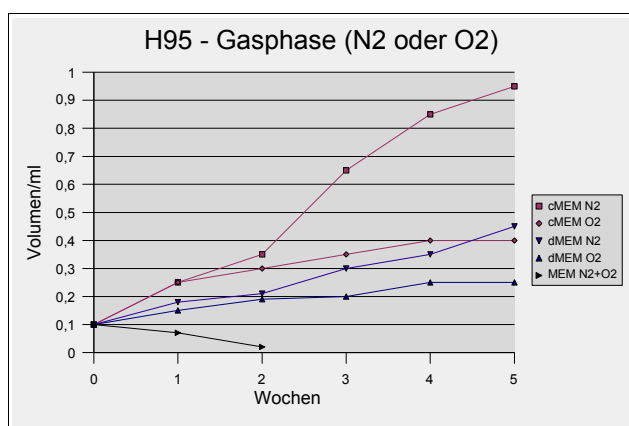


Abb. 77: Wachstum von Metacestodenvesikeln (H95) nach Zugabe reduzierender Reagenzien unter verschiedenen Atmosphären (N<sub>2</sub> oder O<sub>2</sub>)

Gezeigt ist die Volumenzunahme der Vesikel in einem Beobachtungszeitraum von 5 Wochen. Eingesetzt wurden je versuchsansatz 100 µl Metacestodenvesikel (H95). Zu den verwendeten Medien (cMEM, dMEM und MEM) wurden reduzierende Reagenzien gegeben (β-ME, Bath, L-Cystein). In einem Teil der Ansätze wurde die Gasphase durch N<sub>2</sub> und die 15 ml-Greineröhrchen bis zum folgenden Medienwechsel fest verschlossen. Im anderen Teil der Ansätze wurden die Röhrchen nicht dicht verschlossen, um einen Gasaustausch mit der Sauerstoffhaltigen Umgebung zu gewährleisten. 3x wöchentlich wurde das Medium gewechselt (2 ml).

H95 - Überlebende Metacestodenvesikel nach Wachstum unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in Abhängigkeit von O<sub>2</sub> oder N<sub>2</sub> in der Gasphase

Überleben in:

Medium	Gas-Phase	Bed.	dMEM	dMEM
ox.	O <sub>2</sub>	A	0%	10%
ox.	N <sub>2</sub>	B	10%	35%
red.	O <sub>2</sub>	C	25%	55%
red.	N <sub>2</sub>	D	65%	95%

Abb. 78: Überlebende Metacestodenvesikel nach Wachstum unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in Abhängigkeit von O<sub>2</sub> oder N<sub>2</sub> in der Gasphase.

Angegeben sind die überlebenden Vesikel in Prozent nach einer fünf-wöchigen Kultivierung unter Zugabe reduzierender Reagenzien (red.) oder ohne diese Reagenzien (ox.). Die Gasphase entsprach entweder den normalen Zellkulturbedingungen (5% CO<sub>2</sub> und ~20% O<sub>2</sub> in der Atmosphäre, dargestellt als O<sub>2</sub>) oder wurde durch Stickstoff ersetzt (N<sub>2</sub>). Die verschiedenen Kultivierungsbedingungen (Bed. A-D) sind im Text erläutert.

Diese Versuche zeigen deutlich, dass die alleinige Anwesenheit der reduzierenden Reagenzien für das Überleben der Metacestodenvesikel nicht ausreicht und eine sauerstofffreie Atmosphäre (N<sub>2</sub>) essentiell ist. Daher wurde in allen folgenden Versuchen zusätzlich zu den reduzierenden Reagenzien für eine Stickstoffatmosphäre gesorgt.

### 3.12.2.3 Auswirkung der Medienwechselhäufigkeit

Der Vergleich der Wachstumskurven zwischen cMEM- und dMEM-kultivierten Metacestodenvesikeln zeigt, dass in cMEM Bedingungen erfüllt sind, die ein stärkeres Wachstum erlauben. Um zu überprüfen, ob die dafür verantwortlichen Faktoren während des Wachstums verbraucht werden wurde das Medium im folgenden Versuch in unterschiedlichen Intervallen gewechselt (1x, 2x, 3x wöchentlich). Außerdem wurden in verschiedenen Ansätzen unterschiedliche Mengen an Medium eingesetzt (10 faches und 40 faches Volumen der eingesetzten Metacestodenvesikel) um das Wachstum unter verschiedenen Recourcenbedingungen zu beobachten. Wie in den Abbildungen 79 + 80 ersichtlich, führt ein dreimal wöchentlich erfolgter Medienwechsel bei Metacestodenvesikeln, die axenisch in cMEM kultiviert wurden, nach 5 Wochen zum größten Gesamtvolumen,

während axenisch in dMEM kultivierte Metacestodenvesikel ihr Volumenoptimum bei einem einzigen Medienwechsel pro Woche erreichen. Die Menge an eingesetztem Medium hat keine Auswirkung auf das Wachstum der Vesikel. Sowohl mit dem 10 fachen (1 ml) als auch mit dem 40 fachen Volumen (4 ml) der eingesetzten Vesikel (0.1 ml) wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt wie beim Einsatz des 20 fachen Volumens (2 ml), das in allen anderen Versuchen als Standard verwendet wurde (ohne Abbildung, vergl. dazu Abb. 78).

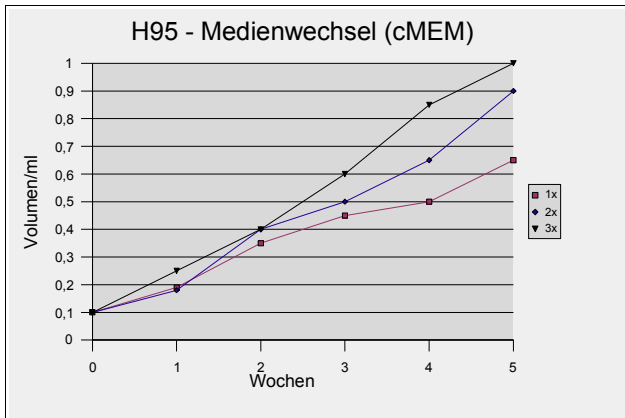


Abb. 79: Wachstum von Metacestodenvesikeln (H95) in cMEM bei unterschiedlicher Medienwechselfrequenz.

Gezeigt ist die Volumenzunahme der Vesikel in einem Beobachtungszeitraum von 5 Wochen. Das verwendete Medium (cMEM = MEM + 10% FCS, 7 Tage mit wachsenden RH Zellen konditioniert) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewechselt (1x, 2x, 3x wöchentlich). Eingesetzt wurden jeweils 2 ml Medium (+  $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein), die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt.

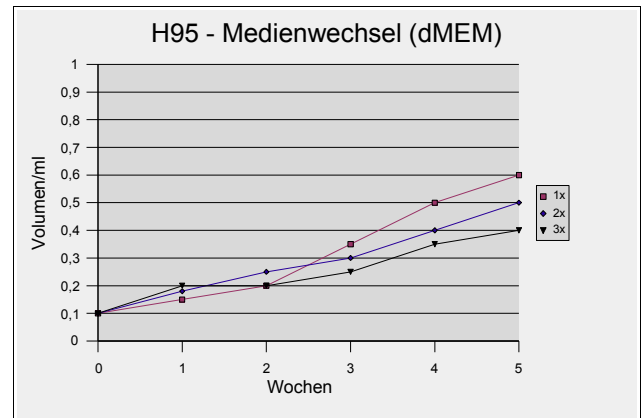


Abb. 80: Wachstum von Metacestodenvesikeln (H95) in dMEM bei unterschiedlicher Medienwechselfrequenz

Gezeigt ist die Volumenzunahme der Vesikel in einem Beobachtungszeitraum von 5 Wochen. Das verwendete Medium dMEM (MEM+ 10% FCS) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewechselt (1x, 2x, 3x wöchentlich). Eingesetzt wurden jeweils 2 ml Medium (+  $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein), die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt.

### 3.12.2.4 Auswirkungen des pH-Wertes

Während der axenischen Kultivierung von Metacestodenvesikeln kann eine Ansäuerung des Mediums, vor allem in sehr schnell wachsenden Ansätzen, beobachtet werden. In den folgenden Versuchen wurde die Auswirkung des pH-Wertes des eingesetzten Mediums auf das Wachstum und das Überleben der Metacestodenvesikel untersucht (Abb. 81 + 82). Außerdem wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen die Ansäuerung des Mediums nach der Zugabe von Metacestodenvesikeln aus einer Co-Kultur oder axenisch kultivierten Vesikeln überprüft (Abb.83 + 84).

Während des axenischen Wachstums in konditionierten Medien mit pH-Werten zwischen 5 und 9 konnte die größte Volumenzunahme innerhalb des fünfwöchigen Versuchszeitraumes bei pH 7 gemessen werden (Abb. 81). Dabei wurden die Medien mit den eingestellten pH-Werten 3x wöchentlich zu den Metacestodenvesikeln gegeben. Innerhalb der folgenden 2-3 Tage säuerte sich das Medium bei den Ansätzen pH 6+7 bis auf einen pH-Wert von  $\sim$ 5 an. Die Ansätze mit höheren pH-Werten zeigten nur eine leichte (Ansatz: pH8) bzw. keine Ansäuerung (Ansatz: pH9). In einem parallel durchgeführten Experiment, in welchem dMEM anstelle von cMEM verwendet wurde (ohne Abbildung) wurden vergleichbare Ergebnisse ermittelt. Während des Versuchs starben sowohl in cMEM als auch in dMEM Metacestodenvesikel nur in den Ansätzen mit hohem pH-Wert (Abb. 82, dMEM nicht gezeigt). Daraus folgt, dass der für das Wachstum und das Überleben axenisch kultivierter Metacestodenvesikel ideale pH-Wert des Mediums (cMEM und dMEM) bei pH7 liegt.

Um Rückschlüsse auf die beobachteten Wachstumseffekte bei verschiedenen pH-Werten (s.o.) führen zu können wurde in einem weiteren Versuch getestet, wie schnell die auf verschiedene Arten kultivierten Metacestodenvesikel das Medium ansäuern. Dafür wurden Metacestodenvesikel entweder aus einer Co-Kultur (durch mehrere Waschstufen von Fütterzellen befreit) oder aus

einer axenischen Kultur in cMEM oder dMEM überführt und die Ansäuerung des Mediums über 7 Tage protokolliert. Zusätzlich wurde die pH-Änderung einer Co-Kultur gemessen (Abb. 83 + 84).

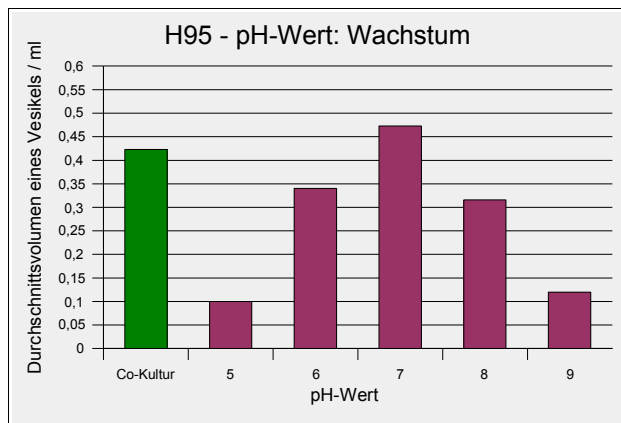


Abb. 81: Wachstum von Metacystodanvesikeln (H95) in cMEM mit verschiedenen pH-Werten.

Gezeigt ist die Volumenzunahme von Metacystodanvesikeln, die bei dreimal wöchentlichem Mediumwechsel (cMEM) über 5 Wochen bei verschiedenen pH-Werten des Mediums kultiviert wurden. Das Medium wurde vor der Verwendung mit HCl bzw. NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Eingesetzt wurden jeweils 2 ml Medium (+ $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein), die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt. Das Anfangsvolumen eines Vesikels betrug  $\sim 80\mu\text{l}$  (Durchmesser  $\sim 5$  mm).

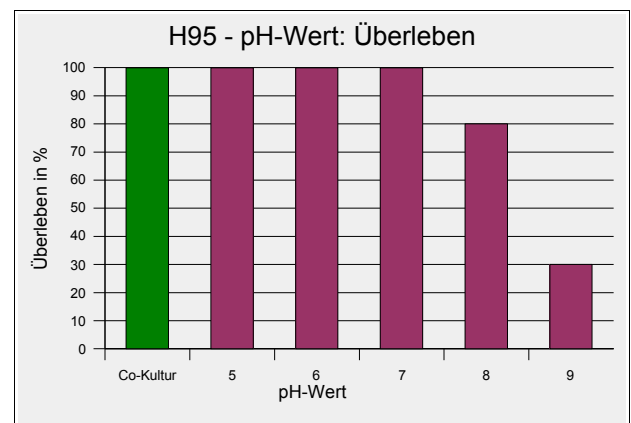


Abb. 82: Überleben von Metacystodanvesikeln (H95) während des Wachstums in cMEM mit verschiedenen pH-Werten.

Zu sehen ist die prozentuale Menge an überlebenden Metacystodanvesikeln nach einer fünfwoöchigen axenischen Kultivierung in cMEM (+ $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein,  $\text{N}_2$ -Atmosphäre) mit verschiedenen pH-Werten.

Anhand der Daten können drei Aussagen getroffen werden. Sowohl axenische als auch co-kultivierte Metacystodanvesikel säuern in cMEM das Medium schneller an als in dMEM (cMEM- und dMEM-Kurven, Abb. 83 + 84). Vorher axenisch kultivierte Vesikel führen in cMEM schon innerhalb von 2 Tagen zu einem pH-Wert, der wachstumseinschränkend ist während diese Werte in dMEM nicht erreicht werden (Abb. 84 + 81). Auffallend ist die große Differenz der Werte zwischen im Vorfeld co-kultivierten Vesikeln, die innerhalb der 7 Tage das Medium (cMEM) nur sehr schwach ansäuern und im Vorfeld axenisch kultivierten Vesikeln, die das Medium (cMEM) innerhalb von 2 Tagen auf einen pH-Wert von 5 ansäuern (cMEM-Kurven, Abb. 83 + 84).

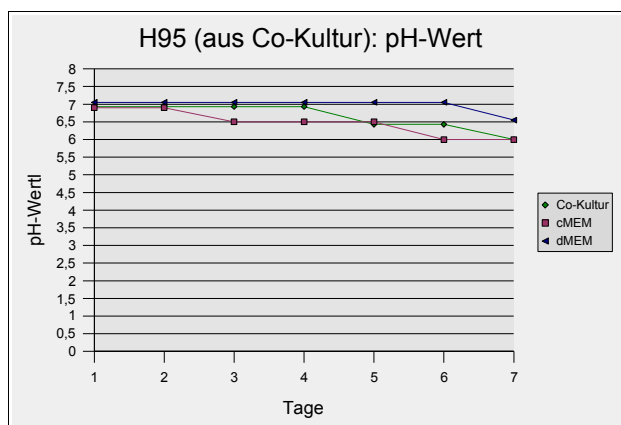


Abb. 83: pH-Änderung des Mediums während der axenischen Kultivierung von frisch aus einer Co-Kultur isolierten Metacystodanvesikeln

Gezeigt ist die pH-Wertänderung während einer axenischen Kultivierung von Metacystodanvesikeln in einem Zeitraum von 7 Tagen. Während dieser Zeit wurde das Medium nicht gewechselt. Eingesetzt wurden von Fütterzellen befreite Metacystodanvesikel aus einer Co-Kultur. cMEM und dMEM geben die Medien an, die eingesetzt wurden. Zusätzlich ist die pH-Änderung einer Co-Kultur angegeben (Co-Kultur).

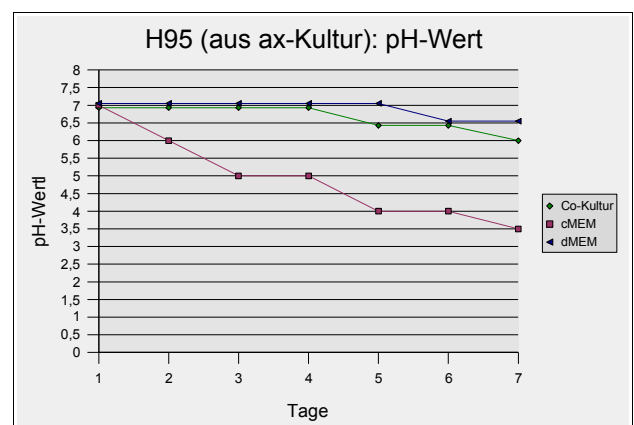


Abb. 84: pH-Änderung des Mediums während der axenischen Kultivierung von zuvor axenisch kultivierten Metacystodanvesikeln

Gezeigt ist die pH-Wertänderung während einer axenischen Kultivierung von Metacystodanvesikeln in einem Zeitraum von 7 Tagen. Während dieser Zeit wurde das Medium nicht gewechselt. Eingesetzt wurden vorher axenisch kultivierte Metacystodanvesikel. cMEM und dMEM geben die Medien an, die eingesetzt wurden. Zusätzlich ist die pH-Änderung einer Co-Kultur angegeben (Co-Kultur).

### 3.12.3 Verwendung verschieden konditionierter RH-Medien (cMEM)

Da sich in verschiedenen Versuchsansätzen während der axenischen Kultivierung von Metacestodeneskeln in konditioniertem Medium (cMEM) die Volumenzunahme der Vesikel deutlich von einander unterschied, wurden unterschiedliche konditionierte Medien hergestellt und getestet. Weiterhin wurde untersucht, ob das Einfrieren des Mediums auf  $-20^{\circ}\text{C}$  einen Einfluss auf das Wachstum der Vesikel hat (Abb. 85). Da die in zuvor eingefrorenem Medium (cMEM 7d  $-20^{\circ}\text{C}$ ) eine stärkere Volumenzunahme der Vesikel als in frischem Medium (cMEM frisch) beobachtet werden konnte, wurde seither für alle Versuche bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagertes Medium verwendet. Wie sich während anderer Versuche (Brutkapselübertragung) heraus stellte führt die Verwendung von frischem cMEM zu einer verstärkten Bildung von Brutkapseln und wirkte sich negativ auf die Volumenzunahme der Metacestodeneskel aus (Abb. 98).

Für den Nachweis, welches konditionierte Medium zum besten Wachstum führt, wurde in der Herstellung des cMEMs die Zahl der eingesetzten Fütterzellen (RH<sup>-</sup>) und die Zeit der Konditionierung variiert. In eine Zellkulturflasche (175 cm<sup>2</sup>) wurden dafür in 50 ml dMEM entweder  $5 \times 10^5$  (1),  $2 \times 10^7$  (2) oder adhärent wachsende (3) RH-Zellen eingesetzt und 7 Tage (A) oder 3 Tage (B) im Brutschrank bebrütet. Daraus ergaben sich 6 verschiedene Kombinationen konditionierter Medien (A1, A2, A3, B1, B2, B3). Die konditionierten Medien wurden steril filtriert und bis zum Einsatz bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Abbildung 85 zeigt, dass die größte Volumenzunahme in Medium A1 und die geringste in Medium B2 erfolgte. Dafür überlebten in Medium B2 alle der eingesetzten Vesikel und in A1 nur 65%. Allgemein lässt sich aus diesem Experiment schließen, dass der Einsatz von  $5 \times 10^5$  Zellen (A1, B1) zu einem besseren Wachstum der Metacestodeneskel führt, während die Überlebensrate in Medien die mit  $2 \times 10^7$  Zellen (A2, B2) konditioniert wurden höher ist. Die Medien, die über adhärent wachsende Zellen (A3, B3) konditioniert wurden führen zu einem verhältnismäßig geringen Wachstum und Überlebensraten von  $\sim 80\%$ . Aufgrund dieser Beobachtungen lassen sich einige der Versuche, in welchen nur ein geringes Wachstum oder eine niedrige Überlebensrate beobachtet wurde, neu deuten.

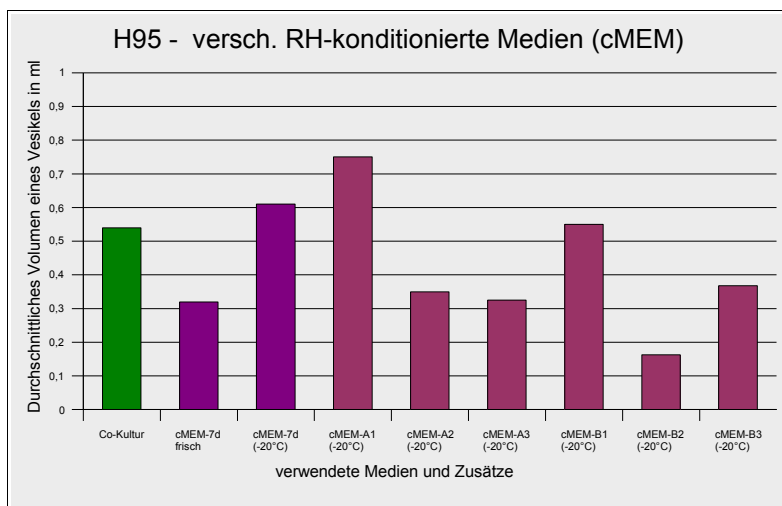


Abb. 85: Wachstum von Metacestodeneskeln (H95) in verschiedenen RH-konditionierten Medien

Gezeigt sind die Ergebnisse von zwei unabhängig durchgeführten Versuche. Die linken drei Balken zeigen die Volumenzunahme der eingesetzten Metacestodeneskel im Vergleich zwischen einer Co-Kultur und tiefgefrorenem bzw. frisch hergestelltem cMEM (cMEM-7d). Im zweiten Versuch (rechte 6 Balken) wurde die Volumenzunahme der eingesetzten Metacestodeneskel in einem Beobachtungszeitraum von 5 Wochen unter Verwendung verschiedener konditionierter Medien (A1 - B3) gemessen. Eingesetzt wurden jeweils 2 ml Medium, die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt.

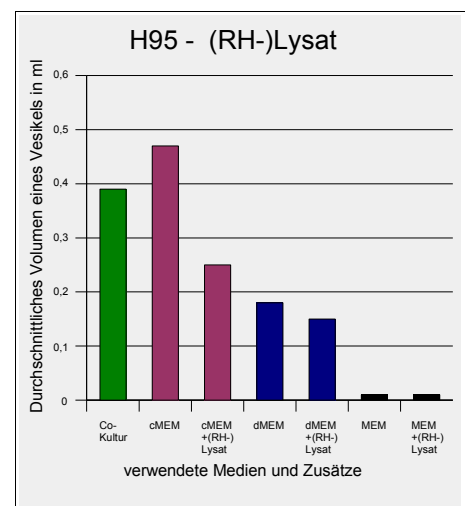


Abb. 86: Einfluß von RH-Lysat (10%) auf das Metacestodeneskel-Wachstum.

Adhärent wachsende RH-Zellen wurden mechanisch lysiert (FastPrep, Qbiogen) und in 1 vol MEM aufgenommen. Dieses Lysat wurde in Verschiedenen Medien (10%) gegeben und darin dann Metacestodeneskel axenisch kultiviert. Eingesetzt wurde jeweils 1 ml Medium, die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt.

Um einen Einfluß auf das Wachstum der Metacestodenvesikel durch RH<sup>-</sup>-Zellen, die während der Konditionierung des Mediums starben, zu bestimmen und um auszuschließen, dass zum Beispiel Zellbestandteile der RH<sup>-</sup>-Zellen für das Wachstum der Metacestodenvesikel verantwortlich sind, wurde steril filtriertes RH-Lysat zu den eingesetzten Medien gegeben (10% Volumenanteil) und das Wachstum der Vesikel verfolgt. Für Metacestodenvesikel, die in cMEM und RH-Lysat kultiviert wurden konnte nach 5 Wochen ein deutlich geringeres Volumen gemessen werden als für Vesikel des cMEM Ansatzes. Der gleiche Effekt stellte sich auch in dMEM ein (Abb. 86). Auffallend war die Zahl der gestorbenen Metacestodenvesikel bei Zugabe des RH-Lysats. Während in MEM unabhängig der Zugabe nach 5 Wochen alle Vesikel tot waren, überlebten in Anwesenheit von RH-Lysat in cMEM nur 30% und in dMEM nur 10% der eingesetzten Vesikel. In den Ansätzen ohne RH-Lysat überlebten dagegen in cMEM 95% und in dMEM 60% der eingesetzten Vesikel (ohne Abb.).

### 3.12.4 Ax. Kultursystem: Konditionierte Medien verschiedener Zelllinien

Die axenische Kultivierung von Metacestodenvesikeln unter reduzierenden Bedingungen gelingt in Medium, das mit RH-Zellen konditioniert wurde. Um zu überprüfen, ob auch Medien, die mit anderen Zellen konditioniert wurden, das Wachstum von Metacestodenvesikeln ermöglichen, wurden unter Einsatz verschiedener Zelllinien (RH<sup>-</sup>, HepG2, HEK, Gitter, CHO, HMNO2, HELA, HEC1B, HEP2, U317) Medien konditioniert. Die verwendeten Zelllinien sind im Kapitel 5.8.2 genauer beschrieben. Um störende Effekte unterschiedlicher Medien auszuschließen, wurden nur Zelllinien verwendet, die in dMEM ohne weitere Zusätze wachsen können. Die konditionierten Medien wurden nach einer Bebrütung von  $1 \times 10^7$  Zellen in 50 ml dMEM nach 7 Tagen sterilfiltriert und bis zum Einsatz bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen wurden zu jedem Medium die reduzierenden Reagenzien  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME, 0.001%), Bathocuproinedisulfonic-Acid (Bat, 10 nM) und L-Cystein (Cys, 100 nM) gegeben. Das Medium (2ml je Ansatz) wurde 3x wöchentlich gewechselt und die Gasphase durch Stickstoff ersetzt.

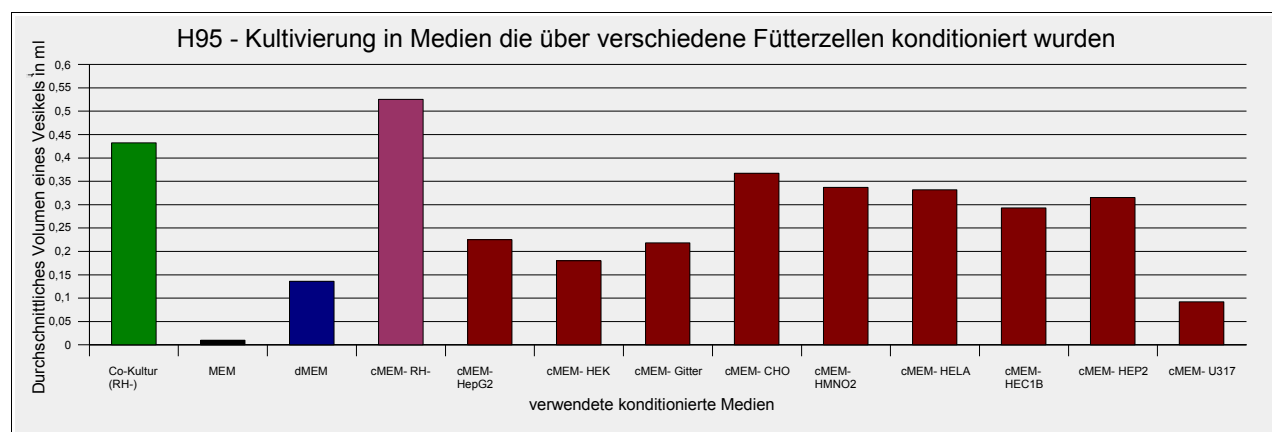


Abb. 87: Wachstum von Metacestodenvesikeln (H95) in, mit verschiedenen Zellen, konditionierten Medien.

Gezeigt ist das durchschnittliche Endvolumen eines Metacestodenvesikels nach einem Versuchsdauer von 5 Wochen. Verwendet wurden neben den Kontrollen (MEM und dMEM) Medien, die mit verschiedenen Fütterzellen 7 Tage konditioniert wurden (RH<sup>-</sup>, HepG2, HEK, Gitter, CHO, HMNO2, HELA, HEC1B, HEP2, U317). Den Medien wurden die reduzierenden Reagenzien  $\beta$ -Mercaptoethanol (ME, 0.001%), Bathocuproinedisulfonic-Acid (Bat, 10 nM) und L-Cystein (Cys, 100 nM) zugegeben. Eingesetzt wurden jeweils 2 ml Medium und die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt. Das Medium wurde 3x wöchentlich gewechselt. Das Anfangsvolumen eines Vesikels betrug  $\sim 80\mu\text{l}$  (Durchmesser  $\sim 5$  mm).

In Abbildung 87 ist das durchschnittliche Endvolumen eines Vesikels nach fünfwöchiger axenischer Kultivierung in den beschriebenen konditionierten Medien angegeben. Die mit Abstand größte Volumenzunahme, konnte in RH-konditioniertem Medium beobachtet werden. Dabei wuchs ein Vesikel von durchschnittlich  $80\mu\text{l}$  Ausgangsvolumen auf ein  $\sim 7$  faches Volumen von  $530\mu\text{l}$ . Daneben war in mehreren Zelllinien (CHO, HMNO2, HELA, HEC1B, HEP2) eine deutliche Zunahme der Vesikelgröße zu erkennen, die aber weder die Werte der Co-Kultur ( $\sim 80\%$ ) noch des RH-kon-

ditionierten Mediums (~70%) erreichten. Die konditionierten Medien dieser Zelllinien ermöglichten eine durchschnittliche vierfache Volumenzunahme der Metacestodenesikel. Ein leichtes Wachstum, mit einer zwei- bis dreifachen Volumenzunahme konnte bei den Zelllinien HepG2, HEK und Gitter beobachtet werden. In dMEM konnten die eingesetzten Metacestodenesikel ihr Volumen um 50% steigern. Kein Wachstum wurde in dem U317-konditionierten Medium festgestellt. In allen Ansätzen außer MEM (0%), HEK (60%) und HMNO2 (60%) überlebten mindestens 90% der eingesetzten Metacestodenesikel (ohne Abb.).

### 3.12.5 Axenisches Kultursystem: Einfluß von Wachstumsfaktoren

Eine wichtige Fragestellung ist die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Entwicklung des Fuchsbandwurmes, vor allem im Zusammenhang mit der Annahme, dass Wirt und Parasit miteinander kommunizieren können. Im Gegensatz zur Co-Kultivierung der Echinokokken-Metacestodenesikel mit Fütterzellen, in der die eingesetzten Wachstumsfaktoren den Fuchsbandwurm und die Fütterzellen stimulieren können, kann im axenischen Kultursystem ein fuchsbandwurmspezifischer Einfluß der Wachstumsfaktoren direkt beobachtet werden.

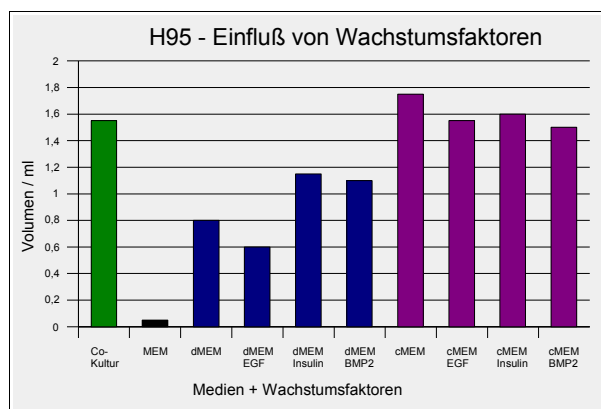


Abb. 88: Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die Volumenzunahme.

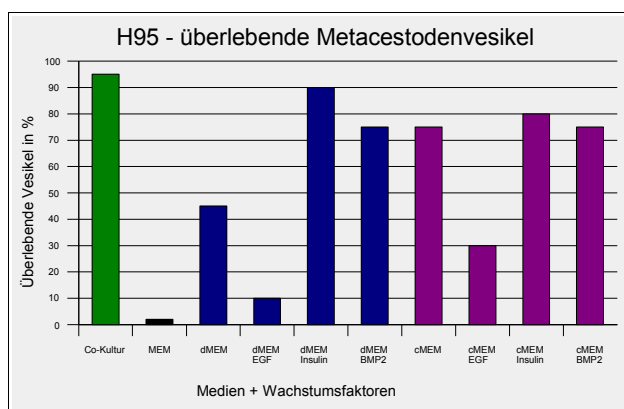


Abb. 89: Einfluß von Wachstumsfaktoren auf das Überleben.

Gezeigt ist der Einfluß der Wachstumsfaktoren Insulin (86 nM), BMP2 (10 ng/ml) und EGF (25 ng/ml) auf das Wachstum und das Überleben von H95-Metacestodenesikeln nach einer Versuchsdauer von 5 Wochen. Den Medien, die 3x wöchentlich gewechselt wurden, wurde nur  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,001%) als reduzierendes Reagenz zugegeben. Die Gasphase wurde durch Stickstoff ersetzt. Eingesetzt wurden je Ansatz 300  $\mu$ l Metacestodenesikel. Dieser Versuch wurde von Lukas Sesterhenn im Rahmen seiner medizinischen Dissertation durchgeführt (bisher unveröffentlicht, Stand: Januar 2006).

In einem ersten Vorversuch (durchgeführt von Lukas Sesterhenn im Rahmen seiner medizinischen Dissertation) wurden unter anderem die humanen Wachstumsfaktoren EGF (25ng/ml), Insulin (86 nM) und BMP-2 (10ng/ml) zu axenisch kultivierten Metacestodenesikeln gegeben und deren Wachstum und Überleben protokolliert. Zu den eingesetzten Medien wurde in diesem Versuch nur  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,001%) als reduzierendes Reagenz gegeben. Das Medium wurde 3x wöchentlich gewechselt und die Gasphase durch Stickstoff ersetzt. Die Abbildungen 96+ 97 stellen die dabei beobachtete Volumenzunahme und die prozentuale Anzahl an überlebenden Vesikeln am Ende des fünfwöchigen Versuchs dar. Es zeigte sich, dass nach Zugabe von Insulin (cMEM-Insulin) und BMP2 (cMEM-BMP2) in cMEM ein geringeres Endvolumen erreicht wurde als in dem Kontrollansatz ohne Wachstumsfaktoren (cMEM). Die gleiche Menge an zugegebenem Insulin (dMEM-Insulin) und BMP2 (dMEM-BMP2) führte dagegen in dMEM zu einem größeren Endvolumen als in der dMEM-Kontrolle (dMEM). Besonders auffällig war die Anzahl an überlebenden Vesikeln in dMEM nach Zugabe von Insulin und BMP2. Während in der dMEM Kontrolle nur 45% der Vesikel überlebten, waren es bei Einsatz von Insulin 90% und bei BMP2 75%. Die Zugabe von EGF führte in beiden Medien zu einer geringeren Volumenzunahme und zu einer geringeren Überlebensrate als in den Kontrollen. Da die drei Wachstumsfaktoren Insulin, BMP2

und EGF in diesem Vorversuch deutliche Effekte auf das Wachstum und das Überleben der axenisch kultivierten Metacestodenvesikel zeigten, wurde ihr Einfluß in einer Reihe weiterer Experimente intensiver untersucht.

### 3.12.5.1 Einfluß von Insulin auf axenisch kultivierte Metacestodenvesikel

2003 wurde von unserer Arbeitsgruppe das Insulinrezeptor-Homolog EmIR von *E. multilocularis* beschrieben [179]. Nach einer Stimulation mit humanem Insulin konnte sowohl eine Phosphorylierung von EmIR als auch von EmERK beobachtet werden [Konrad, C, persönliche Mitteilung]. Daher war eine ausführliche Beschreibung und Bestätigung der Wachstumseffekte, die in axenisch kultivierten Metacestodenvesikeln nach Zugabe von Insulin beobachtet wurden, angebracht. In den hier beschriebenen Experimenten wurde humanes Insulin in einer Konzentration von 86 nM eingesetzt, da mit dieser Konzentration in den Vorversuchen sichtbare Effekte erzielt wurden.

In Abbildung 90 sind die typischen Wachstumskurven für H95-Metacestodenvesikel in cMEM (7 Tage konditioniert mit RH-Zellen) und dMEM nach einer Zugabe von 86 nM Insulin dargestellt. Dieser Versuch wurde mehrmals unabhängig durchgeführt. In allen Versuchen konnte ein vergleichbarer Kurvenverlauf festgestellt werden. Da sich das erreichte Endvolumen zwischen den einzelnen Versuchen jedoch deutlich unterschied, was auf die jeweils eingesetzten Metacestodenvesikel zurückzuführen ist, ist hier das repräsentative Ergebnis eines dieser Versuche gezeigt. Eingesetzt wurden dafür in jeweils 8 unabhängigen Versuchsansätzen H95-Metacestodenvesikel mit einem Einzelvolumen von ~60 µl und deren Wachstum über 5 Wochen verfolgt. Deutlich sind insulinabhängige Volumenunterschiede während des Wachstums zu erkennen. Dabei führt humanes Insulin in cMEM zu einem 20% geringeren und in dMEM zu einem 30% höheren Endvolumen als in den Kontrollen. Während des Versuches überlebten in cMEM unabhängig von der Insulinzugabe ~80% der eingesetzten Vesikel. In dMEM überlebten dagegen nach der Zugabe von Insulin alle eingesetzten Vesikel, während in der dMEM-Kontrolle, wie erwartet nur ~60% der Vesikel überlebten. Neben dem nur in dMEM zu beobachtenden protektiven Einfluß von Insulin auf das Überleben der eingesetzten Vesikel, konnte ein durch mehrere Versuche bestätigter, wachstumsfördernder Effekt von Insulin in dMEM und ein leicht wachstumshemmender Effekt in cMEM (7 Tage konditioniert mit RH-Zellen) nachgewiesen werden. Auch auf die Bildung von Brutkapseln zeigt sich ein Einfluß von Insulin. Während H95-Metacestodenvesikel in einer cMEM-Kultur nach 4-6 Wochen mit der Bildung von Brutkapseln begannen, blieb dieses unter dem Einfluß von Insulin aus. Ein weiterer sehr interessanter Effekt von Insulin war das Ausbleiben der Brutkapselbildung während einer Kultivierung von jungen Metacestodenvesikeln in cMEM. Wurden Vesikel eingesetzt, die schon Brutkapseln enthielten, entwickelten sich die Brutkapseln in Gegenwart von Insulin nur sehr langsam weiter, dafür wuchsen die Vesikel deutlich schneller als die in den insulinfreien Kontrollen.

In Versuchen mit unterschiedlich konditionierten Medien (Kapitel 3.12.3) konnte für das Medium cMEM-B2 nur ein geringer wachstumssteigernder Effekt festgestellt werden. In diesem Medium überlebten nach 5 wöchiger Kultivierung 100% der eingesetzten Vesikel, zeigten jedoch nur eine sehr geringe Volumenzunahme (~3x). In Abbildung 91 ist die Volumenzunahme von H95-Metacestodenvesikeln, die unter Zugabe von 86 nM Insulin in cMEM-B2 über 8 Wochen kultiviert wurden, dargestellt. Eingesetzt wurden Vesikel, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien befanden. Während die H95-X-Vesikel durch eine mehrlagige intravesikuläre Zellschicht leicht trüb erscheinen waren die H95-Y-Vesikel klar durchscheinend. Im Gegensatz zu cMEM (7 Tage konditioniert mit RH-Zellen, vergl. Abb. 90) konnte in cMEM-B2 in den Ansätzen die Insulin enthielten ein deutlich höheres Volumen gemessen werden als in den Kontrollen. In dem wachstumshemmenden cMEM-B2 wirkte sich die Zugabe von Insulin sowohl bei den eingesetzten H95-X- als auch bei den H95-Y-Metacestodenvesikeln wachstumsfördernd aus. Ein Vergleich der Kurvensteigerung zwischen Metacestodenvesikeln, die in cMEM (7 Tage konditioniert mit RH-Zellen, vergl. Abb. 90) oder cMEM-B2 (Abb. 91) kultiviert wurden, zeigt dass der wachstumshemmende

Effekt des Mediums cMEM-B2 durch eine Insulinzugabe nicht aufgehoben wurde, jedoch verringert werden konnte. Das erreichte Endvolumen lag nach der Zugabe von Insulin für H95-X-Vesikel 40% und für H95-Y-Vesikel 60% über den Werten der cMEM-B2-Kontrolle. In einem parallel durchgeführten Experiment wuchsen in dMEM (in der Abbildung 91 nicht gezeigt), ob mit oder ohne Insulin, sowohl H95-X- als auch H95-Y-Metacestodenvesikel entsprechend dem Kurvenverlauf der in Abb. 90 gezeigt ist. In cMEM-B2 wird demnach ein höheres Endvolumen erreicht als in dMEM und ein niedrigeres als in cMEM (7 Tage konditioniert mit RH-Zellen). Die Zugabe von Insulin ermöglicht in cMEM-B2 eine größere Volumenzunahme, die Werte von cMEM (7 Tage konditioniert mit RH-Zellen) werden jedoch nicht erreicht. Die Überlebensrate lag in cMEM-B2, unabhängig von zugegebenem Insulin, am Ende des achtwöchigen Versuchs sowohl bei H95-X- als auch bei H95-Y-Metacestodenvesikeln bei 100%.

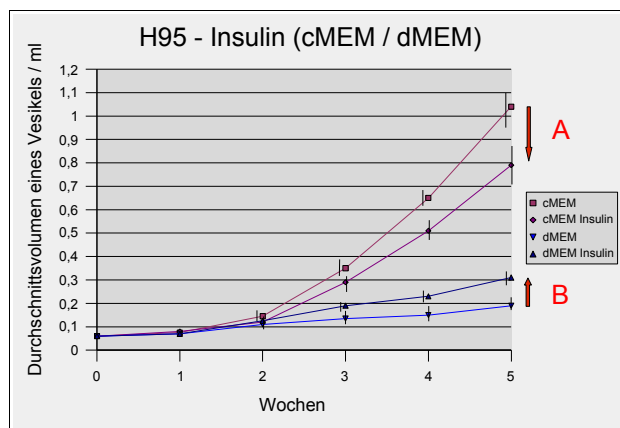


Abb. 90: Wachstum von H95-Metacestodenvesikeln in Gegenwart von humanem Insulin.

Gezeigt ist die Volumenzunahme der Vesikel in einem Beobachtungszeitraum von 5 Wochen. Den Medien dMEM und cMEM (cMEM = dMEM, 7 Tage mit wachsenden RH-Zellen konditioniert) wurde 86 nM humanes Insulin zugegeben (cMEM Insulin und dMEM Insulin) und Wachstum der Metacestodenvesikel protokolliert. Jede Kurve wurde aus 8 parallel durchgeführten Versuchsansätzen errechnet. Neben jedem Datenpunkt ist die Standardabweichung als senkrechter Strich dargestellt. Die rot markierten Pfeile veranschaulichen das geringere (A) bzw. höhere (B) erreichte durchschnittliche Endvolumen der Vesikel am Ende des Versuchs. Eingesetzt wurde jeweils 2 ml Medium (+  $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein), das 3x wöchentlich gewechselt wurde. Die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt. Das Anfangsvolumen eines Vesikels betrug  $\sim 60\mu\text{l}$  (Durchmesser  $\sim 4\text{ mm}$ ).

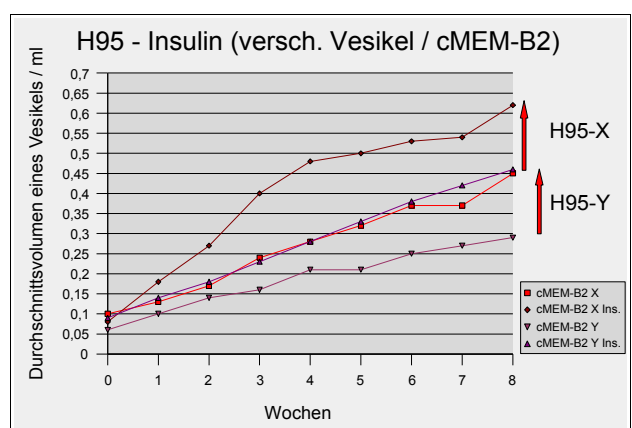


Abb. 91: Wachstum verschiedener H95-Metacestodenvesikel cMEM-B2 in Gegenwart von humanem Insulin.

Gezeigt ist die Volumenzunahme der H95-Metacestodenvesikel X (ältere Vesikel, ohne Brutkapseln, aber leicht trübes Erscheinungsbild durch mehrlagige Zellschicht) und Y (junge Metacestodenvesikel, sehr klares Erscheinungsbild) in Medium cMEM-B2, bei dem ein eingeschränktes Größenwachstum beobachtet wurde. Den Ansätzen mit Insulin wurde Insulin in einer Konzentration von 86 nM zugegeben. Die Kurven beschreiben die durchschnittlichen Volumen von 3 (Vesikel X) bzw. 6 (Vesikel Y) parallel durchgeführten Versuchsansätzen. Die roten Pfeile markieren das größere Endvolumen der Metacestodenvesikel, dass durch die Zugabe von Insulin erzielt wurde. Eingesetzt wurde jeweils 2 ml Medium (+  $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein), das 3x wöchentlich gewechselt wurde. Die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt.

### 3.12.5.2 Einfluß von BMP2 auf axenisch kultivierte Metacestodenvesikel

In unserer Arbeitsgruppe werden zur Zeit vier verschiedene TGF $\beta$ /BMP-Rezeptor-Homologe von *E. multilocularis* charakterisiert [Zavala [356], Bernthaler, Epping]. Für diese Rezeptoren konnten die zwei potentiellen Downstream-Faktoren EmSmadA und EmSmadB charakterisiert werden, die in einem heterologen System, nach Stimulation mit humanem BMP2, phosphoryliert wurden [355]. Daher war eine ausführliche Beschreibung und Bestätigung der Wachstumseffekte angebracht, die in axenisch kultivierten Metacestodenvesikeln nach Zugabe von BMP2 in ersten Vorversuchen beobachtet werden konnten. In den hier beschriebenen Experimenten wurde den Kulturen humanes BMP2 in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, da mit dieser Konzentration in den Vorversuchen sichtbare Effekte erzielt wurden.



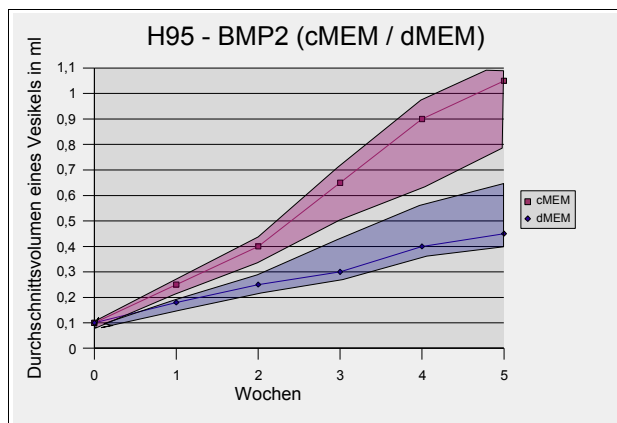


Abb. 92: Wachstum von H95-Metacestodenvesikeln in Gegenwart von humanem BMP2.

Die hier gezeigten Kurven sind aus Beobachtungen verschiedener Experimente entstanden und geben keinen speziellen Versuch wieder. Die Kurven cMEM und dMEM geben die Volumenzunahme der Vesikel im Beobachtungszeitraum wieder. Nach der Zugabe von BMP2 (10ng/ml) wurden in 7 unabhängigen Versuchen sowohl in cMEM als auch in dMEM wachstumsfördernde und wachstumshemmende Effekte beobachtet (siehe Text). In über der Hälfte aller Experimente konnte dabei eine wachstumshemmende Wirkung von BMP2 in cMEM und eine wachstumsfördernde Wirkung in dMEM beobachtet werden. Die farblich markierten Flächen geben den Volumenbereich an, den die Vesikel nach der Zugabe von BMP2 erreichten. In allen Versuchen wurde jeweils 2 ml Medium (+  $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein) eingesetzt, das 3x wöchentlich gewechselt wurde. Die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt.

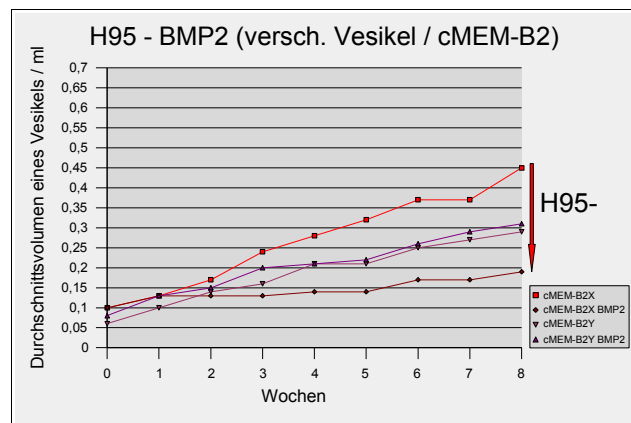


Abb. 93: Wachstum verschiedener H95-Metacestodenvesikel cMEM-B2 in Gegenwart von humanem BMP2.

Gezeigt ist die Volumenzunahme der H95-Metacestodenvesikel X (ältere Vesikel, ohne Bruttapseln, aber leicht trübes Erscheinungsbild durch mehrlagige Zellschicht) und Y (junge Metacestodenvesikel, sehr klares Erscheinungsbild) in Medium cMEM-B2, bei dem ein eingeschränktes Größenwachstum beobachtet wurde. Den Ansätzen mit BMP2 wurde BMP2 in einer Konzentration von 10ng/ml zugegeben. Die Kurven beschreiben die durchschnittlichen Volumen von 3 (Vesikel X) bzw. 6 (Vesikel Y) parallel durchgeführten Versuchsansätzen. Der rote Pfeil markiert das deutlich geringere Endvolumen der H95-X-Metacestodenvesikel, die in Gegenwart von BMP2 kultiviert wurden. Eingesetzt wurde jeweils 2 ml Medium (+  $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein), das 3x wöchentlich gewechselt wurde. Die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt.

In axenischen Wachstumsversuchen mit H95-Metacestodenvesikeln konnten im Gegensatz zu Insulin, nach der Zugabe von humanem BMP2 (10ng/ml) zu den Medien cMEM (7 Tage konditioniert mit RH-Zellen) und dMEM, auch in mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten keine vergleichbaren Ergebnisse erhalten werden. In Abbildung 92 sind die verschiedenen Beobachtungen aus 7 Einzelversuchen vereint dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl in cMEM- als auch in dMEM-Ansätzen die Zugabe von BMP2 im Vergleich zu den Kontrollen zu einer stärkeren oder schwächeren Volumenzunahme führen konnte. Während in einem Versuchsansatz in cMEM+BMP2 und dMEM+BMP2, im Vergleich zur Kontrolle, eine Volumenzunahme beobachtet wurde, zeigten die Vesikel eines anderen Versuchs unter beiden Bedingungen ein geringeres Volumen. In drei Experimenten wirkte sich BMP2 in cMEM wachstumshemmend und gleichzeitig in dMEM wachstumsfördernd aus, während in einem weiteren Versuch das genaue Gegenteil beobachtet wurde. Die Metacestodenvesikel, die in jedem der genannten Versuche parallel behandelten Ansätze, verhielten sich dabei gleich. Die Zugabe von BMP2 wirkte entweder auf alle wachstumsfördernd oder wachstumshemmend. Daraus folgt, dass das unterschiedliche Wachstum entweder auf das eingesetzte Medium oder die Metacestodenvesikel zurückzuführen ist. Im nachfolgenden Versuch konnte ein deutlicher Einfluß der eingesetzten Metacestodenvesikel auf das Wachstumsverhalten in Gegenwart von humanem BMP2 gezeigt werden. Die höhere Überlebensrate, die im Vorversuch in den dMEM-Ansätzen bei Zugabe von BMP2 beobachtet wurde, konnte nur teilweise bestätigt werden. Nur in dMEM-Versuchsansätzen, in welchen BMP2 wachstumsfördernd wirkte, wurde eine Protektion der Vesikel durch BMP2 beobachtet.

Für das Medium cMEM-B2, in dem nach 5 wöchiger Kultivierung 100% der eingesetzten Vesikel überlebten, jedoch nur eine sehr geringe Volumenzunahme ( $\sim 3x$ ) zeigten, konnte in Vergleichen mit unterschiedlich konditionierten Medien nur ein geringer wachstumssteigernder Effekt festgestellt werden. In Abbildung 93 ist die Volumenzunahme von H95-Metacestodenvesikeln, die unter Zugabe von 10g/ml BMP2 in cMEM-B2 über 8 Wochen kultiviert wurden, dargestellt. Eingesetzt wurden Vesikel, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien befanden. Während die H95-X-Vesikel durch eine mehrlagige intravesikuläre Zellschicht leicht trüb erscheinen (noch keine Brut-

kapseln) waren die H95-Y-Vesikel klar durchscheinend. Deutlich zu erkennen ist, dass sich das Wachstum der eingesetzten Metacestodenvesikel unter den gleichen Medienbedingungen (cMEM-B2 + BMP2) unterscheidet. Während im Vergleich zur cMEM-B2-Kontrolle das Volumen der H95-Y-Vesikel bei Zugabe von BMP2 an jedem Messpunkt gleich ist, führt BMP2 bei den H95-X-Vesikeln zu einer stark reduzierten Volumenzunahme. Nach achtwöchiger Kultivierung liegt das erreichte Endvolumen bei H95-X-Vesikeln, die in Gegenwart von BMP2 wuchsen, 60% unter dem der Vesikel, die nur in cMEM-B2 wuchsen. Zusätzlich bildeten sich bei H95-X-Vesikeln unter BMP2-Einfluss erste Brutkapseln, die in der Kontrolle nicht gefunden wurden. Die Überlebensrate lag in cMEM-B2, unabhängig von zugegebenem BMP2, am Ende des achtwöchigen Versuchs sowohl bei H95-X- als auch bei H95-Y-Metacestodenvesikeln bei 100%. Dieser Versuch gibt deutliche Hinweise darauf, dass der Einfluss von humanem BMP2 auf das Wachstum von Metacestodenvesikeln mit dem jeweiligen Differenzierungsgrad der eingesetzten Vesikel zusammen hängt.

### 3.12.5.3 Einfluß von EGF auf axenisch kultivierte H95-Metacestodenvesikel

In dieser Arbeit wurde das EGF-Rezeptor-Homolog EmER [294] von *E. multilocularis*, sowie mehrere Faktoren der dazugehörenden Map-Kinase-Kaskade [295, 297, 298] charakterisiert. Unter anderem konnte von V. Gelmedin gezeigt werden, dass eine Stimulation von H95-Metacestodenvesikeln mit humanem EGF zu einer Phosphorylierung von EmERK führt. In ersten Vorversuchen konnte zusätzlich ein Einfluß von humanem EGF auf axenisch kultivierte Metacestodenvesikel beobachtet werden. Daher war eine ausführlichere Beobachtung und Bestätigung dieser Wachstumseffekte angebracht. In den hier beschriebenen Experimenten wurde den Kulturen humanes EGF in einer Konzentration von 25 ng/ml eingesetzt, da mit dieser Konzentration in den Vorversuchen sichtbare Effekte erzielt wurden.

Wie in Abbildung 94 zu sehen ist, konnte die wachstumshemmende Wirkung von humanem EGF, die in dem Vorversuch beobachtet wurde, für die Ansätze in cMEM (7 Tage konditioniert mit RH-Zellen) bestätigt werden. In den dMEM-Ansätzen konnte keine wachstumsbeeinflussende Wirkung von EGF nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte auch die hohe Sterblichkeit der EGF-Ansätze des Vorversuchs nicht bestätigt werden. Die Überlebensraten lagen bei Zugabe von EGF durchgehend im Bereich der cMEM- oder dMEM-Kontrollen. Diese Ergebnisse wurden in 4 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 - 9 parallel durchgeführten Versuchsansätzen ermittelt. Die Abbildung 94 zeigt repräsentativ einen dieser Versuche.

Für das Medium cMEM-B2, in dem nach 5 wöchiger axenischer Kultivierung 100% der eingesetzten Vesikel überlebten, jedoch nur eine sehr geringe Volumenzunahme (~3x) zeigten, konnte in Vergleichen mit unterschiedlich konditionierten Medien nur ein geringer wachstumssteigernder Effekt festgestellt werden. In Abbildung 95 ist die Volumenzunahme von H95-Metacestodenvesikeln, die unter Zugabe von humanem EGF (25 ng/ml) in cMEM-B2 über 8 Wochen kultiviert wurden, dargestellt. Eingesetzt wurden Vesikel, die sich in verschiedenen Entwicklungsstadien befanden. Während die H95-X-Vesikel durch eine mehrlagige intravesikuläre Zellschicht leicht trüb erscheinen (noch keine Brutkapseln) waren die H95-Y-Vesikel klar durchscheinend. Während der Kultivierung konnte nach Zugabe von 25 ng/ml EGF sowohl bei H95-X-Vesikeln als auch bei H95-Y-Vesikeln ein leicht stärkeres Wachstum beobachtet werden. Die Überlebensrate lag in cMEM-B2, unabhängig von zugegebenem EGF, am Ende des achtwöchigen Versuchs sowohl bei H95-X- als auch bei H95-Y-Metacestodenvesikeln bei 100%.

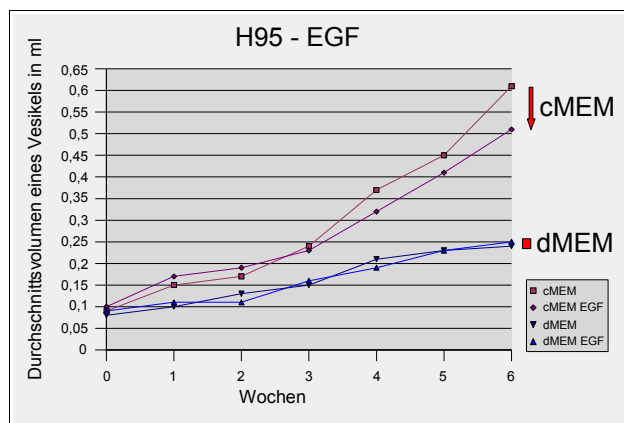


Abb. 94: Wachstum von Metacystodanvesikeln (H95) in Gegenwart von humanem EGF.

Gezeigt ist die Volumenzunahme der Vesikel in einem Beobachtungszeitraum von 6 Wochen. Den Medien dMEM und cMEM (cMEM = dMEM, 7 Tage mit wachsenden RH-Zellen konditioniert) wurde humanes EGF in einer Endkonzentration von 25 ng/ml zugegeben (cMEM-EGF und dMEM-EGF) und das Wachstum der Metacystodanvesikel protokolliert. Jede Kurve wurde aus 2 parallel durchgeführten Versuchsansätzen errechnet. Der rot markierte Pfeil veranschaulicht das geringere durchschnittliche Endvolumen der Vesikel am Ende des Versuchs, die in cMEM+EGF kultiviert wurden. Eingesetzt wurde jeweils 2 ml Medium (+  $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein), das 3x wöchentlich gewechselt wurde. Die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt. Das Anfangsvolumen eines Vesikels betrug  $\sim 90\mu\text{l}$ .

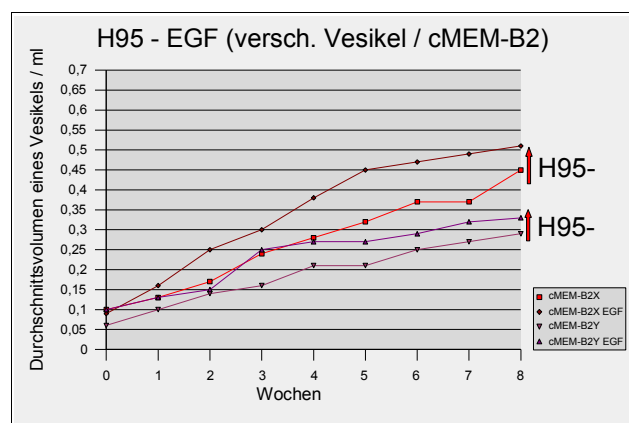


Abb. 95: Wachstum verschiedener H95-Metacystodanvesikel cMEM-B2 in Gegenwart von humanem EGF.

Gezeigt ist die Volumenzunahme der H95-Metacystodanvesikel X (ältere Vesikel, ohne Brutkapseln, aber leicht trübes Erscheinungsbild durch mehrlagige Zellschicht) und Y (junge Metacystodanvesikel, sehr klares Erscheinungsbild) in Medium cMEM-B2, bei dem ein eingeschränktes Größenwachstum beobachtet wurde. Den Ansätzen mit EGF wurde EGF in einer Konzentration von 25 ng/ml zugegeben. Die Kurven beschreiben die durchschnittlichen Volumina von 3 (Vesikel X) bzw. 6 (Vesikel Y) parallel durchgeführten Versuchsansätzen. Die roten Pfeile markieren das höhere Endvolumen der H95-X-Metacystodanvesikel, die in Gegenwart von EGF kultiviert wurden. Eingesetzt wurde jeweils 2 ml Medium (+  $\beta$ -ME, Bath, L-Cystein), das 3x wöchentlich gewechselt wurde. Die Gasphase im Gefäß wurde durch Stickstoff ersetzt.

### 3.12.6 Axenisches Kultursystem: verschiedene Echinokokken-Isolate

Neben dem Echinokokkenisolat H95 wurden 4 weitere Isolate (MP1, K188, J31, Töle) axenisch kultiviert. Die verwendeten Isolate unterscheiden sich morphologisch bei der Entnahme aus der Bauchhöhle des Labor-Zwischenwirts (*M. unguiculatus*). Sehr feste Isolate, wie K188, J31, Töle und H95-hart enthalten sehr viele Kalziumkörperchen und bilden viele Protoscolices, während in H95 wenige und in MP1 nur sehr selten Protoscolices gefunden werden. H95-hart wird selten aus Labor-Zwischenwirten isoliert, die mit H95 infiziert wurden und unterscheidet sich von H95 durch die feste Konsistenz sowie die große Menge an Kalziumkörperchen und Protoscolices (Die Entstehung dieser Variante ist noch nicht geklärt.).

In einem axenischen Kultivierungsversuch konnte innerhalb von 5 Wochen bei allen Isolatn eine Volumenzunahme der Metacystodanvesikel festgestellt werden. Auffallend ist das geringere Volumen der stark protoscolexbildenden Isolate K188, J31 und Töle und das um etwa ein Drittel geringere Volumen der H95-hart im Vergleich zu H95 (Abb. 96). In einem weiteren Versuch wurde über einen Zeitraum von 12 Wochen die Bildung von Brutkapseln (daraus entwickeln sich Protoscolices) der beschriebenen Isolate untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 97 wiedergegeben. Zu Beginn des Versuchs wurden Metacystodanvesikel eingesetzt, die frei von Brutkapseln waren. Einzelne Metacystodanvesikel der Isolate K188, J31 und H95-hart bilden zwischen der 4. und 5. Woche des Versuchs die ersten Brutkapseln. Innerhalb der folgenden 7 Wochen haben annähernd alle Vesikel Brutkapseln gebildet. Auffällig ist bei diesen drei Isolatn, dass es zu einem exponentiellen Anstieg an brutkapseltragenden Vesikeln kommt, nachdem sich zuvor bei 10% -15 % der Vesikel Brutkapseln gebildet haben. Das Isolat Töle weist im Vergleich zu den eben beschriebenen Isolatn eine zeitliche Verzögerung in der Brutkapselbildung auf, während das Isolat H95 erst gegen Ende der 12 Wochen erste Brutkapseln bildete und MP1 gar keine (Abb. 97). In verschiedenen axenischen Kultivierungsansätzen, unter anderem auch in dem in Abb. 98 dargestellten Versuch, konnte beobachtet werden, dass die durchschnittliche wöchentliche Volumenzunahme der Metacystodanvesikel abnimmt, wenn sie Brutkapseln bilden (ohne Abb.).

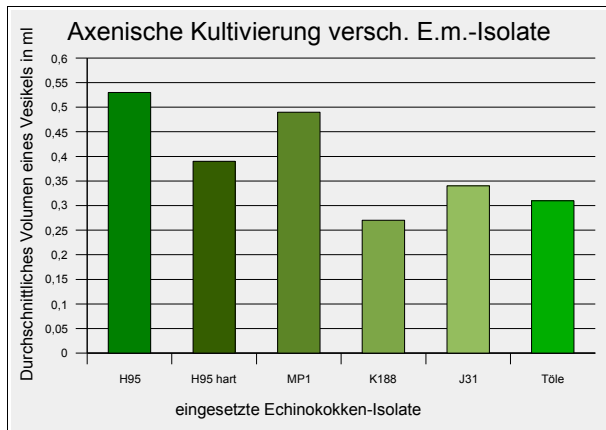


Abb. 96: Axenische Kultivierung verschiedener Echinokokken-Isolate.

Gezeigt ist die Volumenzunahme der Vesikel in einem Beobachtungszeitraum von 5 Wochen. Eingesetzt wurden je Ansatz 10 brutkapselfreie Metacestodenvesikel der Echinokokkenisolate H95, H95-hart, MP1, K188, J31 und Töle mit einem durchschnittlichen Volumen von 80  $\mu$ l (Durchmesser  $\sim$  5 mm). Das Wachstum erfolgte in 2 ml cMEM (incl. reduzierende Reagenzien), das 3x wöchentlich gewechselt wurde und unter einer Stickstoffatmosphäre.

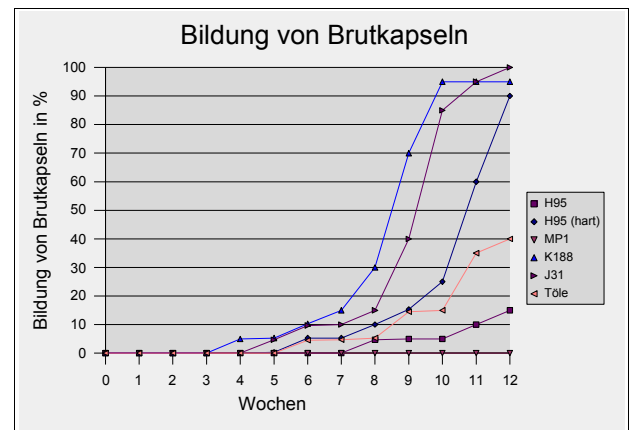


Abb. 97: Bildung von Brutkapseln in verschiedenen Echinokokkenisolate

Metacestodenvesikel der Echinokokkenisolate H95, H95-hart, MP1, K188, J31 und Töle wurden unter axenisch unter reduzierenden Bedingungen über 12 Wochen *in vitro* kultiviert und dabei die Bildung von Brutkapseln protokolliert. Die Menge an Brutkapseltragenden Metacestodenvesikeln ist in Prozent angegeben.

### 3.12.7 Axenisches Kultursystem: Beobachtung der Differenzierung

Während der axenischen Kultivierung von Metacestodenvesikeln können verschiedene Veränderungen an den Vesikeln beobachtet werden. Neben der Bildung von Ausstülpungen und dem Absterben von Vesikeln, was an einer schrumpeligen Oberfläche und Verfärbungen durch eindringendes Medium erkennbar ist, ist die wichtigste Veränderung die Bildung von Brutkapseln, die die Ausdifferenzierung von *Protoscolices* einleitet. Brutkapseln können mikroskopisch schon im Anfangsstadium leicht erkannt werden und zeichnen sich durch ein gepunktetes Erscheinungsbild der Metacestodenvesikel aus (vergl. Metacestodenvesikel, Abb. 7, Seite 25). Dabei bilden sich an der Innenseite der Metacestodenvesikel gleichmäßig verteilte granuläre Strukturen, die sich anschließend in einem mehrwöchigen Prozess zu *Protoscolices* entwickeln. Die Bildung von Brutkapseln ist abhängig vom eingesetzten Isolat und den verwendeten Wachstumsbedingungen. Unter reduzierenden axenischen Bedingungen mit Stickstoffatmosphäre sind in Isolaten, die auch in der Co-Kultivierung mit Fütterzellen frühzeitig Brutkapseln ausbilden (K188, J31, H95-hart), innerhalb von 5 Wochen Brutkapseln nachweisbar (Abb. 98). In den anderen Isolaten (H95, MP1, Töle) sind Brutkapseln erst zu einem späteren Zeitpunkt nachweisbar. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass in den axenischen Wachstumsversuchen nur Metacestodenvesikel eingesetzt werden, die frei von Brutkapseln sind. Es ist auch sinnlos, aus einem Gemisch von brutkapseltragenden und brutkapselfreien Metacestodenvesikeln die Brutkapselfreien herauszupicken. Ist schon ein Großteil der Vesikel vor Versuchsbeginn mit Brutkapseln durchsetzt, dann entwickeln diese sich natürlich auch in den im Versuch verwendeten Vesikeln sehr schnell. Die Folge ist ein nicht auswertbares Experiment, da die Vesikel ihr Wachstum während der Brutkapselbildung deutlich reduzieren.

In den durchgeführten axenischen Kultivierungsansätzen konnten für das Isolat H95 verschiedenen Bedingungen gefunden werden, die eine Bildung von Brutkapseln beschleunigen oder unterdrücken. Hervorzuheben ist dabei die Beobachtung, dass in frisch isoliertem cMEM deutlich schneller Brutkapseln gebildet werden als in cMEM, das zuvor bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Wurden Metacestodenvesikel eingesetzt, die kurz vor der Brutkapselbildung standen, bilden sich in parallel durchgeführten Ansätzen in dMEM Brutkapseln und in cMEM ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) nicht oder deutlich verspätet. Bei Wachstumsversuchen ohne reduzierende Reagenzien im Medium, konnte genau das

Gegenteil beobachtet werden. Hier entwickelten sich die Brutkapseln in cMEM (-20°C) schneller als in dMEM, die Überlebensrate war jedoch sehr gering.

### 3.12.8 Axenisches Kultursystem: Übertragung der Brutkapselbildung

Sowohl während der Co-Kultivierung mit Fütterzellen als auch in der axenischen Kultivierung von Metacestodenvesikeln ist die Bildung von Brutkapseln, aus welchen sich im Laufe der Zeit *Protoscolices* entwickeln, zu beobachten. Unklar sind die Auslöser für die Differenzierung von Brutkapseln in den Metacestodenvesikeln. Wie schon in Kapitel 3.12.6 beschrieben, bilden sich die Brutkapseln in den verschiedenen Echinokokken-Isolaten zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder gar nicht. Auffallend ist bei allen brutkapselbildenden Isolaten die exponentielle Zunahme an brutkapseltragenden Vesikeln, wenn ein geringer Prozentsatz der Metacestodenvesikel Brutkapseln gebildet hat. Dieser Befund lässt die Annahme zu, dass die Metacestodenvesikel eines Versuchsansatzes über eine Möglichkeit der Kommunikation verfügen, die eine möglichst zeitnahe Entwicklung von *Protoscolices* ermöglicht. Wenn die Kommunikation über lösliche Faktoren erfolgt, die in das Medium abgegeben werden, dann müsste eine Übertragung dieses Effektes möglich sein. In den zwei folgenden Experimenten wurde versucht, die Brutkapselbildung von brutkapselbildenden Metacestodenvesikeln auf Metacestodenvesikel zu übertragen, die noch keine Brutkapseln ausgebildet hatten.

Das Echinokokkenlysat MP1 bildet *in vivo* nur sehr wenige *Protoscolices*. Auch in der *in vitro* Co-Kultivierung in Gegenwart von Fütterzellen bleiben die Metacestodenvesikel über einen sehr langen Zeitraum ohne Brutkapseln (>12 Wochen). Vereinzelt können jedoch Brutkapseln während einer *in vitro* Kultivierung gefunden werden. In diesem Ansatz wurde versucht, die Brutkapselbildung von brutkapseltragenden H95-Metacestodenvesikeln auf brutkapselfreie MP1-Metacestodenvesikel zu übertragen. Dafür wurden kleine H95-Metacestodenvesikel mit Brutkapseln gemeinsam mit großen MP1-Metacestodenvesikeln ohne Brutkapseln in Gegenwart von Hepatocyten (RH-) kultiviert (nicht axenisch, Volumendifferenz ermöglicht die Unterscheidung). Innerhalb von 4 Wochen bildeten sich in 30% der MP1-Metacestodenvesikel Brutkapseln. Leider verschimmelte der Versuchsansatz und geriet für lange Zeit in Vergessenheit.

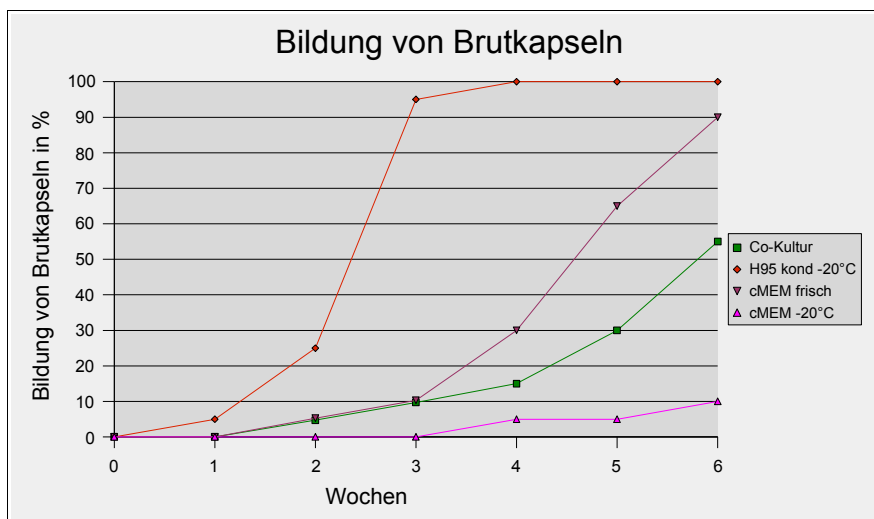


Abb. 98: Übertragung der Brutkapselbildung

H95-Metacestodenvesikel wurden axenisch unter reduzierenden Bedingungen *in vitro* kultiviert. Die Medien H95-kond. (Überstand einer H95-Co-Kultur, deren Metacestodenvesikel Brutkapseln enthielten, nach Entnahme bei -20°C eingefroren), cMEM-frisch (frisch isoliertes, über 7 Tage mit RH-Zellen konditioniertes dMEM) und cMEM -20°C (cMEM-frisch, das eingefroren wurde) wurden drei mal wöchentlich gewechselt. Im Versuchsverlauf wurden wöchentlich die brutkapseltragenden Metacestodenvesikel gezählt und der Entwicklungsstand der Brutkapseln protokolliert. Die Anzahl an brutkapseltragenden Metacestodenvesikel ist in Prozent angegeben.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, die Brutkapselbildung unter axenischen Kultivierungsbedingungen zu übertragen. Dafür wurde Medium (H95-kond -20°C) aus einer Co-Kultur entnommen, in der RH-Zellen gemeinsam mit H95-Metacestodenvesikeln kultiviert wurden und bei -20°C gelagert. Die H95-Vesikel dieser Kultur enthielten eine Vielzahl an weit entwickelten Brutkapseln. Dieses Medium (H95-kond -20°C) wurde auf axenisch wachsende H95-Metacestodenvesikel übertragen und die Brutkapselbildung über einen Zeitraum von 6 Wochen verfolgt. Zum Vergleich wurden Kulturen angesetzt, die axenisch in RH-konditioniertem Medium (cMEM-frisch und cMEM -20°C) kultiviert wurden. Wie in Abbildung 98 dargestellt, hatte die Auswahl der eingesetzten Medien einen deutlichen Einfluß auf die Bildung von Brutkapseln. Anhand der Daten können zwei relevante Aussagen getroffen werden.

In frisch hergestelltem cMEM (cMEM frisch) bildeten sich schon nach 2 Wochen erste Brutkapseln, während in aufgetautem cMEM (cMEM -20°C) erst nach 4 Wochen Brutkapseln nachgewiesen werden konnten. Daraus lässt sich schließen, dass in frischem cMEM Faktoren vorliegen, die zu Brutkapselbildung beitragen, jedoch beim Einfrieren auf -20°C zerstört werden.

Der Anstieg an brutkapseltragenden Metacestodenvesikeln verläuft, nach anfänglich gleichem Kurvenverlauf, in frisch hergestelltem cMEM (cMEM frisch) deutlich steiler als in der Co-Kultur-Kontrolle. Während am Ende des sechswöchigen Versuchs in cMEM-frisch 90% der Vesikel Brutkapseln gebildet haben, sind es in der Co-Kultur nur 55%. Der Vergleich der H95-kond Kurve mit beiden cMEM-Kurven beweist, dass die Übertragung der Brutkapselbildung möglich ist, da die ersten Brutkapseln im H95-konditionierten Medium (H95-kon) deutlich früher gebildet werden als in cMEM-frisch (1 Woche früher) und cMEM -20°C (3 Wochen früher). Außerdem enthalten in dem H95-konditionierten Medium (H95-kon) schon nach 4 Wochen alle Metacestodenvesikel Brutkapseln. Durch mikroskopische Beobachtungen konnte zudem erkannt werden, dass die Brutkapseln in den H95-kon kultivierten Metacestodenvesikeln in ihrer Entwicklung sehr viel weiter fortgeschritten waren als in allen anderen Ansätzen. Demnach muß das H95-konditionierte Medium (H95-kon) einen Stimulus enthalten, der die Bildung von Brutkapseln beschleunigt.

### 3.13 Isolation von *E. multilocularis*-Primärzellen

Ein Problem bei der Isolierung von Echinokokken-Zellen aus *in vivo* gewonnenem Parasitenmaterial ist die Gefahr kontaminierender Wirtszellen. In der Praxis geschieht genau das. Vor allem Fibroblasten und andere sich schnell teilende Zellen des Wirts überwuchern das Gefäß und die Echinokokken-Zellen wodurch eine Unterscheidung oder Auftrennung nicht mehr möglich ist. Das gleiche Problem entsteht bei dem Versuch Echinokokken-Zellen aus einer *in vitro* kultivierten Co-Kultur zu isolieren. Die Hepatocyten sind schneller. Durch die Etablierung des axenischen Kultursystems konnten diese Probleme beseitigt werden, da seither die Möglichkeit besteht, Echinokokken-Gewebe zu verwenden, das frei von kontaminierenden Zellen ist.

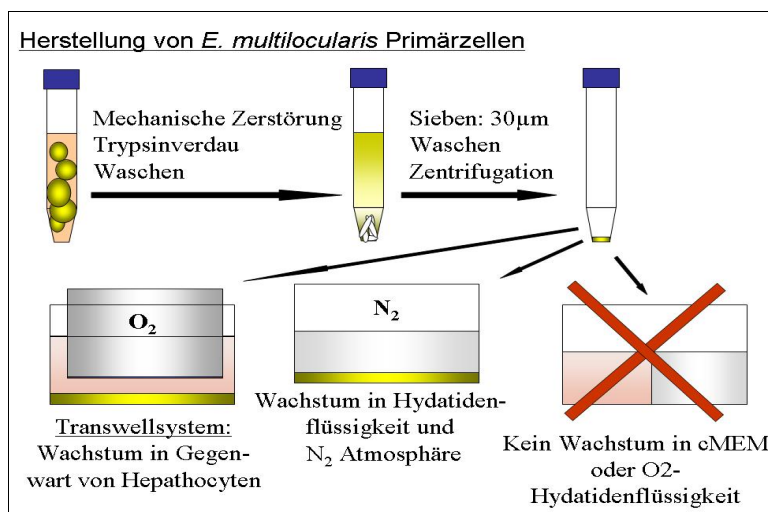


Abb. 99: Isolation und Kultivierung von Echinokokken-Primärzellen.

Gewaschene, axenisch kultivierte H95-Metacestodenvesikel werden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mechanisch zerstört und anschließend 10' bei 3500g zentrifugiert. Das Pellet wird nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS in 20 vol. 1xTrypsin/EDTA-Lösung aufgenommen und 10' bei 37°C inkubiert. Durch vorsichtiges Schütteln werden die Zellen gelöst und durch ein 30µm Sieb in ein steriles Gefäß überführt. Dort werden die Zellen 1x mit 1xPBS gewaschen und das Pellet nach einer Zentrifugation (10' bei 3500g) in 1xPBS aufgenommen. Wachstum und Differenzierung erfolgen dann entweder in einem Transwell-System, in dem die Zellen durch eine Membran getrennt, gemeinsam mit RH-Zellen wachsen oder in Hydatidenflüssigkeit aus axenisch wachsenden Metacestodenvesikeln unter einer Stickstoffatmosphäre.

In Abbildung 99 ist schematisch die Isolation und Kultivierung von Echinokokken-Primärzellen dargestellt (Vorgehensweise siehe Abbildungsverzeichnis. Zusätzlich findet sich eine ausführliche Beschreibung in Kapitel 5.12). Bisher konnten zwei Bedingungen gefunden werden, die eine Kultivierung der isolierten Echinokokken-Primärzellen über 5 - 16 Wochen erlauben. Eine Möglichkeit ist die Kultivierung unter einer Stickstoffatmosphäre in Hydatidenflüssigkeit, die aus wachsenden, axenisch kultivierten Metacestodenvesikeln gewonnen wurde. Dagegen starben die Zellen nach wenigen Tagen, wenn sie in Hydatidenflüssigkeit kultiviert wurden, die aus Metacestodenvesikeln gewonnen wurde, die in einer Co-Kultur gemeinsam mit Fütterzellen wuchsen. Die zweite Möglichkeit ist die Kultivierung der Zellen in einem TransWell-System. Darin wachsen die Echinokokken-Zellen durch eine Membran getrennt, gemeinsam mit RH-Zellen. Kein Wachstum konnte dagegen in dMEM und konditioniertem Medium (cMEM) beobachtet werden. In beiden Systemen konnte eine Vermehrung der Zellen bis hin zu einer Gewebebildung beobachtet werden. Innerhalb dieser Gewebe und an deren Rand differenzierten sich dann kleine Vesikel, die sich bisher noch nicht weiter kultivieren ließen.

In den Abbildungen 100 - 105 ist die Kultivierung von Echinokokken-Primärzellen in Hydatidenflüssigkeit aus axenisch kultivierten H95-Metacestodenvesikeln dokumentiert. Direkt nach dem Einsetzen der Zellen sind lichtmikroskopisch keine Aggregate zu erkennen (nicht gezeigt). Nach 24 Stunden sind einzelne Zellhaufen zu sehen, die vermutlich durch Aggregation entstanden sind (Abb. 100). Dafür spricht ein Videobeweis, in dem frisch isolierte Protoscolexzellen über einen Zeitraum von 12 Stunden entlang unverdauter Protoscolex-Fragmente wandern. Innerhalb der ersten Woche wuchsen die entstandenen Zellhaufen nur gering (Abb. 101 + 102). Nach 2 Wochen konnte dann jedoch eine deutliche Volumenzunahme der einzelnen Zellhaufen beobachtet werden

(Abb. 103), die auf einer Zellteilung beruhen musste, da zu Beginn der Kultivierung nur eine kleine Menge an Zellen eingesetzt wurde. Diese Zellhaufen nahmen in der folgenden Woche rasch an Größe zu und verwuchsen mit weiteren Zellhaufen zu großen gewebeartigen Gebilden (Abb. 104). Neben diesen Gebilden konnten zusätzlich am Gefäßboden nichtadhärente Zellen beobachtet werden, deren Zahl im Laufe der Kultivierung stark zunahm (Abb. 105).

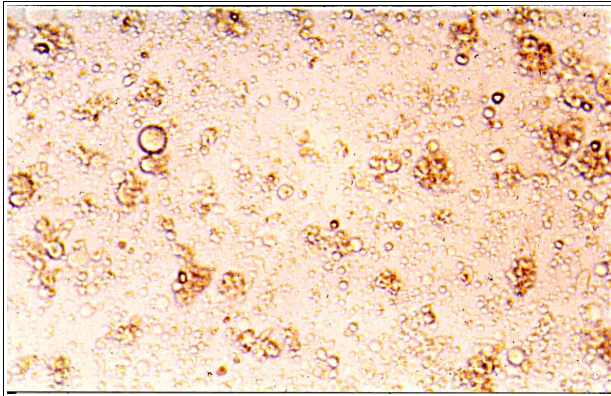


Abb. 100: *E.m.*-Primärzellen, Hydatidenflsg., 24h

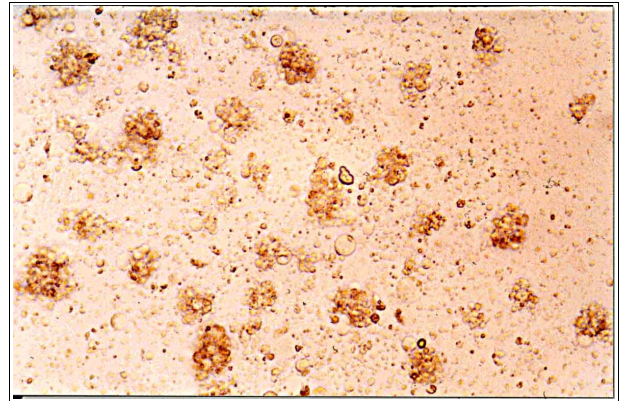


Abb. 101: *E.m.*-Primärzellen, Hydatidenflsg., 48h

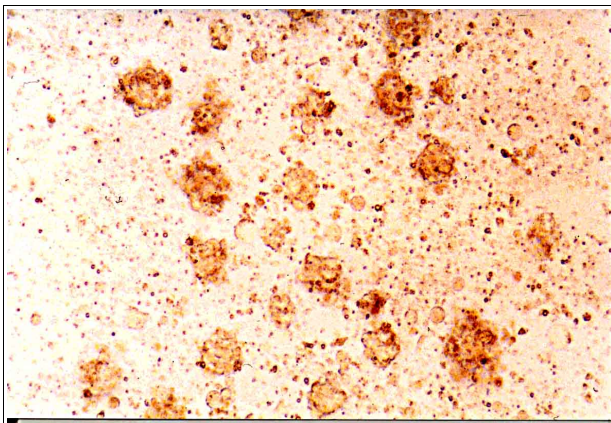


Abb. 102: *E.m.*-Primärzellen, Hydatidenflsg., 1 Woche

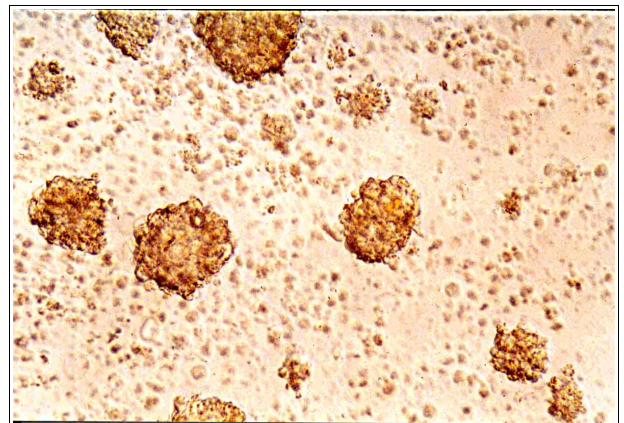


Abb. 103: *E.m.*-Primärzellen, Hydatidenflsg., 2 Wochen

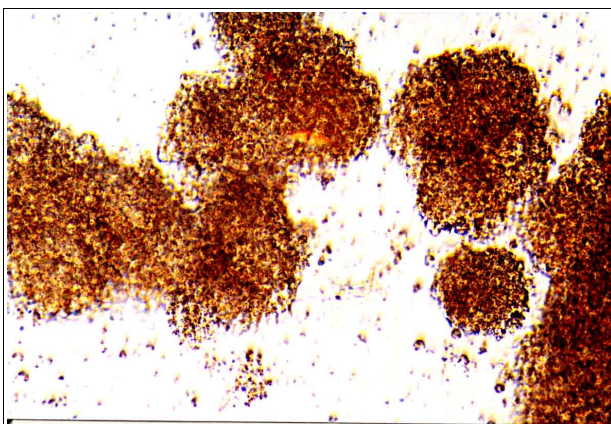
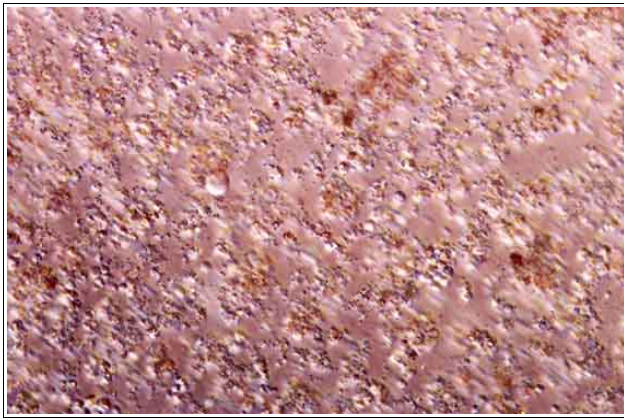
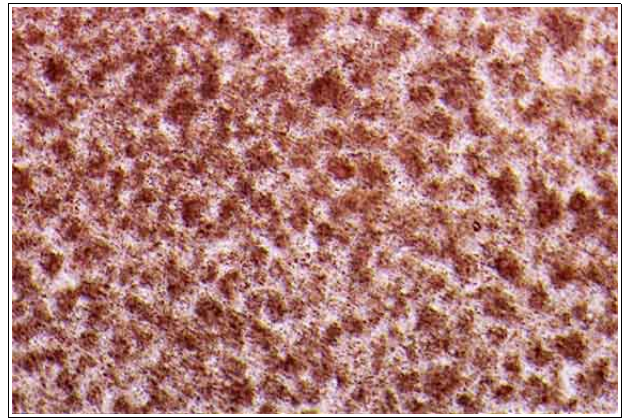
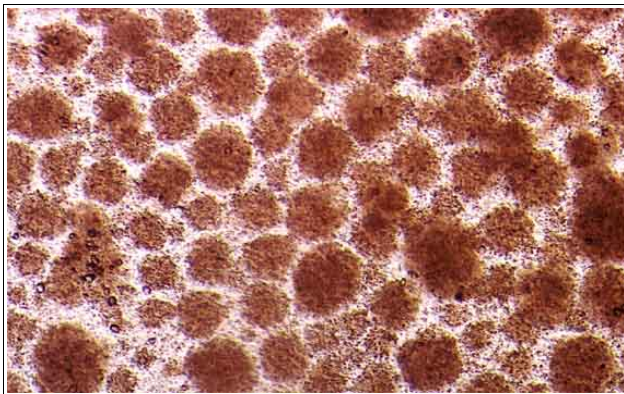
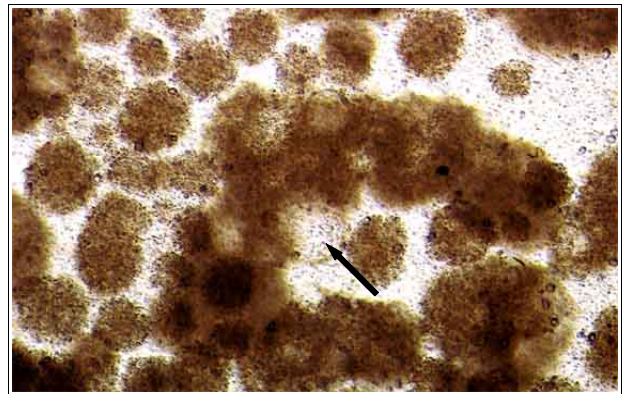
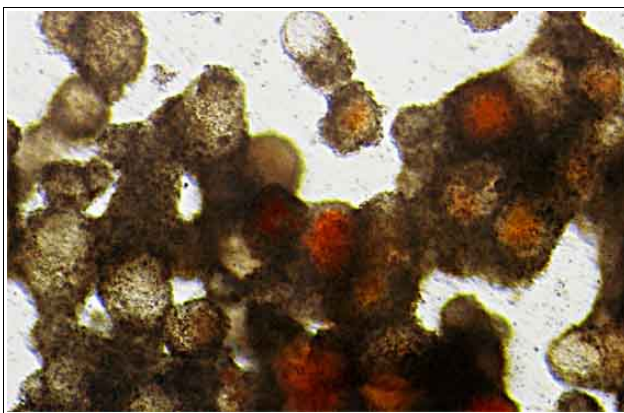
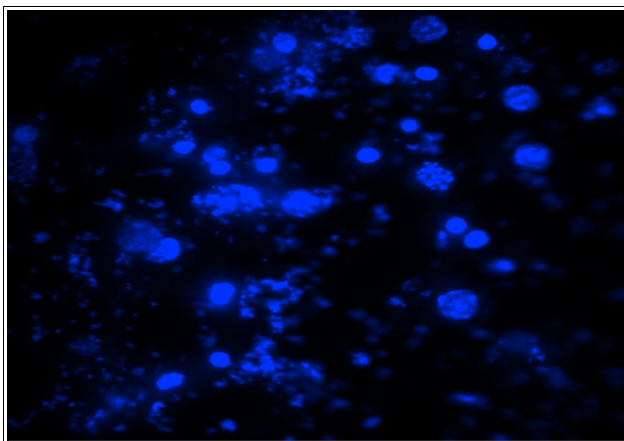


Abb. 104: *E.m.*-Primärzellen, Hydatidenflsg., 3 Wochen (Gewebebildung)



Abb. 105: *E.m.*-Primärzellen, Hydatidenflsg., 3 Wochen (Einzelzellen)



Abb. 106: *E.m.*-Primärzellen, TW-System, 24hAbb. 107: *E.m.*-Primärzellen, TW-System, 1 WocheAbb. 108: *E.m.*-Primärzellen, TW-System, 2 WochenAbb. 109: *E.m.*-Primärzellen, TW-System, 3 WochenAbb. 110: *E.m.*-Primärzellen, TW-System, 5 WochenAbb. 111: *E.m.*-Primärzellen, TW-System, 24h, DAPIAbb. 112: *E.m.*-Primärzellen, TW-System, 5 Wochen

In den Abbildungen 100 - 105 ist eine Kultivierung von H95-Primärzellen über einen Zeitraum von 3 Wochen dokumentiert. Die Zellen wurden in Hydatidenflüssigkeit, die aus axenisch kultivierten Metacestodenvesikeln gewonnen wurde, kultiviert. Die Abbildungen 106 - 112 dokumentieren eine Kultivierung von H95-Primärzellen in einem Trans-Well-System (TW), in dem sie gemeinsam mit RH-Zellen über einen Zeitraum von 5 Wochen wuchsen. Eine ausführliche Beschreibung beider Versuchsansätze findet sich im Text. Abbildung 111 zeigt die DAPI-Färbung der Zellkerne einer 24h-TW-Primärzellkultur.

Die Abbildungen 106 - 111 dokumentieren die Kultivierung von Echinokokken-Primärzellen in einem TransWell-System. Das TransWell-System erlaubt eine gemeinsame Kultivierung der Echinokokken-Primärzellen mit Fütterzellen (RH-Zellen). Dafür wurden die Echinokokken-Zellen in die Zellkulturschale und die Fütterzellen in einen passenden Einsatz gegeben, dessen Boden aus einer Membran mit 3µm großen Löchern besteht. Dadurch konnte ein Austausch löslicher Stoffe bei gleichzeitiger räumlicher Trennung der Zellen stattfinden. Die erste Aufnahme (Abb. 106) wurde nach 24 Stunden gemacht und zeigt die Echinokokkenzellen lose am Boden verteilt. Von diesen Zellen wurde ein Aliquot abgenommen und deren Zellkerne über eine DAPI-Färbung sichtbar gemacht (Abb. 111). Nach einer Woche waren deutliche Zellanhäufungen zu erkennen, die durch Zellneubildung entstanden sein müssen, da ihr Volumen das der eingesetzten Zellen weit übertraf (Abb. 107). Innerhalb einer weiteren Woche entwickelten sich abgegrenzte globuläre Strukturen (Abb. 108), die sich dann zu gewebeartigen Gebilden zusammenschlossen und stark an Volumen zunahm. Innerhalb dieser Gebilde und an deren Rändern differenzierten sich erste kleine Vesikel (Abb. 109, mit Pfeil markiert). Nach insgesamt 5 wöchiger Kultivierung war das gesamte Gewebe von Vesikeln durchsetzt (Abb. 110). Dabei konnten zwei verschiedene Vesikelarten unterschieden werden. Zum einen Vesikel, die innerhalb des Gewebes lagen, von einer Zellschicht umgeben waren und den roten Farbstoff des Mediums aufgenommen hatten. Diese erschienen je nach pH-Wert rot, orange oder gelb und glichen in ihrem Erscheinungsbild Brutkapseln. Dafür sprechen auch intravesikuläre granuläre Strukturen, die nach weiteren 4 Wochen Kultivierung in diesen Vesikeln vorlagen. Sichtbar wurden die Vesikel und deren Inhalt, da die sie umschließenden Zellen innerhalb der 4 Wochen starben und sich von den Vesikeln lösten. Auf der anderen Seite konnten Vesikel gefunden werden, die kleinen Metacestodenvesikeln glichen. Diese Vesikel lagen außerhalb oder am Rand der Gewebe, waren farblos und von keiner Zellschicht umgeben. In Abbildung 112 ist eines dieser Vesikel gezeigt. Für die Annahme, dass es sich dabei um kleine Metacestodenvesikel handelt, spricht die Tatsache, dass einige dieser Vesikel frei im Medium schwammen und genau so aussahen wie kleine Metacestodenvesikel einer Co-Kultur. Der Versuch, diese kleinen Vesikel über einen längeren Zeitraum zu kultivieren gelang nicht. Der Grund dafür waren mit sehr großer Wahrscheinlichkeit wachstumsunterdrückende Faktoren, die von den anwesenden Echinokokken-Zellen ausgeschleust wurden. Dafür spricht ein TransWell-Experiment, in dem Hepatozyten (RH<sup>+</sup>) gemeinsam mit frisch passiertem Echinokokkenmaterial in einen TransWell-Einsatz gegeben wurden und entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit der vesikeltragenden Primärzellgewebe kultiviert wurden. Dabei konnte eine Entwicklung von Metacestodenvesikeln, wie sie für Co-Kultursysteme beschrieben ist, nur in den Ansätzen beobachtet werden, die ohne vesikeltragendes Primärzellgewebe kultiviert wurden.

Nach dem Ansetzen der primären Echinokokken-Zellkulturen können nach wenigen Tagen bis Wochen verschiedene Zellen und Zellverbände beobachtet werden, die sich zum Beispiel in Größe, Struktur und Schwimmvermögen unterscheiden. Für eine bessere Charakterisierung der primären Echinokokken-Zellen, wurden daher verschiedene elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht, die zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nur einen kleinen Teil der beobachteten Zellarten umfassen. Die Abbildung 113 zeigt eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (TEM) von schwimmenden primären Echinokokken-Zellen, die zwei Wochen in Hydatidenflüssigkeit aus axenisch kultivierten Metacestodenvesikeln unter einer Stickstoffatmosphäre kultiviert wurden. Die Zellen wurden aus dem Überstand der Kultur, die lichtmikroskopisch in Abbildung 103 zu sehen ist, abzentrifugiert und für die TEM-Aufnahmen vorbereitet. An der Peripherie der Abbildung 113 sind einige Zellfragmente von offensichtlich toten Zellen zu erkennen und im linken unteren Teil des Bildes befindet sich eine kleine, ihrem Erscheinungsbild nach apoptotische Zelle mit mehreren Ausläufern. Zentral gruppieren sich 5 kleine Zellen, in welchen der Zellkern und die Mitochondrien deutlich zu sehen sind. Die Mitochondrien sind auffällig vergrößert, was eine Folge des Wachstums unter reduzierenden und damit sauerstoffarmen Bedingungen sein kann. Drei der Zellen zeigen eine Auflösung des Nucleolus, was auf eine beginnende Apoptose dieser Zellen hin

deutet. Auffallend ist, dass die beobachteten Echinokokken-Zellen mit einem Durchmesser von etwa  $6\mu\text{m}$  im Vergleich zu Zellen anderer Metazoa (Durchmesser  $\sim 100\mu\text{m}$ ) sehr klein sind.

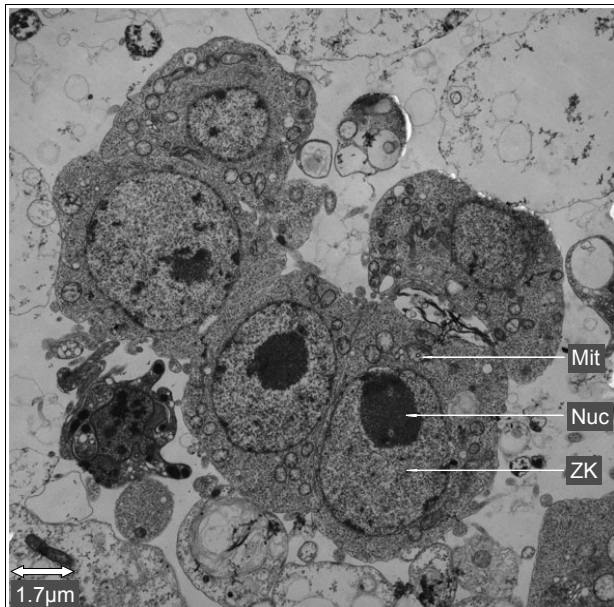


Abb. 113: *E.m.*-Primärzellen (Germinalzellen) nach 2 wöchiger Kultivierung (TEM)

ZK: Zellkern, Nuc: Nucleolus, Mit: Mitochondrium

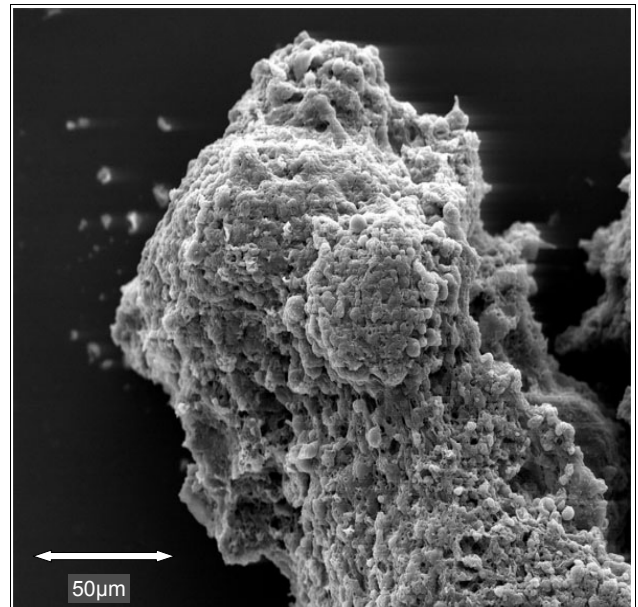


Abb. 114: *E.m.*-Primärzell-Gewebe nach 5 wöchiger Kultivierung (REM, 500x)

(Beschleunigungsspannung: 15 kV, Arbeitsabstand: 8mm, Vergrößerung: 500x)

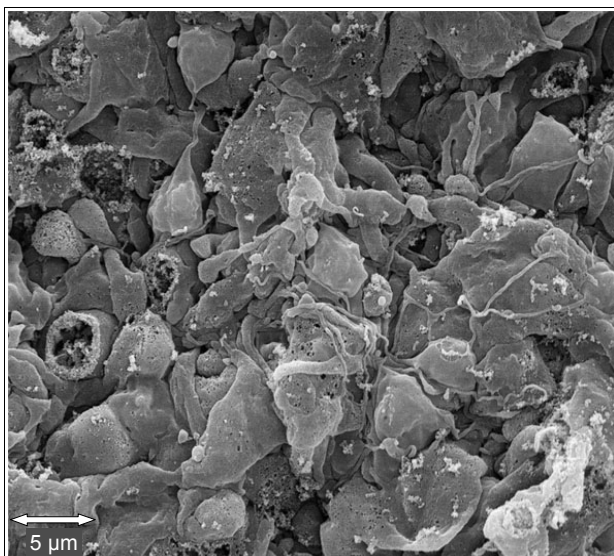


Abb. 115: *E.m.*-Metacestodenvesikel aus Co-Kultur, Germinalschicht (REM, 3000x)

(Beschleunigungsspannung: 15 kV, Arbeitsabstand: 6mm, Vergrößerung: 500x)

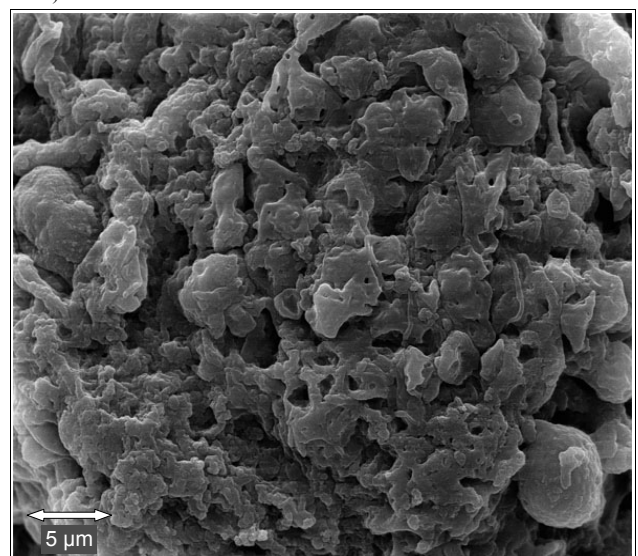


Abb. 116: *E.m.*-Primärzell-Gewebe nach 5 wöchiger Kultivierung (REM, 3000x)

(Beschleunigungsspannung: 15 kV, Arbeitsabstand: 8mm, Vergrößerung: 3000x)

In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen werden Abbildungen von Objektoberflächen dargestellt. Da mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) eine hohe Schärfentiefe erreicht werden kann, eignet sich das REM gut zur Darstellung dreidimensionaler Strukturen, wie zum Beispiel Zellverbänden. Die folgenden REM-Aufnahmen zeigen die Innenansicht eines der Metacestodenvesikel, aus welchen primäre Echinokokkenzellen isoliert wurden und eine Gewebestruktur, die aus diesen Primärzellen kultiviert wurde. In Abbildung 114 ist diese Gewebestruktur

in 500 facher Vergrößerung gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die gesamte Struktur aus Zellen gebildet wird und bei genauer Betrachtung lässt sich im oberen Bereich eine etwa 150 µm große, von Zellen umgebene Blasenstruktur erahnen, die einem der Vesikel entsprechen könnte, die lichtmikroskopisch in Abb. 110 beobachtet wurden. In Abbildung 115 ist die Innenansicht eines Metacestodenvesikels in 3000 facher Vergrößerung gezeigt. Die erkennbaren Zellen liegen relativ unstrukturiert vor und haben eine Größe von bis zu 15 µm. Auch die Zellen des Primärzell-Gewebes, das in Abbildung 116 in 3000 facher Vergrößerung gezeigt ist, liegen unstrukturiert vor, sind aber mit einer Größe von ~5 µm durchweg kleiner. Die Größe entspricht den Primärzellen, die transmissionselektronenmikroskopisch in Abb. 113 gezeigt sind.

### 3.14 Genetische Manipulation von *E. multilocularis*

Für weitreichende molekularbiologische und biochemische Charakterisierungen eines Organismus ist dessen genetische Manipulierbarkeit essentiell. Ist das nicht möglich, muß wie für *E. multilocularis* auf heterologe Systeme ausgewichen werden, die die tatsächliche *in vivo* Situation nicht widerspiegeln und zusätzliche Probleme mit sich bringen. Ein Beispiel ist die Expression des Echinokokken-Insulinrezeptors EmIR in humanen Hek-Zellen, in welchen er nur in geringem Maß funktionell aktiv prozessiert wird [C. Konrad, persönliche Mitteilung]. Neben der Expression von Echinokokkenproteinen bieten sich genetische Manipulationsmethoden auch an, um mitogene Faktoren in Echinokokkenzellen zu schleusen und so eine stabile Zelllinie zu etablieren oder einen transgenen Organismus herzustellen. Daher ist die Entwicklung entsprechender Methoden und Techniken für *E. multilocularis* von entscheidendem Interesse.

Die Erbinformationen können transient oder stabil in Zellen oder einen Organismus gebracht werden, je nach dem ob sie ins Genom integriert werden oder im Laufe der Zeit verloren gehen. Dafür werden verschiedene Methoden eingesetzt, um das genetische Material (DNA, RNA) in die Zielzellen zu schleusen, wie z.B. Soaking (natürliche Aufnahme), Elektroporation, Gengun, chemische Transfektionsmethoden, Viren und Bakterien.

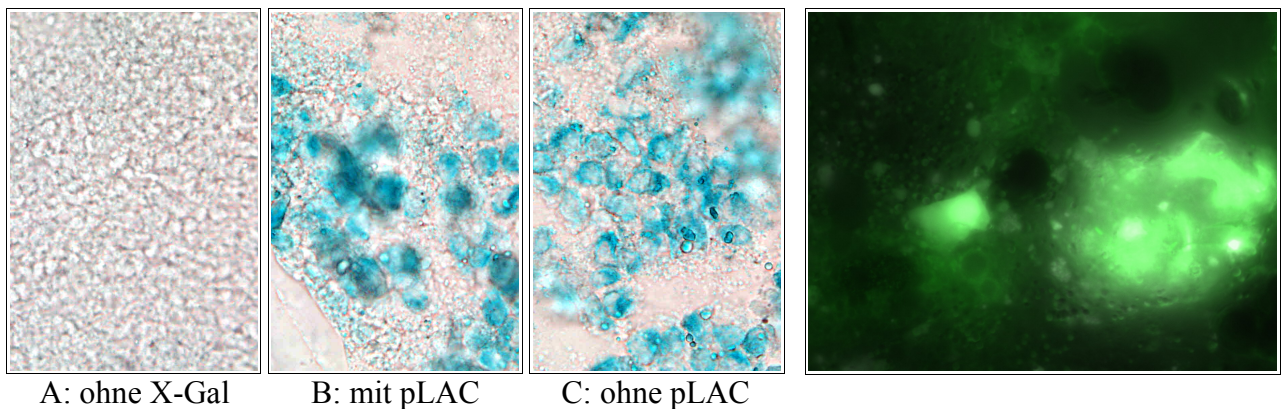


Abb. 117: Transfektionsversuch mit einem LacZ-Reporterkonstrukt

Gezeigt ist der  $\beta$ -Galactosidase-Assay nach einer Transfektion mechanisch zerstörter Metacystodanvesikel mit dem Reporterkonstrukt pLAC (A,B) oder ohne pLAC (C).

Abb. 118: GFP-Autofluoreszenz in Echinokokken-Metacystodanvesikeln

Gezeigt ist die Innenseite eines mechanisch zerstörten Metacystodanvesikels, aufgenommen mit einem GFP-spezifischen Filter. Vergleichbare Fluoreszenzintensitäten wurden auch für CFP und YFP beobachtet.

In einem ersten Versuch, ein Protein rekombinant in *E. multilocularis* zu exprimieren, wurde versucht, das Reporterkonstrukt pLAC (LacZ unter der Kontrolle des Aktin1-Promoters von *E. multilocularis*) über Elektroporation oder eine Calcium-Chlorid-Transfektion in mechanisch zerstörte Metacystodanvesikel zu schleusen. Abb. 121 zeigt die Ergebnisse des anschließenden LacZ-Assays mit X-Gal. Im Vergleich zur Kontrolle ohne X-Gal (A), konnte eine erfolgsversprechende Färbung potentiell transgener Zellen in den Vesikeln festgestellt werden, die das Reporter-Konstrukt enthalten sollten (B). Eine vergleichbare Anfärbung wurde jedoch auch in der Kontrolle gefunden (C), die das pLAC-Reporterkonstrukt sicher nicht enthielt. Daher wurde ein Western-Blot mit LacZ-spezifischen Antikörpern durchgeführt, der keinen Nachweis einer Expression des Reportergens in *E. multilocularis* erbrachte (nicht gezeigt).

Da der Nachweis von LacZ über X-Gal aufgrund einer eigenen  $\beta$ -Galactosidaseaktivität von *E. multilocularis* nicht möglich war wurde mit CFP (Cyan Fluorescent Protein) ein neues und über Fluoreszenzmikroskopie auch in lebenden Zellen leicht zu detektierendes, Reportergen gewählt. Da das LacZ des Reporterkonstrukts pLAC auch in Hek-Zellen nicht exprimiert wurde, obwohl ähnliche Aktinpromotoren in Säugersystemen funktionieren, wurde das CFP mit den Promotern der Echinokokkengene *P-act1*, *P-act2*, *P-tromo* und *P-em10* sowie dem Promoter von *P-hsp70* des

Menschen fusioniert, in den Vektor pMCS (pCR2.1 + neue MCS) kloniert und über Calcium-Chlorid in Hek-Zellen transfiziert. Über einen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis konnte CFP in Hek-Zellen für das Konstrukt pMCS-*em10* nachgewiesen werden. In Abb. 123 ist der anschließend durchgeführte Western-Blot gezeigt, in dem deutlich zu erkennen ist, dass eine CFP-Expression über alle 5 Promotoren stattfand, wobei die Expression unter Kontrolle des *em10*-Promoters am stärksten ausfiel. Daher wurde das Konstrukt pMCS-*em10* für die folgenden Transfektionsversuche mit *E. multilocularis* ausgewählt. In verschiedenen Experimenten wurde dann über chemische Transfektionsmethoden mit den Produkten Transfectin (Biorad), DAC 30 (Eurogentec), MAX 1, 2, 3, 4 (Eurogentec), Effecten und Superfect (Qiagen) sowie D1 und D2 (NEB) versucht, mechanisch zerstörte Metacestodenvesikel zu transfizieren. Da *E. multilocularis* auch eine sehr starke Autofluoreszenz in allen gängigen Wellenbereichen zeigte (incl. CFP, GFP und YFP, Abb. 122) war an den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis einer erfolgreichen Transfektion nicht mehr zu denken. Daher wurde das CFP auch hier über einen Western-Blot nachgewiesen. In Abbildung 21 ist die weltweit erste rekombinante Expression eines Proteins (CFP) in *E. multilocularis* zu sehen und damit der Nachweis einer genetischen Manipulation des Parasiten erbracht. Für diesen Western-Blot musste eine sehr große Menge Gesamtprotein eingesetzt werden, da die Transfektionseffizienz oder die Expression von CFP sehr gering war. Neben den gezeigten Transfektionen, die mit D1 und D2 von NEB durchgeführt wurden, gelang eine erfolgreiche Transfektion auch mit Transfectin (Biorad) und MAX 2, 3 (Eurogentec), jedoch mit geringerer Effizienz. In einem bisher noch nicht reproduzierten Experiment konnten mit dem D1-Transfektionsreagenz auch 2 Wochen alte Primärzellen von *E. multilocularis* mit pMCS-*em10* transfiziert und CFP über einen Western-Blot nachgewiesen werden (ohne Abb).

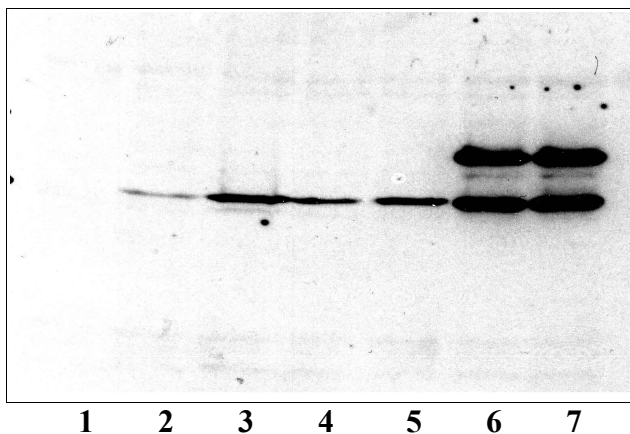


Abb. 119: Western-Blot-Analyse nach Expression von CFP über verschiedene CFP-Reporterkonstrukte in Hek-Zellen.

Gezeigt ist die CFP-Expression der Reporterkonstrukte pMCS-*act1* (Spur 2), pMCS-*act2* (Spur 3), pMCS-*tromo* (Spur 4), pMCS-*hsp70* (Spur 5) und pMCS-*em10* (Spur 6+7) sowie der Kontrolle (Spur 1) in Hek-Zellen. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde das Konstrukt pMCS-*em10* in den folgenden Transfektionsexperimenten für *E. multilocularis* eingesetzt.

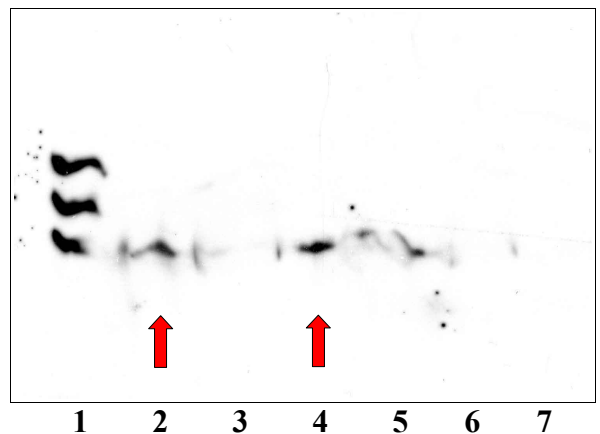


Abb. 120: Transfektion von *E. multilocularis* mit dem CFP-Reporterkonstrukt pMCS-*em10*.

Gezeigt ist die CFP-Expression des Reporterkonstrukts pMCS-*em10* in Hek-Zellen (Spur 1) sowie in mechanisch zerstörten Metacestodenvesikeln (Spur 2-5). Die Kontrollen ohne dem Reporterkonstrukt sind in den Spuren 6 und 7 aufgetragen. Nach der Transfektion über die Transfektionsreagenzien D1 (Spuren 1, 2, 4, 6) und D2 (Spuren 3, 5, 7) wurden die Metacestodenvesikel für 5 Tage entweder in Hydatidenflüssigkeit (Spuren 2, 3, 6) oder in einem Transwell-System gemeinsam mit Hepathozyten (Spuren 4, 5, 7) kultiviert, bevor sie für den Western-Blot eingesetzt wurden. Die roten Pfeile markieren die erfolgreichen Transfektionen.

Für eine stabile Integration der genetischen Information in das Genom sind eine Reihe von retroviralen Systemen beschrieben, mit deren Hilfe z.B. Schneckenzellen genetisch manipuliert werden können. Da Schnecken mit dem Fuchsbandwurm relativ nah verwandt sind, wurde ein entsprechendes System auch zur Manipulation von *E. multilocularis* eingesetzt. Dafür wurde *cfp* unter der Kontrolle des *em10*-Promoters in den Vektor pGJ-3 kloniert. In Kooperation mit A. Rethwilm

(Universität Würzburg) wurden dann Virenpartikel hergestellt, die für erste Infektionsversuche mit Hek-Zellen und mechanisch zerstörten Metacestodenvesikeln eingesetzt wurden. Die Infektionseffizienz war sehr gering, daher liegen zum momentanen Zeitpunkt noch keine Daten einer erfolgreichen Infektion von *E. multilocularis* über die eingesetzten Retroviren vor.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, *E. multilocularis* mit *Listeria monocytogenes*, einem fakultativ intrazellulären Bakterium, zu infizieren. Die verwendeten Listerien enthielten ein GFP-Reporterkonstrukt mit einem Promoter der erst aktiviert wird, wenn die Listerien eine Zelle infiziert haben. Dadurch exprimieren nur die Listerien GFP, die erfolgreich eine Zelle infizieren konnten. Zusätzlich wurden extrazelluläre Listerien mit Erythromycin eliminiert. In Abbildung 20 ist das Ergebnis eines erfolgreichen Infektionsversuchs gezeigt.

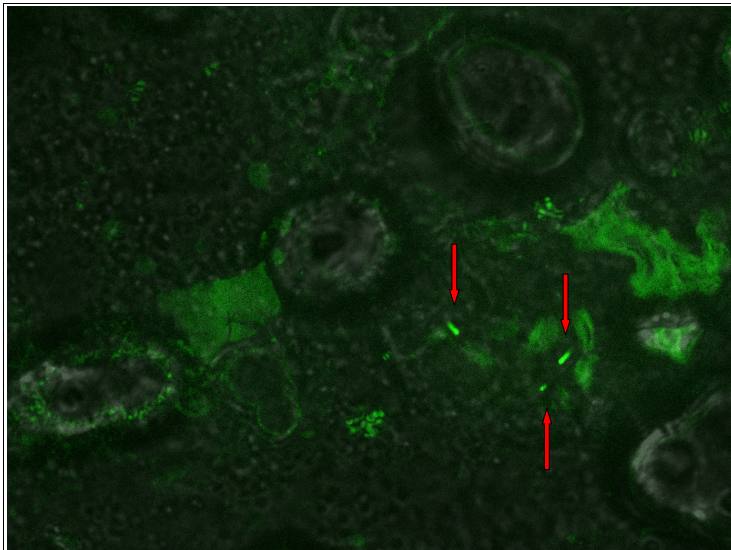


Abb. 121: Infektion von *E. multilocularis* mit *Listeria monocytogenes*

Gezeigt ist die Innenseite eines mechanisch zerstörten Metacestodenvesikels, das mit *L. monocytogenes* infiziert wurde. Die verwendeten Listerien enthielten ein GFP-Reporterkonstrukt, über das GFP exprimiert wird, wenn die Listerien intrazellulär vorliegen. Die roten Pfeile markieren Listerien, die Echinokokkenzellen infiziert haben und GFP exprimieren. Da sie GFP in sehr großen Mengen exprimierten, konnten sie trotz der starken Autofluoreszenz der Echinokokkenzellen fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden.

---

## 4 Diskussion

---

### 4.1 MAP-Kinase-Kaskade

In Säugetieren steht die ERK-Kaskade, ein Modul aus den drei Proteinen Raf, MEK und ERK, an zentraler Stelle bei der Übertragung von proliferativen, entwicklungsspezifischen und oncogenen Signalen (z.B. EGF), die von membrandurchspannenden Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie dem EGF-Rezeptor, erkannt und dann über die ERK-Kaskade in den Zellkern geleitet werden, wo sie zur Expression verschiedener Zielgene führen. Die Aktivierung der ERK-Kaskade wird durch eine Interaktion kleiner GTPasen der Ras-Familie mit Raf eingeleitet. Das aktivierte Raf gibt das Signal über MEK an ERK weiter, das dann mit Zielproteinen im Zellkern oder im Cytoplasma interagiert [334, 307]. Sowohl die Rezeptor-Tyrosinkinasen als auch die Faktoren der ERK-Kaskade sind im Tierreich konserviert und spielen nicht nur bei Säugetieren eine entscheidende Rolle in Entwicklungsprozessen sondern auch in so unterschiedliche Tieren wie dem Seeigel [267], *Drosophila melanogaster* [256] und dem Fadenwurm *C. elegans* [214]. Durch die hohe Konservierung dieser Faktoren in Modellorganismen unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft, kann davon ausgegangen werden, dass sie auch in parasitären Helminthen vorhanden sind. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die einzelnen Faktoren der verschiedenen Spezies in vielen Fällen untereinander kreuzreagieren können und Interaktionen dieser Art eine entscheidende Rolle in den Mechanismen der Wirt-Parasit-Kommunikation spielen könnten. So kann zum Beispiel der EGF-Rezeptor von *Schistosoma mansoni* durch humanes EGF stimuliert werden [323]. Da im Rahmen dieser Arbeit, mit dem EGF-Rezeptor-Ortholog EmER [183, 295], eine Rezeptor-Tyrosinkinase von *E. multilocularis* beschrieben werden konnte, die ihr Signal mit sehr großer Wahrscheinlichkeit über eine intrazelluläre ERK-Kaskade weiter leitet, bestand ein großes Interesse an der Aufklärung der beteiligten Signalkomponenten.

Neben der molekularbiologischen Charakterisierung von EmER, die gemeinsam mit A. Kroner [183, 295] durchgeführt wurde, konnten in dieser Arbeit für *E. multilocularis* die folgenden, in Säugersystemen ortholog vorhandenen Faktoren einer ERK-Kaskade identifiziert und charakterisiert werden: vier GTPasen der Ras-Familie (EmRas [297], EmRap1, EmRap2, EmRal [294]), eine Serin/Threonin-Kinase der Raf-Familie (EmRaf [297]), eine Threonin/Tyrosin-Kinase der MKK-Familie (EmMKK), eine Serin/Threonin-Kinase der ERK-Familie (EmERK [298]) und ein 14-3-3-Protein (Em14-3-3.2), das als gerüstbildender Faktor mit der ERK-Kaskade in Verbindung steht. Alle Faktoren zeigten hohe Homologien zu orthologen Faktoren anderer Organismen. Zusätzlich waren alle funktionell relevanten Aminosäurereste an entsprechenden Stellen konserviert vorhanden. Weiterhin konnten alle Faktoren in den Larvenstadien Metacestode und Protoscolex von *E. multilocularis* nachgewiesen werden. Mit der Charakterisierung dieser Faktoren konnte, mit Ausnahme von Em14-3-3.2 [230], der erste Nachweis konservierter Faktoren einer ERK-Kaskade für einen Cestoden erbracht werden.

Eine interessante Frage war, ob die isolierten Faktoren Teil einer ERK-Kaskade sind. In Yeast-Two-Hybrid-Interaktionsstudien konnte das für EmRaf, EmMKK und die drei GTPasen EmRas, EmRap1 und EmRap2 gezeigt werden. Interessanterweise interagierten EmMKK und EmERK nicht miteinander. Ein Grund dafür könnte eine Auftrennung des Signalwegs downstream von EmRaf sein. Da EmMKK die größten Homologien zu humanen MKK-Faktoren besitzt, die mit p38-MAP-Kinasen interagieren [91], könnte EmMKK Teil eines p38-MAP-Kinase-Signalwegs sein. Auf der anderen Seite konnte wie bei anderen Invertebraten (*C. elegans*, [214, 22]), für *E. multilocularis* nur ein Raf- und ein ERK-Homolog nachgewiesen werden und beide Faktoren zeigten so hohe Homologien zu vergleichbaren Faktoren anderer Organismen, dass sie mit sehr großer Wahrscheinlichkeit einem gemeinsamen Signalweg angehören. Durch den Wegfall von EmMKK entsteht eine Lücke im Signalweg zwischen EmRaf und EmERK, die jedoch durch die erfolgreiche



Isolation eines weiteren MKK-Faktors aus *E. multilocularis*, der sehr große Homologien zu humanem MEK1 aufweist [V. Gelmedin, persönliche Mitteilung], in Zukunft geschlossen werden kann. Da für *E. multilocularis* auch eine p-38-Map-Kinase isoliert wurde [R. Caballero, persönliche Mitteilung], könnte in diesem Fall über weitere Experimente ein Zusammenhang zwischen EmMKK und Em-p38-MAPK hergestellt werden.

#### 4.1.1 EmER

**EmER:** Aktiviert wird die ERK-Kaskade in Säugern unter anderem nach der Bindung des Zytokins EGF an einen EGF-Rezeptor [157]. Von Brehm et al. [47] konnte auch für *E. multilocularis* ein EGF-ähnlicher Faktor (*egfd*) beschrieben werden, dessen Expression in Metacestodenvesikeln, die in Gegenwart von Hepatocyten kultiviert wurden, signifikant anstieg. Da in dieser Arbeit zusätzlich deutliche Effekte von humanem EGF auf das Wachstum von axenisch kultivierten Metacestodenvesikeln und auf die Phosphorylierung von EmERK beobachtet werden konnten, scheinen EGF-Signal-Mechanismen bei *E. multilocularis* eine entscheidende Rolle während des Wachstums und der Entwicklung sowie bei der Wirt-Parasit-Interaktion zu spielen. Für die Detektion der EGF-Signale (EGFD + EGF) könnte das in dieser Arbeit charakterisierte EGF-Rezeptor-homolog EmER von *E. multilocularis* in Frage kommen. Dafür spricht, dass EmER mit größter Wahrscheinlichkeit das einzige EGF-Rezeptor-Homolog aus *E. multilocularis* ist. Zudem konnte auf RNA-Ebene gezeigt werden, dass *emer* und *egfd* in beiden Larvenstadien co-exprimiert werden. Die stadienspezifisch deutlich stärkere Expression im Protoscolex spricht dabei für eine besondere Aufgabe von EmER während der Entwicklung des Protoscolex. Zudem besitzt EmER vor allem innerhalb der Ligandenbindungsdomäne große Homologien zu dem EGF-Rezeptor-Homolog SER von *Schistosoma mansoni*, für das von Vicogne et al. [323] gezeigt werden konnte, dass es mit humanem EGF interagieren kann und diese Interaktion zur Aktivierung intrazellulärer Signalsysteme führt. Da auch Schistosomen mit SER nur ein EGF-Rezeptor-Homolog exprimieren [323] und humanes EGF bei *E. multilocularis* zur Phosphorylierung der intrazellulär lokalisierten MAP-Kinase EmERK führt, kann mit sehr großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass *E. multilocularis* EGF-Faktoren über EmER sensiert, obwohl der Nachweis einer direkten Interaktion dieser Faktoren mit EmER noch aussteht.

#### 4.1.2 GTPasen der Ras-Familie

**GTPasen:** GTPasen der Ras-Familie bilden durch die Interaktion mit Raf das einleitende Signal für die Aktivierung einer ERK-Kaskade. Reguliert werden GTPasen durch GEFs (GDP/GTP Exchange Proteins) und GAPs (GTPase Activating Proteins) [307]. In dieser Arbeit wurden für *E. multilocularis* die vier Ras-GTPasen EmRas, EmRap1, EmRap2 und EmRal charakterisiert. Alle vier Faktoren wiesen die für GTPasen typische Domänenstruktur auf und konnten aufgrund sehr hoher Sequenzhomologien eindeutig den verschiedenen Unterfamilien zugeordnet werden. Eine charakteristische Eigenschaft Ras-ähnlicher GTPasen ist neben der Fähigkeit GTP zu binden eine posttranslationelle Prenylierung am C-Terminus. Für alle der vier charakterisierten GTPasen konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine C-terminale Pränylierung nachgewiesen werden. Eine biochemische Besonderheit von EmRap2 scheint jedoch zu sein, dass dieses nicht zur Bindung von GTP fähig ist, wie es für EmRas, EmRap1 und EmRal gezeigt werden konnte, obwohl die Konsensussequenzen der beteiligten Aminosäuren in den Domänen G1, G3, G4 und G5 identisch konserviert vorliegen (Abb. 39). Verantwortlich dafür könnte ein, in EmRap2 zusätzlich vorhandener kurzer Abschnitt von Aminosäuren (EmRap2, AS 105-119) sein, der zu einer Konformationsänderung des Proteins führen und so zum Beispiel die Bindung des Guanidinrings über die Domäne G4 oder die

Stabilisierung der GTP/GDP-Bindung über die Domäne G5 behindern könnte. In der Regel interagieren Ras-GTPasen nur in GTP-gebundener Form mit Effektoren. Interessanterweise wurden in Yeast-Two-Hybrid-Studien mit EmRaf, neben EmRas und EmRap1, auch Interaktionen mit EmRap2 beobachtet. Während die Interaktionen zwischen EmRap2 und EmRaf sowie zwischen EmRas und EmRaf sehr stark waren, konnte für EmRap1 nur eine schwache Interaktion gemessen werden, obwohl EmRap1 genau wie die zwei anderen GTPasen über die fünf konservierten Aminosäurereste innerhalb der Effektor-Domäne verfügt, die für eine Interaktion mit Raf essentiell sind. Die schwache Interaktion könnte durch eine starke intrinsische GTPase-Aktivität von EmRap1 oder durch eine Kreuzreaktion von EmRap1 mit GAPs der Hefe, verursacht werden. Da EmRaf in Hefen sehr wahrscheinlich durch Hefe-GTPasen aktiviert wird, besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass EmRap1, aufgrund einer geringeren Affinität, mit homologen Faktoren der Hefe um die Bindungsstelle am Echinokokken-Raf konkurriert (zur Erklärung: Nur aktives Raf kann MKK binden [339]. In Yeast-Two-Hybrid-Experimenten konnte eine Interaktion zwischen EmRaf und EmMKK nachgewiesen werden. Da keine Echinokokken-GTPasen anwesend waren muß EmRaf über Hefe-GTPasen aktiviert worden sein). Interaktionen dieser Art sind auch für humane Systeme beschrieben, so konkurrieren z. B. Rap1 und Rap2 um die Bindung an die gleichen Effektormoleküle, Rap2 bleibt aber wesentlich länger am Effektor gebunden und führt dadurch zu einer verlangsamten Signalübertragung [231]. Da EmRas und EmRap1 C-terminal farnesyliert und daher in der Zelle mit großer Wahrscheinlichkeit an den gleichen Membranen lokalisiert sind, könnten sie in *E. multilocularis* eine vergleichbare regulative Aufgabe übernehmen. Dafür spricht auch, dass sowohl EmRas als auch EmRap1 über spezifische Antikörper in den gleichen Gewebestrukturen des Parasiten lokalisiert wurde. Ob die GTPasen EmRas, EmRap1 und EmRap2 in der Lage sind, EmRaf zu aktivieren und welchen Einfluß darauf die schwache Interaktion zwischen EmRap1 und EmRaf oder die fehlende GTP-Bindung von EmRap2 hat, kann weiter untersucht werden, wenn ein Aktivitätsassay für EmRaf etabliert ist.

In der Signalkette liegt Ral downstream von Ras und wird über GEFs reguliert, die direkt mit Ras interagieren [307]. Da in *E. multilocularis* bisher keine Regulatoren oder downstream liegende Effektoren für EmRal beschrieben sind, können weiterführende Studien erst nach der Identifikation dieser Faktoren durchgeführt werden. Für andere Spezies konnten diese Faktoren über Yeast-Two-Hybrid-Experimente und Co-Immunopräzipitationen isoliert werden [74, 113, 167, 212]. Daher sollte über diese Methoden auch die Identifizierung der Ral-Interaktionspartner für *E. multilocularis* möglich sein und neue Informationen der Ras/Ral-Signaltransduktion des Parasiten ermöglichen.

### 4.1.3 EmRaf

Raf-Proteine sind Serin/Threoninkinasen, die durch kleine GTPasen der Ras-Familie wie Ras und Rap aktiviert werden und ihr Signal an MAP-Kinase-Kinasen (MKK/MEK) weiter geben [334]. EmRaf ist ein Raf-Kinase-Ortholog aus *E. multilocularis*, das zu allen bekannten Raf-Kinasen hohe Sequenzhomologien zeigt und in dem alle funktionell wichtigen Reste an entsprechenden Positionen vorhanden sind. In der CR1-Domäne sind in Säugetier-Raf-Kinasen die Ras-Bindungs-Domäne (RBD) und die CRD-Domäne lokalisiert, über die Ras- und Rap-GTPasen an Raf binden um dieses zu aktivieren [138, 71, 83, 147, 223]. Für eine Funktionalität der RBD von EmRaf sprechen Yeast-Two-Hybrid-Experimente, in welchen Interaktionen zwischen EmRaf und den drei Ras-GTPasen EmRas, EmRap1 und EmRap2 von *E. multilocularis* nachgewiesen werden konnten. Nicht geklärt ist bis jetzt, ob und wie schnell EmRaf durch die drei GTPasen aktiviert wird. Da EmRaf sehr wahrscheinlich mit GTPasen der Hefe kreuzreagiert, und dabei durch diese aktiviert wird, könnte über ein Bacterial-Two-Hybrid-System der Nachweis einer Aktivierung von EmRaf durch die GTPasen EmRas, EmRap1 und EmRap2 erbracht werden.

Als Teil eines Gerüstkomplexes binden verschiedene 14-3-3-Proteine an Raf-Kinasen und stabilisieren diese dabei in ihrer aktivierten oder inaktiven Form [178]. Das in dieser Arbeit identifizierte Em14-3-3.2 interagiert nicht mit EmRaf, obwohl alle relevanten Aminosäurestrukturen konserviert sind. Neben der Möglichkeit, dass Em14-3-3.2 kein Interaktionspartner von EmRaf ist, könnte eine fehlende Phosphorylierung von zwei regulativen Serinresten (Ser<sup>364</sup> und Ser<sup>621</sup>) in EmRaf dafür verantwortlich sein, dass keine Interaktion stattfindet.

Raf-1 aktiviert MEK1 über die Phosphorylierung von zwei Serinresten in dessen Kinasedomäne [8]. Für die Bindung von MEK1 an Raf-1 müssen in Raf-1 die Aminosäuren Ser<sup>338</sup>Ser<sup>339</sup>Tyr<sup>340</sup>-Tyr<sup>341</sup> vorhanden und das Ser<sup>338</sup> sowie das Tyr<sup>341</sup> phosphoryliert sein. Durch die Phosphorylierung entstehen durch Konformationsänderungen zwei MEK-Bindungsstellen. Die Bindung von MEK1 erfolgt auch, wenn die zwei Tyrosine Tyr<sup>340</sup> und Tyr<sup>341</sup> durch phosphomimetische Asparaginsäuren (Asp) ersetzt werden [339]. Da in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten eine starke Interaktion zwischen EmRaf und EmMKK-A beobachtet werden konnte, scheinen beide Faktoren Teil einer gemeinsamen Signalkaskade zu sein. Zusätzlich spricht diese Interaktion für eine Aktivierung von EmRaf durch Hefe-Ras-GTPasen, da eine Bindung von MEK1 an Raf-1 nur erfolgt, wenn Ser<sup>338</sup> phosphoryliert ist und diese Phosphorylierung Teil der Ras-vermittelten Aktivierung von Raf-1 ist [339, 307]. Da für eine Bindung von MEK1 an Raf-1 weiterhin die zwei Tyrosine Tyr<sup>340</sup> und Phospho-Tyr<sup>341</sup> essentiell sind, jedoch durch phosphomimetische Aminosäuren ersetzt werden können [339], kann davon ausgegangen werden, dass die bisher für Raf-Kinasen nicht beschriebene Sequenz Ser<sup>450</sup>Ser<sup>451</sup>Asp<sup>452</sup>Lys<sup>453</sup> mit Lysin an Position Lys<sup>453</sup> in EmRaf funktionell aktiv ist.

Da EmRaf sowohl mit potentiellen Aktivatoren (EmRas, EmRap1, EmRap2) als auch mit einem möglichen Effektor (EmMKK) interagiert, in den beiden Larvenstadien Metacestode und Protoscolex exprimiert wird und mit sehr großer Wahrscheinlichkeit das einzige Raf-Homolog aus *E. multilocularis* ist, kann davon ausgegangen werden, dass EmRaf in zentrale Wachstums- und Entwicklungsprozesse eingebunden ist. Experimente für den Nachweis, dass EmRaf funktionell aktiv ist und nachfolgende Effektoren wie EmMKK-A phosphorylieren kann, könnten angelehnt an die Arbeit von Huang et al. [156] durchgeführt werden. Für die darin beschriebenen *in vitro* Phosphorylierungsassays könnten rekombinant hergestelltes EmMKK-A und aus Hefen isoliertes rekombinant exprimiertes EmRaf (aktiviert durch Hefe-Ras, EmRas, EmRap1 oder Rap2) eingesetzt werden, die funktionelle Aktivität von EmRaf durch die Phosphorylierung von EmMKK-A nachgewiesen werden.

#### 4.1.4 EmMKK

Map-Kinase-Kinasen (MKK/MEK) sind dualspezifische Threonin/Tyrosin-Kinasen, die innerhalb der MAP-Kinase-Kaskade von Raf aktiviert werden und in Antwort darauf MAP-Kinasen (ERK) aktivieren [334]. In einem Vergleich mit einer Vielzahl verschiedener MKK-Faktoren unterschiedlicher Organismen zeigte EmMKK-A die höchsten Homologien zu den humanen MKK3- und MKK6-Faktoren. Zusätzlich waren alle funktionell relevanten Aminosäurereste in EmMKK an entsprechenden Stellen konserviert vorhanden. In der Isoform EmMKK-B, die durch alternatives Spleißen entsteht, fehlte dagegen ein großer Teil der Kinasedomäne, inklusive der zwei Serinreste, die für die Aktivierung nötig sind. Die, für die Kinaseaktivität relevanten Aminosäurereste blieben in EmMKK-B jedoch erhalten. Als Folge der Deletion könnte MKK-B eine veränderte Aktivität zeigen, auf eine andere Art reguliert werden und möglicherweise auch andere Interaktionspartner besitzen als EmMKK-A. Einen ersten Hinweis lieferten Yeast-Two-Hybrid-Interaktionsstudien, in welchen EmRaf mit EmMKK-A interagiert, jedoch nicht mit EmMKK-B. Daher ist EmMKK-A mit großer Wahrscheinlichkeit ein natürlicher Interaktionspartner von EmRaf und damit Teil einer gemeinsamen Signalkaskade. Da das Yeast-Two-Hybrid-System auch erfolgreich für Interaktionsstudien zwischen humanem ERK2 und MEK1 eingesetzt wurde [262], wurde in weiteren Yeast-

Two-Hybrid-Experiment eine mögliche Interaktion zwischen EmMKK-A/B und EmERK-A/B untersucht. Da keine Interaktionen festgestellt werden konnten, ist es wenig wahrscheinlich, dass EmMKK-A/B und EmERK-A/B einem gemeinsamen Signalweg angehören. Da EmMKK-A die höchsten Homologien zu humanem MKK3/6 zeigt, dass die humane p38-MAP-Kinase aktiviert [91], könnte die p38-MAP-Kinase aus *E. multilocularis* (Emp38) ein Effektor für EmMKK-A/B sein. Diese Fragestellung wird zur Zeit gemeinsam mit der Charakterisierung eines p38-MAP-Kinase-Homologs aus *E. multilocularis* von Rocio Caballero im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation durchgeführt.

Wie bereits erwähnt, wird das Echinokokken-spezifische *emmkk* in den beiden Spleißformen *emmkk-A* und dem verkürzten *emmkk-B* exprimiert. Beide Spleißformen wurden in Metacestoden-vesikeln aus einer *in vitro* und in Protoscolices aus einer *in vivo* Kultur nachgewiesen, woraus folgt, dass *emmkk-A* und *emmkk-B* ubiquitär im Parasiten exprimiert werden und daher in grundlegende Signaltransduktionsmechanismen eingebunden sein müssen. Da spezifische Antikörper fehlen, konnte eine exakte Lokalisation im Parasitengewebe bisher nicht erfolgen. Mit genspezifischen Sonden gegen den N-Terminus und die Kinasedomäne von *emmkk* wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt, über die bestätigt wurde, dass *emmkk* als single copy Gen vorliegt. Dieses Ergebnis überraschte, da für andere Organismen, wie zum Beispiel *Homo sapiens*, eine ganze Reihe verschiedener MKKs bekannt sind, die Homologien von bis zu 80% identischer Aminosäuren aufweisen, wie z.B. zwischen MEK1 und MEK2. Die Homologien sind jedoch nicht durchweg so hoch, zwischen MEK1 und MKK6 liegt sie nur bei 36% identischer Aminosäuren, daher ist die Anwesenheit weiterer MKKs in *E. multilocularis* nicht nur wahrscheinlich sondern konnte mit der Identifizierung eines EmMEK1-Homologs durch V. Gelmedin bestätigt werden [persönliche Mitteilung].

#### 4.1.5 EmERK

In Säugersystemen werden ERK1/2 (Extracellular Signal Regulated Kinase, MAPK) innerhalb eines Dreikinassenmoduls von MEK1/2 (MKK) als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Signale, wie EGF, durch eine Phosphorylierung aktiviert und aktivieren dann eine Reihe verschiedener Effektormoleküle im Cytoplasma oder dem Zellkern [334]. Da ERK nur durch dualspezifische Phosphatasen dephosphoryliert werden kann, bleibt die Phosphorylierung häufig sehr lange bestehen und über phosphospezifische Antikörper nachweisbar. Da die Phosphorylierung von ERK in direktem Zusammenhang mit extrazellulären Signalen steht, kann über Western-Blot-Experimente sehr einfach ein möglicher wachstums- oder entwicklungsrelevanter extrazellulärer Stimulus bestimmt werden. Die Zuordnung von *emerck* zur Familie der ERK-ähnlichen MAP-Kinasen (MAPK) erfolgte über einen Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz EmERK mit verschiedenen MAP-Kinasen der ERK-, JNK- und p38-MAP-Kinase-Familien, wobei sehr große Homologien mit ERK-Vertretern aus *C. elegans*, *Drosophila* und des Menschen festgestellt wurden. Für eine funktionelle Aktivität von EmERK spricht, dass alle für ERK-Faktoren charakteristischen Domänen und funktionelle Aminosäurereste konserviert an den entsprechenden Stellen in EmERK vorhanden sind.

In Säugetieren werden über 10 verschiedene ERK-MAP-Kinasen exprimiert, die untereinander sehr hohe Homologien zeigen und wie im Fall von ERK1 und ERK2 sogar gleiche Interaktionspartner besitzen, wie zum Beispiel die MAP-Kinase-Kinasen (MEK1/MEK2) über die sie aktiviert werden [358]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Southern-Blot-Analysen zeigten dabei klar, dass EmERK als single copy Gen vorliegt. Dieses Ergebnis stimmt mit der Situation andere Invertebraten, wie zum Beispiel *C. elegans* überein, für den mit *cempk1* auch nur ein *erk*-Homolog beschrieben ist [22]. Ausgehend von nur einem *emerck*-Primärtranskript erhöht sich in *E. multilocularis* jedoch die Anzahl möglicherweise differentiell agierender ERK-Kinasen durch die Isolation

drei verschiedener *emer*k-Varianten (*emer*k-A/B/C), die durch alternatives Spleißen des neunten Introns unter Verwendung alternativer Spleißakzeptorstellen entstehen. Diese Art des alternativen Spleißens wurde für ERK1 auch schon in Säugetieren beobachtet und fand an der gleichen Stelle statt (in Intron 8, das äquivalent zu Intron 9 in *emer*k ist). Im Fall von Isoform ERK1b [353], die in Ratten gefunden wurde und eine 26 AS-Insertion an dieser Stelle trägt, stellte die Isoform ERK1c aus *H. sapiens* [3] ein C-terminal verkürztes Protein dar. Auch die Echinokokken-Isoformen EmERK-B und EmERK-C sind C-terminal verkürzt. Alle drei Spleißformen von *emer*k sind in den Larvenstadien Metacestode und Protoscolex, sowie in aktivierten Protoscolices nachweisbar.

Über einen phospho-spezifischen ERK-Antikörper, der im Western-Blot nur das 42 kDa große EmERK-A erkannte, konnte die Lokalisation von EmERK-A im Metacestoden auf Germinalschichtbereiche mit Kalziumkörperchen und beim Protoscolex in verstärktem Maße auf Bereiche um die Saugnäpfe und das Rostellum eingegrenzt werden. Im Einklang mit der Lokalisation von doppelt phosphoryliertem ERK in den Zellkernen tierischer Zellen [348], steht auch die deutliche Anfärbung der Zellkerne im Protoscolex und im Metacestoden. In Western-Blot -Analysen wurde neben dem phosphospezifischen ERK-Antikörper ein Antikörper eingesetzt, der am C-Terminus von ERK-Faktoren bindet. Dabei konnte EmERK-A mit beiden Antikörpern in den Larvenstadien Metacestode und Protoscolex nachgewiesen werden, nicht jedoch die C-terminal trunkierten Isoformen EmERK-B und EmERK-C, welchen die Bindungsstelle für den ERK-spezifischen Antikörper fehlt. Interessanterweise konnte mit einem phosphospezifischen Antikörper, der das doppelt phosphorylierte TEY-Motiv erkennt und damit den Nachweis von aktiviertem ERK ermöglicht, auch nur EmERK-A nachgewiesen werden. Daher scheinen die Isoformen EmERK-B und EmERK-C in den Larvenstadien nicht phosphoryliert zu werden. Für die Phosphorylierung von EmERK-A konnte zudem gezeigt werden, dass sie eng mit der Proliferation und den wachstumsrelevanten Umgebungsbedingungen des Parasiten zusammenhängt. Eine Phosphorylierung von EmERK-A konnte dabei während einer *in vitro* Kultivierung des Metacestoden unter idealen Wachstumsbedingungen (Serum/Hepatocyten) und *in vivo* in infizierten Zwischenwirten beobachtet werden. Nach der Entfernung des Serums und der Hepatocyten, stellten die Metacestodenvesikel ihr Wachstum ein und starben innerhalb von 1-2 Wochen. Diese Bedingungen führten schon nach zwei Tagen zu einer deutlich reduzierten Phosphorylierung von EmERK-A, die nach der Zugabe von Hepatocyten, Hepatocyten-konditioniertem Medium oder humanem EGF wieder anstieg. Die unterschiedliche Phosphorylierung von EmERK-A spiegelt dabei den Aktivierungsstatus der ERK-Kaskade des Parasiten wieder und daher ist der Phosphorylierungsstatus von EmERK-A ein geeigneter Marker für die Lebensfähigkeit, die Proliferation und das Wachstum des Parasiten, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Da eine verstärkte Phosphorylierung von EmERK auch beobachtet werden konnte, wenn zu den Metacestodenvesikeln humanes Insulin oder humanes BMP2 gegeben wurde [V. Gelmedin, persönliche Mitteilung], konnte über die Messung des Phosphorylierungsgrades von EmERK, neben dem Einfluß der Fütterzellen und des Kulturmediums, erstmalig der spezifische Einfluß wirtseigener Wachstumsfaktoren auf *E. multilocularis* gezeigt werden.

Um eine Aktivität von EmERK-A experimentell zu bestätigen, wurde nach einem Protokoll, in dem für MAP-Kinasen die *in vitro* Phosphorylierung von Myelin-Basic-Protein (MBP) beschrieben ist [190], mit rekombinant exprimiertem EmERK-A ein Aktivitätsassay durchgeführt. Da rekombinant exprimiertes EmERK-A nur mit dem C-terminal-spezifischen Antikörper detektiert werden konnte und demnach nicht wie es für p38-MAP-Kinasen beschrieben ist [190], in *E. coli* phosphoryliert wird, wurde rekombinant exprimiertes EmERK-A für den Aktivitätsassay mit dem C-terminal-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und in Echinokokkenlysate aktiviert. In diesem Versuch konnte die funktionelle Aktivität neben dem rekombinant exprimierten EmERK-A auch für natives EmERK bestätigt werden, dass entweder mit dem C-terminal-spezifischen oder dem phosphospezifischen Antikörper aus Echinokokkenlysate immunpräzipitiert wurde. Die Etablierung dieses Aktivitätsassays ist die Grundlage weiterer Versuche, in welchen zum Beispiel der Einfluß verschiedener ERK-Inhibitoren getestet werden kann.

Da in *E. multilocularis* mit EmMKK ein potentieller Aktivator von EmERK identifiziert werden konnte, sollte über Yeast-Two-Hybrid-Experimente geklärt werden, ob beide der gleichen Signalkaskade zugehören. Obwohl Yeast-Two-Hybrid-Interaktionen zwischen MKK- und ERK-Faktoren beschrieben sind [262], konnte dies für EmMKK-A/B und EmERK-A/B experimentell nicht bestätigt werden. Da in der Zwischenzeit jedoch ein weiterer MKK-Faktor aus *E. multilocularis*, mit sehr hohen Homologien zum humanem, gut untersuchten, ERK-Aktivator MEK1, isoliert werden konnte [V. Gelmedin, persönliche Mitteilung], besteht mit diesem die Möglichkeit, eine funktionelle Verbindung zwischen EmRaf und EmERK herzustellen und damit die Faktoren der ERK-Kaskade des Parasiten vollständig zu erhalten.

## 4.2 *in vitro* Kultursysteme

### 4.2.1 Co-Kultur

Parasitäre Helminthen besitzen sehr komplexe Lebenszyklen und eine ausgeprägte Anpassung an ihre Wirte, so dass entsprechende Kulturbedingungen im Labor nur schwer nachgestellt werden können. Für Studien zur molekularen Entwicklungsbiologie oder der Wirt-Parasit-Interaktion sind *in vitro* Kultursysteme der Parasiten jedoch essentiell. Sie ermöglichen die Kultivierung des Parasiten unter definierten Bedingungen, erlauben eine Beobachtung des Wachstums und der Differenzierung und bieten einen einfachen biochemischen und molekularbiologischen Zugang zum Parasiten unter Laborbedingungen. Die Entwicklung des Fuchsbandwurmes beinhaltet zum Beispiel 3 Larvenstadien und ist mit zwei Wirtswechseln verbunden. Der adulte Wurm lebt im Darm des Fuchses und scheidet infektiöse Eier (1. Larvenstadium: Oncosphäre) aus, die mit dem Kot ins Freie gelangen, wo sie oral von kleinen Nagern aufgenommen werden, deren Magen passieren und nach einer Penetration des Darmepithels über Blut- und Lymphgefäße in der Leber des Zwischenwirts ankommen, wo sie sich zum Metacestoden (2. Larvenstadium) entwickeln. Für das potentiell unsterbliche Metacestodenstadium des Fuchsbandwurmes wurde schon sehr früh ein geeignetes Tiermodellsystem entwickelt, das die natürliche Situation des Zwischenwirts und damit die alveoläre Echinokokkose sehr gut widerspiegelt. Dafür wird Metacestodengewebe in das Peritoneum eines Nagetiers (Maus, Gerbil) injiziert, wo es innerhalb weniger Wochen zu großen Gewebeblöcken heranwächst, in welchen sich dann *Protoscolices* ausdifferenzieren. Durch wiederholtes passagieren des Parasitengewebes in weitere Laborzwischenwirte können so große Mengen eines Echinokokkenisolats gewonnen und dieses auch über viele Jahre erhalten werden. Ausgehend von diesen *in vivo* Kulturen oder auch frischen Isolaten konnten zudem verschiedene *in vitro* Kultursysteme entwickelt werden, in welchen in serumhaltigem Medium entweder kleine, Metacestodenesikel-abschnürende Gewebeblöcke [145] kultiviert werden oder zerkleinertes Metacestodengewebe in Co-Kultur mit Hepatocyten zwischen zwei Lagen aus Kollagen wächst [169]. Beide Methoden haben neben der geringen Ausbeute an Metacestodenesikeln den Nachteil, dass sie mit Wirtszellen oder Hepatocyten versetzt sind, die für das Wachstum der Echinokokken-Kulturen essentielle Wachstumsfaktoren ins Medium abgeben [169]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch das Weglassen der Kollagenschichten die Co-Kultivierung von Metacestodenesikeln mit Hepatocyten in ihrer Handhabung stark vereinfacht und die Ausbeute an Metacestodenesikeln extrem gesteigert werden [355, 296]. Da die Metacestodenesikel frei im Medium schwimmen, können sie sehr einfach abgesiebt werden, während die adhärennten Fütterzellen am Boden der Kulturflasche verbleiben. Eine interessante Beobachtung war die Entwicklung von sterilen Adultstadien des Fuchsbandwurmes während der Kultivierung von Metacestodenesikeln in Gegenwart verschiedener Fütterzellen. Dabei entwickelten sich *Protoscolices* in Gegenwart von Hepatocyten (Rattenhepatocyten: RH<sup>+</sup> oder humane Hepatocyten: HepG2) zu vesikulären, metacestodenartigen Strukturen und in Gegenwart von Fibroblasten (Hep2) zu sterilen Adultstadien mit mehreren Proglottiden. Werden die Adultwürmer anschließend wieder in Gegenwart von Hepatocyten kultiviert,

bilden auch sie blasige Strukturen. Dieses Experiment zeigt deutlich, dass die Entwicklung des Fuchsbandwurmes eng mit Faktoren des Wirts verbunden ist. Dabei scheint der Faktor, der für ein metacestodenartiges Wachstum verantwortlich ist, nur von Hepatocyten ausgeschleust zu werden, was mit der *in vivo* Situation übereinstimmt, wo der Metacestode hauptsächlich in der Leber zu finden ist. Inwieweit die Differenzierung des Adultstadiums mit ausgeschleusten Faktoren der Fibroblasten oder dem Fehlen der Hepatocytenfaktoren zusammenhängt, ist bisher noch nicht untersucht. Da adulte Würmer unter natürlichen Bedingungen im Darm des Fuchses innerhalb weniger Wochen Oncosphären ausbilden, dies jedoch während der *in vitro* Kultur auch innerhalb von 8 Monaten nicht zu beobachten war, fehlt zu einer vollständigen *in vitro* Nachstellung des Lebenszyklusses von *E. multilocularis* nur noch der Trigger, der die Adultstadien zur Bildung von Oncosphären anregt, die sich wie von Gottstein et al. [129] beschrieben *in vitro* zu Metacestodenvesikeln differenzieren können.

#### 4.2.2 axenisches Kultursystem

Für Untersuchungen zur Wirt-Parasit-Interaktion eignet sich das Co-Kultursystem jedoch nur bedingt, da die Interpretation der beobachteten Effekte dadurch erschwert wird, dass die zugegebenen Faktoren (z.B. EGF, Insulin, verschiedene Inhibitoren) sowohl einen Einfluß auf die Hepatocyten als auch auf die Metacestodenvesikel haben können. Darum wurde in dieser Arbeit ein axenisches Kultursystem für die Metacestodenvesikel entwickelt, in dem sie in Abwesenheit von Fütterzellen kultiviert werden können. In einer Reihe von Versuchsansätzen wurden dafür verschiedene Kultur-Parameter variiert und das System auf ein möglichst langes Überleben der Metacestodenvesikel optimiert (über 12 Wochen). Sehr schnell zeigte sich, dass für eine axenische Kultivierung der Metacestodenvesikel reduzierende Bedingungen im Medium absolut essentiell sind. Dies lässt darauf schließen, dass der Parasit sehr sensitiv gegenüber toxischen Sauerstoffmetaboliten ist, die während einer Kultur im Medium entstehen. Verwendet wurde entweder Dulbeccos Minimal Essential Medium ohne FCS (MEM), mit 10% FCS (dMEM) oder konditioniertes Medium (cMEM: dMEM in dem für 7 Tage RattenHepatocyten kultiviert wurden). Während die Metacestodenvesikel in MEM auch unter reduzierenden Bedingungen innerhalb weniger Tage starben, überlebten in serumhaltigem dMEM nach 5 wöchiger Kultur ~60% der eingesetzten Vesikel, wuchsen jedoch nur in sehr geringem Umfang. Wurden die Vesikel dagegen in cMEM kultiviert, überlebten 5 wöchiger Kultur ~90% der eingesetzten Vesikel, wuchsen auf ein über 10 faches Volumen und begannen ab der 8. Kulturwoche mit der Ausdifferenzierung von Brutkapseln. Dies zeigt deutlich, dass für das Wachstum und die Entwicklung von *E. multilocularis* neben Wirtsserum auch Wachstumsfaktoren notwendig sind, die von teilungsaktiven Hepatozyten sekretiert werden. Interessanterweise hat die Art der Herstellung des konditionierten Mediums einen Einfluß auf die Parasitenentwicklung. Während konditioniertes Medium von konfluent gewachsenen Hepatocyten das Wachstum der Metacestodenvesikel nur bedingt unterstützt, kann ein sehr gutes Wachstum in Medium erzielt werden, in welchem frisch trypsinierte Hepatocyten für 3-7 Tage kultiviert wurden. Entsprechendes kann auch während der Ko-Kultivierung des Parasiten beobachtet werden, in der die Entwicklung des Parasiten optimal verläuft, wenn bei jedem Medienwechsel (1-2x pro Woche) frisch trypsinierte Hepatocyten zugegeben werden. Abhängig war das Wachstum auch vom pH-Wert (pH 5/6 wenig Wachstum, pH7 optimales Wachstum, pH 8/9 wenig Wachstum und Absterben der Vesikel) und als Folge der Ansäuerung des Mediums durch die Metacestodenvesikel während des Wachstums, auch von der Häufigkeit des Medienwechsels (Optimum: 3x wöchentlich für cMEM, 1x wöchentlich für dMEM). Ein weiterer entscheidender Faktor war die Wahl der eingesetzten Metacestodenvesikel, deren Entwicklungsstand einen Einfluß auf die Parasitenentwicklung hat, sowie deren Gewöhnung an die axenischen Kulturbedingungen. Während der 1-2 wöchigen Umgewöhnungsphase, in der auch die Hepatozyten entfernt wurden, überlebten nach Zugabe von 40µM Insulin annähernd 100% der Vesikel (ohne Insu-

lin bis zu 80%) und in den darauf folgenden Versuchen konnte das beste Wachstum und Überleben bei Vesikeln beobachtet werden, die zu Beginn mindestens 60 $\mu$ l Volumen besaßen und noch keine Brutkapseln enthielten. Vor allem sehr junge und damit deutlich kleinere Vesikel starben überproportional oft und ältere Vesikel die schon Brutkapseln enthielten wuchsen nur noch in sehr geringem Umfang. Zusammengefasst benötigen die Metacestodenvesikel für ein axenisches Wachstum reduzierende Bedingungen in einem konditionierten, pH-neutralen und serumhaltigen Medium. Nach der Etablierung und Optimierung des Systems wurden verschiedene Wachstumsversuche durchgeführt, die einen Einblick in die Wirt-Parasit-Interaktion erlauben.

Im natürlichen Zwischenwirt, aber auch infizierten Menschen, wächst der Metacestode bevorzugt in der Leber. Auch in Wachstumsversuchen, in welchen Medien eingesetzt wurden, die mit verschiedenen Zelllinien konditioniert wurden, wurde die größte Vesikelzunahme in dem Medium beobachtet, das mit Hepatocyten (RH<sup>-</sup>) konditioniert wurde. Ein geringeres Wachstum konnte aber auch in Medien beobachtet werden, die mit anderen Zelllinien konditioniert wurden. Nur in Medium, das mit der makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 konditioniert wurde, wuchsen die Vesikel nicht. Interessanterweise konnte auch kein Wachstum der Metacestodenvesikel beobachtet werden, wenn MEM oder dMEM mit 10% Hepatocytenlysat eingesetzt wurde, was stark darauf hin deutet, dass die Wachstumsfaktoren von den Fütterzellen ins Medium sezerniert werden und nicht aus dem Cytoplasma lysierter Zellen stammen. Da ein Wachstum der Metacestodenvesikel in konditioniertem Medium verschiedenen Zelllinien beobachtet wurde, könnte die Sekretion der wachstumsstimulierenden Faktoren entweder eine weitverbreitete Eigenschaft von Säugerzellen sein oder alternativ ein besonderes Charakteristikum immortalen Zelllinien darstellen.

### 4.2.3 Einfluß von Wachstumsfaktoren auf Metacestodenvesikel

Im Zusammenhang mit der Wirt-Parasit-Interaktion bietet sich eine besonders interessante Anwendungsmöglichkeit des axenischen Kultursystems durch den Einsatz wirtseigener Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel Insulin, EGF, oder BMP2. Diese Faktoren und deren zugehörige Signalkaskaden sind in Säugersystemen entscheidend an Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt [306, 334, 226]. Da *E. multilocularis* in unmittelbarem Kontakt mit dem endokrinen System seines Wirtes lebt und zusätzlich hoch homologe Signalkomponenten dieser Systeme exprimiert, wurden im axenischen Kultursystem unter anderem die oben genannten Zytokine eingesetzt und deren Einfluß auf das Wachstum und das Überleben der Metacestodenvesikel beobachtet. Schon nach 5 wöchiger Kultivierung konnten dabei deutliche Effekte festgestellt werden. Interessant war auch hier, dass sich der Einfluß der jeweils verwendeten Zytokine auf die Parasitenentwicklung zum Teil deutlich unterschied, je nach dem wie alt und entwickelt die Metacestodenvesikel zu Beginn des Versuchs waren oder wie das eingesetzte Medium konditioniert wurde. Eingesetzt wurden entweder junge, klar durchscheinende oder ältere, in ihrer Entwicklung weiter fortgeschrittene und leicht trüb erscheinende Metacestodenvesikel ohne Brutkapseln. Die mit Ausnahme einiger BMP2-Versuche reproduzierbaren Daten, wurden nach Zugabe der Zytokine in dMEM (MEM+FCS), cMEM (dMEM, 7 Tage mit  $1 \times 10^6$  frisch trypsinisierten Hepatocyten konditioniert) und cMEM-B2 (dMEM, 3 Tage mit  $2 \times 10^7$  frisch trypsinisierten Hepatocyten konditioniert) durchgeführt. Ohne die Zugabe von Zytokinen überleben nach einer 5 wöchigen Kultivierung unter axenischen Bedingungen etwa 60% der eingesetzten Metacestodenvesikel in dMEM, während in cMEM etwa 90% und in cMEM-B2 100% überleben. Innerhalb des Versuchszeitraumes wachsen die Metacestodenvesikel in dMEM auf ein 2-4 faches, in cMEM auf ein über 10 faches und in cMEM-B2 auch nur auf ein 2-4 faches Volumen heran. daraus ergeben sich die drei Bedingungen, auf die sich die folgenden Versuche beziehen: dMEM, geringes Wachstum, geringe Überlebensrate, keine Hepatocytenfaktoren, cMEM optimales Wachstum, hohe Überlebensrate und cMEM-B2 geringes Wachstum, sehr hohe Überlebensrate.



Von den eingesetzten Faktoren EGF, Insulin und BMP2 zeigte Insulin die deutlichsten Effekte. Besonders auffällig war die protektive Wirkung von Insulin auf Metacestodenvesikel, die in dMEM kultiviert wurden. Während ohne Insulinzugabe nur 60% der Vesikel überlebten, waren es in den Insulinansätzen über 80% der Vesikel. Zusätzlich erreichten die Vesikel mit Insulin ein etwa 40% größeres Volumen als ohne. In cMEM erfolgte nach Zugabe von Insulin dagegen eine langsamere Volumenzunahme der Vesikel, die am Ende dann ein etwa 30% geringeres Endvolumen aufwiesen als die Vesikel, die ohne Insulin kultiviert wurden. In cMEM-B2 bewirkte die Zugabe von Insulin dagegen ein 40% bis 60% höheres Endvolumen der Vesikel und bewies damit eine deutliche wachstumssteigernde Wirkung von Insulin. Ein weiterer sehr interessanter Effekt von Insulin war das Ausbleiben der Brutkapselbildung während einer Kultivierung von jungen Metacestodenvesikeln in cMEM. Wurden Vesikel eingesetzt, die schon Brutkapseln enthielten, entwickelten sich die Brutkapseln in Gegenwart von Insulin nur sehr langsam weiter, dafür wuchsen die Vesikel deutlich schneller als die in den insulinfreien Kontrollen. Auch für EGF konnten Effekte auf das Wachstum der Metacestodenvesikel beobachtet werden, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als für Insulin. Wurde EGF zugegeben, konnte in cMEM ein etwa 10% geringeres Wachstum der Metacestodenvesikel beobachtet werden, während in dMEM keine Unterschiede auftraten. Das deutet darauf hin, dass EGF für ein Wachstum der Metacestodenvesikel allein nicht ausreicht und ein zusätzlicher sezernierter Faktor der Hepatocyten benötigt wird. In cMEM-B2 führte EGF dagegen zu einer 30%-igen Volumenzunahme der Vesikel, was für EGF einen wachstumsfördernden Effekt belegt. In keinem der durchgeführten Experimente hatte EGF einen Effekt auf das Überleben der Metacestodenvesikel.

In cMEM-B2 konnte für EGF und Insulin ein wachstumsfördernder Effekt nachgewiesen werden, der die These einer Kreuz-Kommunikation zwischen Wirt und Parasit untermauert. Während Insulin einen allgemeinen wachstumsfördernden Effekt zeigt, reicht für ein Wachstum der Metacestodenvesikel EGF allein nicht aus. Dafür, dass neben Insulin und EGF noch weitere Faktoren eine wichtige Rolle spielen sprechen die Ergebnisse der Wachstumsversuche in cMEM, in welchen die Zugabe von EGF und Insulin eine geringere Volumenzunahme der Metacestodenvesikel bewirkte. Der Einfluß der beiden Zytokine auf *E. multilocularis* konnte auch über molekularbiologische Methoden bestätigt werden. EGF und Insulin werden über Tyrosin-Kinaserezeptoren sensiert und leiten das Signal über eine MAP-Kinase-Kaskade in die Zelle. Am Ende dieser Kaskade befindet sich ERK, das in Antwort auf eine Stimulation mit EGF und Insulin phosphoryliert wird. Über Western-Blot-Analysen konnte in Metacestodenvesikeln, die in Gegenwart von EGF oder Insulin kultiviert wurden eine deutlich stärkere Phosphorylierung von EmERK, dem ERK-Homolog von *E. multilocularis*, nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte auch der Einbau von Bromdesoxy-Uridin (BrdU) in die DNA des Parasiten nachgewiesen werden [V. Gelmedin, persönliche Mitteilung], was ein Zeichen für Wachstum und Zellteilung ist.

Das dritte Zytokin, dessen Einfluß auf das Wachstum des Parasiten im axenischen Kultursystem untersucht wurde, war BMP2. Während für EGF und Insulin Bedingungen gefunden wurden, die reproduzierbar das Wachstum verschiedener Metacestodenvesikel unabhängig von deren Entwicklungsstand beeinflussten, konnten für BMP2 solche Bedingungen nicht bestätigt werden. Sowohl in dMEM als auch in cMEM wuchsen die eingesetzten Vesikel mit BMP2 gleich, besser oder schlechter. Die Aufschlüsselung dieser Ergebnisse war nicht möglich, da jeweils nur eine Sorte Metacestodenvesikel eingesetzt wurde. In einem Versuchsansatz wurden jedoch parallel sehr junge und etwas ältere Metacestodenvesikel, jeweils ohne Brutkapseln, in Gegenwart von BMP2 kultiviert. Während BMP2 in cMEM-B2 keinen Einfluß auf die jungen Vesikel zeigte lag das Endvolumen der älteren Vesikel 60% unter dem der Vesikel, die ohne BMP2 kultiviert wurden. Zusätzlich enthielten die mit BMP2 kultivierten Metacestodenvesikel erste Brutkapseln, die in den Kontrollvesikeln nicht vorhanden waren. Die deutlich reduzierte Volumenzunahme der älteren Vesikel kann durch die Beobachtung, dass Metacestodenvesikel die Brutkapseln bilden, ihr Wachs-

tum stark einschränken, erklärt werden. Die BMP2-Effekte könnten somit eher in der Stimulation der Differenzierung als einer Stimulation des Wachstums liegen.

Zusammengenommen zeigten diese Arbeiten, dass sich das axenische *in vitro* Kultursystem sehr gut eignet, um Effekte von Wirtsfaktoren auf die Entwicklung von *E. multilocularis* zu untersuchen.

#### 4.2.4 Übertragung der Brutkapselbildung in Metacestodenvesikeln

Im Lebenszyklus des Fuchsbandwurmes leitet die Bildung von Brutkapseln im Metacestoden (2. Larvenstadium) die Differenzierung von Protoscolices (3. Larvenstadium) ein, wobei bisher noch nicht bekannt ist, welche Signale diese Differenzierung auslösen. Im zeitlichen Verlauf einer *in vitro* Kultur von Metacestodenvesikeln konnte beobachtet werden, dass ausgehend von einigen Brutkapseltragenden Vesikeln innerhalb weniger Wochen alle Vesikel der Kultur Brutkapseln enthielten. Das legt den Verdacht nahe, dass die Bildung der Brutkapseln ein gesteuerter Prozess ist, der zu einer zeitgleichen Brutkapselbildung in den Metacestodenvesikeln führt.

Das initiiierende Signal für die Brutkapselbildung muß in Medium (cMEM), das mit Hepatocyten konditioniert wurde löslich vorhanden sein, da axenisch kultivierte Metacestodenvesikel, die dadurch nicht mit den Hepatocyten interagieren konnten, Brutkapseln bildeten. Dieser Faktor ist kälte-labil, da die Brutkapselbildung in frischem konditioniertem Medium deutlich schneller einsetzte als in zuvor bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagertem Medium. Verschiedene Experimente sprechen dafür, dass ein weiterer Faktor existiert, der die Brutkapselbildung auslöst und von brutkapseltragenden Metacestodenvesikeln ausgeschleust wird. Dafür wurde das Medium (cMEM-kon) einer Co-Kultur, in der brutkapseltragende Metacestodenvesikel gemeinsam mit Hepatocyten kultiviert wurden, auf axenisch kultivierte Metacestodenvesikel übertragen, die noch keine Brutkapseln enthielten. Diese Vesikel bildeten deutlich schneller Brutkapseln als die Vesikel der Kontrolle, die in normalem cMEM kultiviert wurden. Ausschlaggebend für die Annahme, dass ein zweiter Faktor existiert, ist die Beobachtung, dass eine rasche Brutkapselbildung einsetzte, obwohl das Medium (cMEM-kon) vorher bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Dementsprechend muß es sich um einen kältestabilen Faktor der Echinokokken handeln. Es könnte aber auch sein, dass während der Co-Kultivierung von brutkapseltragenden Metacestodenvesikeln mit Hepatocyten, so viel des kälte-labilen Hepatocytenfaktors sezerniert wird, dass ausreichend viele funktionell aktive Moleküle die Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  überstehen. Für die Klärung dieser Frage könnte ein weiteres Experiment beitragen. Wenn dabei der Überstand axenisch kultivierter, brutkapseltragender Metacestodenvesikel eine Brutkapselbildung in brutkapselfreien Vesikeln auslöst, kann eindeutig auf einen sezernierten brutkapselbildungsauslösenden Faktor der Echinokokken geschlossen werden und da für humanes BMP2 ein positiver Effekt auf die Brutkapselbildung beobachtet wurde, besteht die Möglichkeit, dass das in *E. multilocularis* gefundene BMP-Homolog (EmBMP1) diesem sekretierten Faktor entspricht.

Fest steht, dass die Übertragung der Brutkapselbildung von brutkapseltragenden auf brutkapselfreie Metacestodenvesikel möglich ist und die Aufklärung der beteiligten Signalkomponenten, die dazu führen von großem entwicklungsbiologischem Interesse sind.

#### 4.2.5 Kultivierung von Echinokokken-Primärzellen

Die Herstellung und die Langzeitkultivierung primärer oder immortalierter Zelllinien parasitärer Helminthen stellte bislang ein ungelöstes Problem dar. Im Fall von *E. multilocularis* scheiterten frühere Zellkultur-Versuche daran, dass co-kultivierte Wirtszellen, wie Hepatocyten oder Fibroblasten, die Zellen des Parasiten überwucherten. Da durch die axenische Kultivierung von Metacestoden-

vesikeln Echinokokken-Material zur Verfügung stand, dass frei von Wirtszellen war, konnten neue Versuche unternommen werden, Echinokokken-Primärzellen zu isolieren und zu kultivieren. Dafür wurden axenisch kultivierte Metacestodenvesikel mechanisch zerstört, mit Trypsin verdaut und die Zellen durch eine Siebung über ein 30µm Netz von den groben Vesikelbestandteilen getrennt. In Hydatidenflüssigkeit axenisch gewachsener Metacestodenvesikel oder in einem Transwellssystem gemeinsam mit Hepatocyten kultiviert, überlebten die so gewonnenen Einzelzellen bis zu 16 Wochen, vermehrten sich und proliferierten. Dabei bildeten die Zellen nach wenigen Tagen globuläre Gewebeaggregate, die innerhalb von 2-3 Wochen stark an Volumen zunahmten und sich schließlich in großen Gewebekomplexen vereinigten. In und an diesen Komplexen bildeten sich verschiedene Vesikel. Innerhalb der Gewebekomplexe entstanden von Zellen umgebene Hohlräume, in welchen sich wiederum Zellstrukturen entwickelten. Diese Strukturen wurden erst nach dem Absterben der Kultur sichtbar und können daher nicht exakt zugeordnet werden. Ihrem Erscheinungsbild entsprechen sie aber weit entwickelten Brutkapseln. Am Rand der Gewebekomplexe bildeten sich kleine, nicht von Zellen umschlossene Vesikel, die morphologisch sehr jungen Metacestodenvesikeln gleichen. Einige dieser Vesikel lösten sich von den Gewebekomplexen und schwammen frei im Medium. Eine weitere Kultivierung dieser Vesikel gelang bisher noch nicht. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich an löslichen, wachstumshemmenden Faktoren, die von dem Primärzell-Gewebe ausgeschleust werden. Dafür spricht ein TransWell-Experiment, in dem Hepatozyten (RH<sup>-</sup>) gemeinsam mit frisch passiertem Echinokokkenmaterial in einen TransWell-Einsatz gegeben wurden und entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit der vesikeltragenden Primärzellgewebe kultiviert wurden. Dabei konnte eine Entwicklung von Metacestodenvesikeln, wie sie für Co-Kultursysteme beschrieben ist, nur in den Ansätzen beobachtet werden, die in Abwesenheit von vesikeltragendem Primärzellgewebe kultiviert wurden. In weiterführenden Experimenten könnten die kleinen Metacestodenvesikel von dem Primärzellgewebe getrennt werden und in einem Transwellssystem in Gegenwart von Fütterzellen zu kultivieren. Sollte das gelingen, besteht in Verbindung mit stabil transfizierten Einzelzellen die Möglichkeit vollständig transgene Echinokokken herzustellen.

Bislang konnte noch nicht geklärt werden, ob diese *in vitro* Generierung von Metacestodenvesikeln dem Prozess entspricht, der bei einer natürlichen Infektion von der Oncosphäre zum Metacestoden führt oder ob es eher die Vesikelneubildung reflektiert, die in Verbindung mit der gut dokumentierten „Metastasierung“ von *E. multilocularis* bei einer bestehenden Infektion zusammenhängt. Da im axenischen Kultursystem bisher stets der Einfluß von Wirtsfaktoren auf bereits bestehende Metacestodenvesikel untersucht wurde, bietet sich dieses Kultursystem an, auch den Einfluß des Wirts auf die Neubildung des Metacestoden zu untersuchen.

#### 4.2.6 Genetische Manipulation von *E. multilocularis*

Die genetische Manipulation parasitärer Helminthen ist zur Zeit noch nicht sehr weit fortgeschritten. Während für Trematoden und Nematoden erste Erfolge erzielt wurden (ballistischer Gentransfer, RNAi [2, 177, 291]), ist für Cestoden bisher noch keine Methode für eine genetische Manipulation beschrieben. Für eine ausführliche molekularbiologische und biochemische Charakterisierungen eines Organismus ist dessen genetische Manipulierbarkeit jedoch von großem Vorteil, da nicht auf heterologe Systeme (z.B. Säugerexpressionssysteme) ausgewichen werden muß, die die tatsächliche *in vivo* Situation nicht widerspiegeln können.

Um eine Methode zu finden, mit der sich *E. multilocularis* genetisch manipulieren lässt, wurden drei verschiedene Ansätze gewählt. Eingesetzt wurden chemische Transfektionsmethoden, die eine transiente Proteinexpression ermöglichen, retrovirale Trägersysteme, über die ein Gen stabil in das Chromosom integriert werden kann und eine Infektion mit Listerien. Dabei konnte durch eine chemische Transfektion erstmals eine erfolgreiche genetische Manipulation für *E. multilocularis*

demonstriert werden. Auch unter Verwendung des retroviralen Systems konnte rekombinant exprimiertes Protein nachgewiesen werden, jedoch in geringer Menge. Um die Ausbeute an rekombinant exprimiertem Protein zu steigern sind jetzt noch Optimierungen beider Systeme notwendig. Dabei steht vor allem der Nachweis und die Optimierung einer stabilen genomischen Integration zusätzlicher Fremdgene in *E. multilocularis* im Vordergrund. Ausgehend von stabil transfizierten Primärzellen, besteht dann die Möglichkeit über die Bildung von Metacestodenvesikeln in einer Primärzell-Kultur, transgene Echinokokken zu erhalten.

Über die Infektion von Echinokokken mit *Listeria monocytogenes* besteht eine weitere Möglichkeit, genetisches Material, aber auch Protein-Faktoren in Echinokokkenzellen zu schleusen. Für den Nachweis, dass Echinokokken mit>Listerien infiziert werden können, wurden bisher nur>Listerien verwendet, die ein GFP-Reporterkonstrukt enthielten. Da die Infektion erfolgreich verlief, können jetzt weitere Konstrukte hergestellt und eingesetzt werden. Ähnlich wie bei den oben beschriebenen Methoden, war jedoch auch hier die Infektionsrate sehr gering und bedarf daher weiterer Optimierungen.

Zusammengefasst konnten in ersten vielversprechenden Experimenten verschiedene Möglichkeiten für eine genetische Manipulation von *E. multilocularis* gezeigt werden, die jetzt noch optimiert werden müssen. Durch verschiedene Vorteile die das Echinokokken-Modell bietet, wie die leicht durchzuführende und ergiebige *in vitro* Kultivierung oder die Möglichkeit, Echinokokken-Primärzellen über einen langen Zeitraum zu kultivieren, ist zu erwarten dass in naher Zukunft entscheidende Fortschritte in der Anwendung dieser Methoden, auch in Bezug auf die Herstellung transgener Echinokokken erzielt werden.

---

## 5 Material und Methoden

---

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Geräte

Brutschränke (Heaeus, Hanau)

DNA-Gelelektrophoresekammer (BioRad, München)

Gel-Dokumentationssystem MidiDOC (Herolab, Wiesloch)

Heizblock, DB-3 (Techne, Cambridge, UK)

Protein-Gelkammern, Minigel-Twin (Biometra, Göttingen)

Schüttelinkubatoren, G25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)

Sequenziergerät, ABI Prism<sup>TM</sup> Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Spannungsgeräte: Power Pack P25 und P24 (Biometra, Göttingen)

Spektrophotometer U-2000 (Hitachi, NY, USA)

Thermocycler: Trio-Thermoblock<sup>TM</sup> (Biometra, Göttingen)

Überkopfschüttler (Renner GmbH, Dannstadt)

Ultraschallgerät: Sonifier<sup>®</sup> II Desintegrator Modell 250 (Branson, Danburg)

Ultra-Turrax T25 (Janke&Kunkel/IKA Labortechnik)

Western-Blotgerät (Phase, Lübeck)

Kühlzentrifuge RC-5B (Heraeus, Hanau)

#### 5.1.2 Verbrauchsmaterial

Blotting-Papier (Schleicher&Schüll, Dassel)

positiv geladene Nylonmembran *porablot NY plus* (Macherey&Nagel, Düren)

0,5 – 2,0 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)

15ml sterile Röhrchen (Greiner, Nürtingen)

50 ml Zentrifugengefäße (Falcon, Heidelberg)

Röntgenfilm Hyperfim<sup>TM</sup>-MP (Amersham, Braunschweig)

Spritzen und Kanülen, steril (Braun Melsungen AG, Melsungen)

Sterilfilter, 150 ml Bottle Top Filter, 0,45 µm (Nalgene, NY)

15 und 50 ml Quickseal<sup>TM</sup> Zentrifugengefäße 25x89 mm (Beckman, München)

### 5.1.3 Enzyme, Reaktionskits und zusätzliche Chemikalien

Agarose NEEO

Aminosäuren, Antibiotika (Sigma, Deisenhofen)

Benchmark™ Prestained Protein Ladder (Life Technologies)

dNTPs lyophilisiert (Roth, Heidelberg)

ECL Chemiluminescence Kit (Amersham Buchler, Braunschweig)

High Fidelity Expand PCR Kit (Roche)

Matchmaker Two Hybrid System 3 (Clontech, Heidelberg)

Agar-Agar, Bacto-Peptonr, Hefeextrakt, Glucose, Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren  
(Difco Laboratories, Augsburg)

PBS Dulbecco ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

PCR-Script™ Cam Cloning Kit

Pfu Turbo Polymerase (Stratagene)

Pierce BCA Protein Assay

Qiagen Plasmid Midi Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAgen  
Gelextraction Kit,

Restriktionsenzyme, DNA modifizierende Enzyme und T4 DNA Ligase (New England  
Biolabs (NEB) Schwalbach)

Titan One Tube RT-PCR System (Roche)

TOPO-TA Cloning®KIT (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Alle Puffer und Lösungen wurden mit einmal destilliertem Wasser angesetzt und anschließend entweder autoklaviert oder steril filtriert. Für die enzymatischen Reaktionen wurde autoklaviertes, doppelt destilliertes Wasser verwendet. Bei Arbeiten mit RNA wurde RNase freies Wasser verwendet.

## 5.2 Arbeiten mit Nucleinsäuren

### 5.2.1 Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration

- Photometrische Konzentrationsbestimmung (Gene Quant pro):

Die Nucleinsäure wird 1: 25 mit dH<sup>2</sup>O gemischt und im Photometer gegen einen Nullwert gemessen. Für DNA oder RNA wird das jeweilige vorinstallierte Programm gewählt.

- Agarosegel-Konzentrationsbestimmung

Die unterschiedlichen Banden der Marker, z.B. SmartLadder (Eurogentec), enthalten eine definierte Menge DNA oder RNA. Durch einen Vergleich der Stärke und der Leucht-Intensität der Banden unter UV-Licht, nach Anfärbung mit Ethidium-Bromid, kann die Konzentration bestimmt werden.

## 5.3 Arbeiten mit RNA

### 5.3.1 Isolierung von RNA

Für die Aufreinigung kleiner Mengen an Gesamt - RNA wird der RNeasy Mini Kit (Qiagen) und für die Isolation von A<sup>+</sup> mRNA der Oligotex mRNA Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers verwendet. Große Mengen an Gesamt-RNA können über die folgende Methode erhalten werden. Die mRNA kann anschließend mit dem Oligotex-Kit (Qiagen) aus der Gesamt-RNA gewonnen werden.

Echinokokken Material wird durch ein Teesieb passiert und anschließend bei 1000 g zentrifugiert. das Pellet wird in 5 vol Guanidin-Thiocyanat-Homogenisierungspuffer (4 M Guanidin-Thiocyanat; 0.1 M Tris, pH 7.5; 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und anschließend gut homogenisiert um die chromosomale DNA zu zerkleinern (mehrmaliges Einsaugen und Ausstoßen mit einer Spritze durch eine 23 gauge Nadel bis die Präparation nicht mehr viskos ist. Natürlich sind auch andere Arten der Homogenisierung möglich.). Nach Zugabe von 0.5% Lauryl-Sarcosin (sodium lauryl sarcosinate) wird das Homogenisat 10' bei 5000 g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Röhrchen überführt. Wie in der folgenden Tabelle beschrieben werden Ultrazentrifugenröhrchen zu etwa 2/3 mit CsCl/EDTA (5.7 M CsCl; 0.01 M EDTA, pH 7.5; DEPC behandelt) befüllt und sehr vorsichtig mit dem Überstand des Homogenisats überschichtet. Die Röhrchen werden an der Stelle des Bodens, an dem das Pellet erwartet wird mit einem Stift markiert, mit Guanidin-Thiocyanat-Homogenisierungspuffer austariert und bei 20°C zentrifugiert.

Rotor	Homogenisat (ml)	CsCl/EDTA (ml)	Zeit (h)	rpm
SW60	1.2	3.1	12	40.000
SW41	3.5	9.7	24	32.000
SW28	12.0	26.5	24	25.000

Nach der Zentrifugation werden die Röhrchen vorsichtig aus dem Rotor genommen und etwa 0.5 cm über dem Boden markiert. Mit einer Pipette wird alles oberhalb dieser Markierung vorsichtig abgenommen. Dieser Teil des Gradienten enthält die als weiße Bande sichtbare chromosomale DNA. Mit einer frischen Pipette wird dann die Flüssigkeit unterhalb der Markierung entfernt (Auf das RNA-Pellet achten). Mit einem glühenden Skalpell wird der Boden des Röhrchens abgeschnitten und die restliche Flüssigkeit abpipettiert. Der Boden des Röhrchens incl. RNA wird mit

70% Ethanol gewaschen und das Pellet dann an der Luft getrocknet. Mit 100 µl bis 1 ml TE/SDS (10 mM TE, pH 7.6; 0.1% SDS) wird das Pellet gelöst und die RNA in ein Eppi überführt. Der Boden wird nochmals mit 25 µl TE (10 mM, pH 7.6) gespült und auch ins Eppi gegeben (schwerlösliche RNA-Pellets 2 mal einfrieren und dann auf 45°C erhitzen). Die RNA wird jetzt aus der RNA Lösung durch Zugabe von 30 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.2), sowie 0.9 ml Ethanol für mindestens 30 min bei 0°C gefällt. Die präzipitierte RNA wird für 10 min bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol an der Luft getrocknet. Dann wird die RNA in wenig Wasser gelöst, mit 3 vol Ethanol gemischt, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Um die RNA einsetzen zu können, wird 3 M Natriumacetat (pH 5.2) bis zu einer Endkonzentration von 0.3 M zugegeben, gut gemischt und 5 min bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert.

Störende Proteinverunreinigungen können durch eine Phenol:Chloroform- und anschließende Chloroform-Extraktion entfernt werden.

Störende DNA kann über einen DNase-Verdau entfernt werden.

Reine mRNA kann mit dem Oligotex Kit (Qiagen) aus der Gesamt-RNA gewonnen werden.

### 5.3.2 Aufreinigung von RNA

RNA Sonden, z.B. für Northern Hybridisierungen, sowie RNA-Fragmente für RNA-interfearence Experimente sowie für die *in vitro* Translation werden mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach der Herstellerangabe aufgereinigt (RNA Cleanup).

Störende DNA Reste werden durch Zugabe von DNase ebenfalls nach Anleitung des Herstellers verdaut.

### 5.3.3 Gelelektrophorese RNA

Prinzipiell kann man RNA auch in einem ganz normalen Agarosegel auftrennen (vergleiche Gelelektrophorese DNA), muß aber für sehr saubere Bedingungen sorgen.

**2xRNA-Laufpuffer:** 5ml Formamid (50%), 1.85 ml Formaldehyd (37%), 1ml 10x MOPS, 400 mg Ficoll 400, 2,15 ml DEPC-H<sub>2</sub>O, eine Spur Bromphenolblau.

#### denaturierende Agarosegele:

Guanidinthiocyanat-Gel:

Agarose entsprechend dem gewünschten Prozentgehalt in 72 ml RNase-freies H<sub>2</sub>O und 5ml 10x MOPS (0.2M MOPS, 0.1 M Na-Acetat, 10 mM EDTA, ad 1l DEPC-H<sub>2</sub>O, einstellen auf pH 7 mit NaOH) geben und aufkochen. Nach Abkühlen auf 50 – 60°C 40µl Guanidinthiocyanat (1M) und 18,7 ml DEPC-H<sub>2</sub>O. Ethidiumbromid zugeben, wenn gewünscht. Lösungen gut mischen und zur Polymerisation sofort in den Gelschlitten füllen. Laufpuffer: 1x MOPS.

Formaldehyd-Gel:

Agarose entsprechend dem gewünschten Prozentgehalt in 90 ml RNase-freies H<sub>2</sub>O (DEPC-H<sub>2</sub>O) und 10ml 10x MOPS (0.2M MOPS, 0.1 M Na-Acetat, 10 mM EDTA, ad 1l DEPC-H<sub>2</sub>O, einstellen auf pH 7 mit NaOH) geben und aufkochen. Nach Abkühlen auf 50 – 60°C 2,7 ml Formaldehyd (37% bzw. 12,3M) zugeben. Ethidiumbromid zugeben, wenn gewünscht. Lösungen gut mischen und zur Polymerisation sofort in den Gelschlitten füllen. Laufpuffer: 1x MOPS.



### 5.3.4 T7 RNA – Transkription (*in vitro*)

*In vitro* Transkription:

Sämtliche kleine GTP-bindene Proteine wurden als 5'-Myc-Fusion in den Vektor pGBKT7 (Clontech) kloniert (5.13.5). Diese Vektoren dienen als Template für die Herstellung von RNA.

Template-Vektor (1µg)	~ 1 µl
Puffer (10 ×)	2 µl
NTP Mix (1mM)	2 µl
T7 RNA Polymerase (40 U)	2 µl
RNAse Inhibitor (20 U)	1 µl
H <sub>2</sub> O RNAse frei)	11 µl
	20 µl

3 Stunden bei 37°C, dann 20 min bei 65°C inkubieren. Aufreinigung der RNA über Qiagen RNeasy Kit. Photometrische Konzentrationsbestimmung.

### 5.3.5 Herstellung von cDNA

Über reverse Transkription kann mit reverser Transkriptase RNA in DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und braucht wie andere DNA-Polymerasen auch, einen Primer von dessen 3'-Ende beginnend die DNA synthetisiert wird. Eukaryontische RNAs enthalten in den meisten Fällen an ihrem 3'-Ende einen poly-A-Schwanz gegen den ein poly-T-Primer gerichtet ist. Typischerweise werden Primer gewählt, die am 5'-Ende eine spezifische Sequenz (z.B. CD3, A37) aufweisen, um eine spätere Amplifikation der cDNA zu erleichtern. Je nach Hersteller kann das Protokoll variieren.

#### Erststrangsynthese:

Bei der Erststrangsynthese wird der komplementäre DNA-Strang der RNA synthetisiert. Dafür werden 4µl RNA, 0.5µl CD3-RT (poly-T Primer) mit 13.5 µl RNAse-freiem Wasser gemischt und 5' bei 70°C inkubiert. Danach kurz zentrifugieren und 2µl 10 RT-Puffer, 2µl dNTPs und 1µl reverse Transkriptase zugeben. 1 Stunde bei 37°C inkubieren.

#### Spliced-Leader-cDNA (SL-cDNA):

Da an den 5'-Enden vieler Transkripte von *E. multilocularis* ein Spliced-Leader mit definierter Sequenz lokalisiert ist können diese Transkripte über eine PCR angereichert werden. Dafür wird eine PCR mit dem Primer EM10-SL (entspricht der Spliced-Leader-Sequenz) und einem für das 3'-Ende spezifischen Primer gefahren. Wurde die Erststrangsynthese über CD3-RT hergestellt, dann enthalten alle cDNAs an ihrem 3'-Ende die CD3-Sequenz. Eine Spliced-Leader-cDNA wird dann mit den Primern CD3 und EM10-SL gefahren (Annealing 57°C, Elongation 72°C, 5 min)

#### SMART-cDNA:

Einige reverse Transkriptasen (z.B. SuperScript2 von Invitrogen, oder PowerScript von BD/Clontech) bilden während der Synthese am 3'-Ende C-Überhänge. Das SMART-Oligonucleotid enthält am 3'-Ende mehrere GTPs oder dGTPs, die mit den überhängenden Cs hybridisieren können. Diese Oligonucleotide werden während der Erststrangsynthese mit in den Ansatz gegeben, wodurch cDNA-Moleküle synthetisiert werden, die ein definiertes 5'-Ende besitzen (vergl. Clontech SMART).

### 5.3.6 Identifizierung von vollständigen mRNAs über 3'-RACE und 5'-RACE

Die Identifizierung der 3'- und 5'-Enden von mRNAs kann über PCR aus cDNA oder plasmidbasierten cDNA-Pools erfolgen. In allen Fällen wird eine PCR mit einem sequenzspezifischen Primer und einem definierten Primer des 5'- oder 3'-Endes gefahren. Bei plasmidbasierten cDNA-Pools sind Vektor-spezifische Primer vorhanden. Bei der Suche in cDNAs kann das 3'-Ende über die Primerpaarung CD3 und seq. spez. Primer erfolgen. Das 5'-Ende kann in SL-cDNAs über einen seq. spez. Primer und EM10-SL erhalten werden. In SMART-cDNAs wird ein seq. spez. Primer und NUP verwendet. Bei undefinierbaren Schmierern oder mehreren Banden kann anschließend eine nested PCR mit Primern, die nach innen versetzt sind den gewünschten Erfolg bringen.

### 5.3.7 Northern-Blot (RNA)

Bei einem Northern-Blot wird RNA von einem Gel auf eine Nylonmembran übertragen und diese mit markierten spezifischen RNA- oder DNA-Sonden hybridisiert.

**Hot Agarose Electrophorese** [9]: Für die in dieser Arbeit durchgeführten Northern-Blots wurde Gesamt-RNA 1:1 mit Formaldehyd-Puffer (40mM HEPES, pH 7.4, 2mM EDTA, pH 8, 4M Formaldehyd, 60% Formamid) gemischt und zur Denaturierung der RNA 5 min bei 75°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Je Tasche wurden 15µg RNA mit 1/6 vol Loading-Puffer (50% Glycerol, 1 mM EDTA, pH 8, Spuren von Bromphenolblau und Xylencyanol) gemischt und in einem 1.2% Agarosegel aufgetrennt. Dafür wurde die gesamte Gelapparatur in einen 50°C-Brutschrank gestellt und sowohl Puffer als auch Gel vorgewärmt. In die Taschen des 50°C warmen Gels wurden dann jeweils 15 µg RNA geladen und mit 5V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

**Northern-Blot:** Für den Blot wird  $20 \times \text{SSC}$  (3M NaCl, 0.3M Na-Citrat, pH 7.0) benötigt. Im nachfolgenden Aufbau wird die Übertragung der RNA auf die Nylon-Membran über Nacht durchgeführt. Gefäß mit  $20 \times \text{SSC}$ , Glasplatte, Docht (in  $20 \times \text{SSC}$  eingeweicht), Gel, Nylon-Membran (kurz eingeweicht in H<sub>2</sub>O), 1 Whatman-Papierzuschnitt (in  $20 \times \text{SSC}$  eingeweicht), 4 Whatman-Papierzuschnitte, 15 cm Lage aus grünen Papier-Tüchern, Glasscheibe, fixiertes fixierendes Gewicht (z.B. Flasche). Am nächsten Tag wird das Gel mit der Membran auf die Membranseite gelegt und mit einem Kugelschreiber durch die Taschen des Gels, die Taschen des Gels auf der Membran markiert. Anschließend wird die Membran vom Gel abgezogen, bei RT an der Luft getrocknet und anschließend unter UV-Einwirkung gecrosslinkt. Diese Membran ist jetzt geschützt und bei RT für längere Zeit lagerbar.

**Herstellung einer Sonde:** Für die Sonde wird ein 600 – 800 bp großes PCR-Produkt amplifiziert und über eine Aufreinigungssäule (Qiagen) gereinigt. 25 ng dieser PCR werden dann für die Herstellung der Sonden mit dem -Prime it II- RANDOM PRIMER LABELING KIT (Stratagene) eingesetzt (vergl A,B,C).

A	B	C
25 ng Template DNA (PCR)	Ansatz A	Ansatz B mit Nucleotide-Removal-Kit (Qiagen) aufreinigen und Sonde vor Hybridisierung 5' kochen.
xx µl H <sub>2</sub> O	+ 10 µl 5× dNTP-Mix (dATP oder dCTP)	
<u>10 µl RANDOM Primer</u>	+5 µl markiertes Nucleotid	
34 µl Ansatz	+1µl Exo (-) Klenow	
5' kochen, 14000 rpm bei RT	50 µl Ansatz	
	10', 37°C – 40°C	

**Hybridisierung:** Die Membran wird in ein 50 ml Greiner-Röhrchen gegeben, dieses dann mit 45 ml auf 65°C erwärmten Monod-Puffer (7% SDS, 0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2, 1mM EDTA) gefüllt und anschließend bei 65°C für 1h im Hybridisierungssofen rotierend geblockt. Danach wird die markierte und aufgekochte Sonde zugegeben und ÜN hybridisiert, wobei um radioaktive Kontaminationen zu verhindern, das Greiner-Röhrchen in ein Glasröhrchen gegeben wird. Der Blot wird dann in ein Glasröhrchen überführt und 1 × kurz und 1 × für 1h in 2 × SSC / 0.1% SDS gewaschen. Anschließend wird der Blot an der Luft getrocknet, auf ein Whatman-Papier gelegt, in Frischhaltefolie eingeschlagen und ÜN auf einen Röntgenfilm gelegt. Um die Größe der erhaltenen Banden abzuschätzen, wird der Blot vermessen und mit den Daten des Größenmarkers verglichen.

## 5.4 Arbeiten mit DNA

### 5.4.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus eukaryontischem Material

Kleine Mengen chromosomaler DNA können mit dem DNeasy Tissue Kit von Qiagen nach beiliegender Anleitung aufgereinigt werden. Größere Mengen an hochmolekularer DNA (100-150 kb) erhält man über die folgende Methode.

Echinokokken Metacestodenmaterial wird durch ein Teesieb passiert und anschließend bei 1000 g 5' zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 vol Extraktionspuffer (10 mM Tris, pH 8; 0.1 M EDTA, pH 8; 20 µg/ml Pancreas-RNase; 0.5% SDS) durch vorsichtiges Schütteln gelöst und 1 h bei 37°C inkubiert. Dann werden 100 µg/ml Proteinase K (Stock 20 mg/ ml H<sub>2</sub>O) in die jetzt viskose Flüssigkeit gerührt und 3 h unter gelegentlichem Rühren bei 50°C inkubiert. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einem vol. Phenol (mit 0.5 M Tris, pH 8 äquilibriert; das ist wichtig, weil sonst die DNA in der Interphase ausfällt) gemischt, indem das Gefäß langsam über Kopf gedreht wird (sollte keine Emulsion entstehen, dann bis zu einer Stunde weiter drehen). Durch eine Zentrifugation, 15' mit 5000g und bei RT, werden die beiden Phasen getrennt. Mit einer Pipette, die eine große Öffnung hat (z.B. 10 ml Plastikpipette) wird die viskose wässrige Phase abgenommen und noch 2 mal mit Phenol extrahiert. Nach der dritten Extraktion wird die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und die DNA mit 0.2 vol 10 M Ammonium-Acetat und 2 vol Ethanol bei RT durch Schwenken präzipitiert. Mit einer umgebogenen Pasteurpipette kann die DNA aus dem Gefäß gefischt werden (notfalls 5' bei 5000 g zentrifugieren). Das Präzipitat wird 2 mal mit 70 %igem Ethanol gewaschen (5', 5000 g zentrifugieren) und das resultierende Pellet dann bei RT getrocknet bis kein Ethanol mehr sichtbar ist (nicht zu viel trocknen, sonst löst sich das Pellet sehr schwer). Anschließend wird TE (pH 8) zu dem Pellet gegeben und die DNA auf einer Wippe zwischen 12 h und 24 h gelöst. Die gelöste DNA wird bei 4°C gelagert und sollte eine A<sub>260</sub> zu A<sub>280</sub> Ratio von größer als 1.75 haben. Niedrigere Werte deuten große Mengen an verunreinigendem Protein an (0.5% SDS zugeben, und wieder am Proteinase K Punkt beginnen).

### 5.4.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli*

Mini-, Midi- und Maxi-Mengen an Plasmid-DNA werden mit den entsprechenden QIAprep Mini-prep und Qiagen Plasmid Purification Kits (Midi, Maxi) nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) aus Bakteriensuspensionen isoliert.

### 5.4.3 Gelelektrophorese DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der elektrischen Auftrennung von DNA-Fragmenten.

Die Konzentration der Agarosegele richtet sich nach der Größe der elektrophoretisch zu trennenden Fragmente – 1%ige Gel trennen Fragmente von 0,5 – 7Kb und 1,5%ige Gele Fragmente von 0,2 – 3Kb. Die gewünschte Agarosemenge wird durch Erhitzen in 1xTAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8,0, 0,11% Essigsäure, ad 1000 ml) gelöst und nach dem Abkühlen auf ungefähr 60°C in einen horizontalen Gelschlitten gegossen. Durch das Einsetzen von Kämmen werden Taschen zum Laden des Gels beim Aushärten ausgespart. Die aufzutragende Probe wird in 6xDNA-Puffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% Saccharose, 30% Glycerin) gelöst und bei ca. 100V bei RT aufgetrennt. Die im Puffer enthaltenen Farbstoffe dienen als Marker der Lauffront. Je nach Agarosekonzentration zeigen sie unterschiedliches Laufverhalten. In einem 1%igen Gel läuft das Xylencyanol entsprechend einem 3kb Fragment und das Bromphenolblau entsprechend einem 300 bp Fragment. Die im Gel aufgetrennte DNA kann mit Ethidiumbromid (2mg/l 1xTAE), das in die DNA interkaliert und bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 302nm Licht emittiert, sichtbar gemacht werden. Aus dem Laufverhalten des eingesetzten Größenmarkes, der DNA-Fragmente definierter Größe und Menge enthält, kann die Größe und die Menge des zu analysierenden DNA-Fragments abgeschätzt werden. Ein gängiger Größenmarker ist die SMART-Ladder von Eurogentec, die Banden von 0,2 – 10 Kb enthält.

### 5.4.4 Aufreinigung von DNA aus Gelen, PCR – und Restriktionsverdau- Ansätzen

Über den QIAquick Nucleotide-Removal-Kit und den QIAquick PCR-Purification-Kit (beide Qiagen) kann DNA aus verschiedenen Ansätzen aufgereinigt werden. Während beim Nucleotide-Removal-Kit auch kleinste DNA-Fragmente isoliert werden können, verliert man beim PCR-Purification-Kit DNA-Fragmente unter 100 bp, z.B. Primer. Die Elution der DNA aus der Säule kann über den mitgelieferten EB-Puffer erfolgen oder z.B. über 1 x Ligase-Puffer und Restriktionsenzym-puffer. Für die Aufreinigung einer DNA aus einem Agarosegel wird der QIAquick Gel-Extraction-Kit (Qiagen) verwendet.

### 5.4.5 DNA-Fällung

Die DNA-Lösung wird in 1/10 Volumen Na-Acetat und 2.5 Volumen 100% EtOH gemischt und die DNA dann für 30 min. bei -70°C gefällt. Anschließend wird 15 min bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen, in der Speedvac getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 5.4.6 PCR

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern), die von Saiki et al 1988 entwickelt wurde [270]. Die konstruierten Primer stellen dazu ein 3'-OH für die Initiation der Synthese der DNA durch die thermostabile DNA-Polymerase bereit. Die Amplifikation findet in speziellen PCR-Caps in einem Thermocycler statt. Neben der zu amplifizierenden DNA, den Primern und der thermostabilen DNA-Polymerase, enthält das Reaktionsgefäß den enzymespezifischen Puffer und dNTPS. Die erste verwendete thermostabile DNA-Polymerase kam aus *Thermus aquaticus* und ist heute die mit am häufigsten genutzte thermostabile DNA-Poylmerase. Sie hat aber den Nachteil, dass sie keine Proofreading-Aktivität besitzt. Aus diesem Grund kommen zunehmend DNA-Enzyme mit dieser Eigenschaft zum Einsatz.

**PCR mit Taq-Polymerase:**

Standard Ansatz 20 $\mu$ l			
1-5 $\mu$ l	Template Plasmid 1:100, chr DNA 1:10 - 1:100, cDNA unverd -1:100)		5-25%
2 $\mu$ l	10 $\times$ Puffer		10%
0,2 $\mu$ l	dNTP-Mix (10mM)		1%
0,2 $\mu$ l	5'-Primer (50 $\mu$ M)		1%
0,2 $\mu$ l	3'-Primer (50 $\mu$ M)		1%
0,2 $\mu$ l	Taq DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l) oder 0,4 U/Kb bei 20 $\mu$ l Ansatz		~1%
Ad 20 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O (Ampuwa)		Rest

	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94°C	3'	
2. Denaturierung	94°C	30"	
3. Annealing	50°C – 65°C (s.u.)	30"	
4. Elongation	72°C	1'/Kb	Goto 2. $\times$ 30
5. Terminale Elongation	72°C	3 - 5 $\times$ t/Elongation	
6. Pause	4°C	$\infty$	

Bestimmung der Annealing-Temperatur :

1.  $T_m = 4^\circ\text{C} (G+C) + 2^\circ\text{C} (A+T)$
2.  $T_m = 58^\circ\text{C}$  klappt meistens, vor allem wenn die Primer geschickt gewählt wurden
3.  $T_m$ : steht auf dem Lieferschein oder dem Gefäß!

**PCR mit Proofreading-Polymerasen:**

Proofreading DNA-Polymerasen haben eine 3' – 5' Exonucleaseaktivität, daher können sie im Gegensatz zur Taq Polymerase falsch eingebaute desoxy-Nucleotide wieder entfernen. Neben reinen Proofreading Enzymen, wie der Pfu DNA Polymerase werden oft auch proofreading-Polymerase/Taq-Polymerase-Gemische verwendet (z.B. TripleMaster von Eppendorf), die die hohen Produktausbeuten der Taq Polymerase mit der geringen Fehlerhäufigkeit der proofreading- Enzyme kombinieren. In dieser Arbeit wurden die folgenden DNA-Polymerasen oder DNA-Polymerasegemische verwendet und nach der jeweiligen Gebrauchsanweisung verwendet.

Verwendete Polymerasen: Pfu (Promega), Pfu-Turbo (Promega), TripleMaster (Eppendorff), Hercules (Stratagene), Expand (Stratagene), Expand long (Stratagene), Phusion (Finnzymes oder NEB)

**5.4.7 degenerative PCR**

Die degenerative PCR ist eine Methode um Gene zu identifizieren, die in anderen Organismen homolog vorhanden, im eigenen Organismus jedoch noch unbekannt sind. Je konservierter ein Gen ist, desto einfacher ist es, geeignete Primer zu finden. Im ersten Schritt werden Aminosäure-Sequenzvergleiche der gesuchten Protein-Faktoren verschiedenen Ursprungs erstellt. In hoch konser-

vierten Regionen sind in vielen Fällen einzelne Aminosäuresequenzen zwischen den verschiedenen Faktoren identisch. Aus diesen Bereichen werden degenerierte Oligonucleotide bestimmt, mit welchen dann eine PCR gefahren wird. Degenerierte Oligonucleotide haben keine vollständig definierte Sequenz, sondern können sich an verschiedenen Positionen unterscheiden. Ein Beispiel ist der degenerierte Primer ER-DGM aus der Sequenz des EGF-Rezeptors *emer* (Abb 122). Mit verschiedenen degenerierten Primern wird anschließend eine PCR auf cDNA gefahren und die erhaltenen Produkte kloniert und sequenziert. Mit etwas Glück ist auch der gesuchte Faktor dabei.

SER	A	E	Q	I	A	D	G	M	S	<p>Abb. 122: Hochkonservierter Aminosäurebereich von EGR-Tyrosinkinase-Domänen verschiedener Organismen.</p> <p>Gezeigt ist der Teil eines Sequenzvergleichs zwischen EGR-Tyrosinkinase-Domänen verschiedener Organismen in dem die hoch konservierten Aminosäurebereiche liegen über deren Sequenz die degenerierten Primer ermittelt wurden. Angegeben ist neben der AS-Sequenz die Sequenz und die Namen der Primer. Die AS-Sequenzen stammen von EGF-Rezeptoren aus <i>S. mansoni</i> (SER; [287]), <i>D. melanogaster</i> (DER; [194]), <i>C. elegans</i> (LET; [16]) und <i>H. sapiens</i> (HER; [319]).</p>
DER	S	T	Q	I	A	K	G	M	S	
LET	C	Y	Q	I	A	S	G	M	Q	
HER	C	V	Q	I	A	K	G	M	N	
			E	Q	I	A	D	G	M	
	5'-GAGCAGATTTCGNGAYGGNATG-3'									
degen.										
Primer:	ER-DGM									

#### 5.4.8 RT-PCR

Prinzipiell ist eine RT-PCR eine PCR in der cDNA als Template verwendet wird (RT beschreibt in diesem Zusammenhang den Schritt der reversen Transkription). Neben vielen Standard-Anwendungen, die zum Beispiel zur Identifikation von 3'- und 5'-Enden von mRNAs (RACE) führen, kann die RT-PCR für einen quantitativen Nachweis verschiedener mRNA-Transkripte in unterschiedlichen Proben eingesetzt werden. Will man nun zum Beispiel die unterschiedliche Expression eines Faktors in Zyste und Protoscolex überprüfen kann das über eine RT-PCR erfolgen. Im ersten Schritt wird die mRNA beider Proben in cDNA umgeschrieben. Dann wird mit spezifischen Primern eine PCR mit verminderter Zyklenzahl sowohl auf den zu untersuchenden Faktor, als auch auf ein „housekeeping-Gen, das in beiden Proben gleich stark exprimiert wird, gefahren. Nach einem Abgleich des housekeeping-Gens beider Proben, kann im Unterschied der beiden Faktorproben auf deren mRNA-Expression geschlossen werden.

#### 5.4.9 kompetitive PCR

Die kompetitive PCR eignet sich wie die RT-PCR zum quantitativen Nachweis von mRNAs verschiedener Proben und macht einen Vergleich der mRNA-Expression gegen eine bekannte Menge an Plasmid-DNA möglich. Spezifische Primer gegen eine cDNA ergeben in der PCR ein Produkt von definierter Größe (z.B. 300 bp). Ein Kompetitor enthält am 3'- und 5'-Ende die für die cDNA spezifischen Primerbindungsstellen, dazwischen jedoch ein längeres Fragment (z.B. 400 bp). Mischt man jetzt Kompetitor und cDNA, dann erhält man in einer PCR zwei Fragmente, das der cDNA und das des Kompetitors.

Im ersten Schritt der kompetitiven PCR wird auch hier aus der mRNA einzelsträngige cDNA hergestellt. Konstante Mengen dieser einzelsträngigen cDNAs werden mit verschiedenen Verdünnungen eines Kompetitors gemischt und in einer PCR mit einer niedrigen Zyklenzahl (25x) amplifiziert. Nach dem Auftrennen in einem Agarosegel kann die Menge an cDNA (mRNA) des gesuchten Faktors über die eingesetzte Menge an Kompetitor bestimmt werden.

#### 5.4.10 Klontest – PCR (*E.coli* und Hefen)

In 0.5 ml Eppis werden 30 µl H<sub>2</sub>O vorgelegt. Mit jeweils einer sterilen gelben Spitze wird je eine Kolonie gepickt und samt Spitze in eines der vorbereiteten Eppis gestellt. Auf einem Schüttler werden die Eppis samt Spitzen für etwa 5-10 min geschüttelt (dabei lösen sich die Bakterienaggre-

gate im Wasser und können in der PCR eingesetzt werden. Bei ursprünglich großen Kolonien reicht 1µl auf einen 20µl Standard PCR Ansatz, bei sehr kleinen Kolonien können bis zu 5 µl eingesetzt werden. Die restliche Klonsuspension kann über mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden um zu einem späteren Zeitpunkt positive Klone auszustreichen.

Alternativ können kleine Mengen der Kolonie auch direkt in den PCR – Ansatz gegeben werden (Klone mit gelber Spitze picken, dann mit PCR-Ansatz resuspendieren)

Vorsicht: nicht zuviel Bakteriensuspension einsetzen! Viel hilft trügt!

#### 5.4.11 PCR-basierte Mutagenese

Die Mutation wird über Oligonucleotide eingeführt, das gesamte Plasmid über PCR amplifiziert und anschließend das Template-Plasmid mit DpnI verdaut.

##### 1. Primerdesign:

- 25 - 45 Basen
- $T_m > 78^\circ\text{C}$
- $T_m = 81.5 + 0.41 (\% \text{ GC}) - 675 / N - \% \text{ Mismatch}$   
N = Primerlänge in Basen  
% = nur Zahlenwert einsetzen
- links und rechts der Mutationsstelle mindestens 10 – 15 Basen
- GC – Gehalt mindestens 40%
- am 3' – Ende der Primer mehrere G oder C

##### 2. Mutations – PCR mit Pfu, PfuTurbo oder einer anderen proofreading Polymerase

Polymerase erst am Schluß direkt vor der PCR zugeben, oder auf Eis ansetzen.

Wenn es nicht klappt, evtl. verschiedene Mengen Template testen.

Vektor 5 ng)	x µl	Primer bei 50 µmolarer Lösung:
Primer 1 (62 ng)	y µl	$x \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} = 50 \times \text{Wert } \mu\text{g} / \text{Wert nmol}$
Primer 2 (62 ng)	y µl	
dNTPs	0.5 µl	$y \mu\text{l Primer} = 62 \text{ ng} / x \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$
10 × Puffer	2.5 µl	
(Quick Solution)	fakultativ 1.5 µl	
dH <sub>2</sub> O	x µl	
	<hr/>	
	25 µl	

PfuTurbo (1.5 U) + 0.5 µl

##### 3. PCR Programm:

je nach verwendeter Polymerase muß während der Elongation auf Temperatur und Zeit geachtet werden.

1. Initiale Denaturierung 95°C 1 min

2. Denaturierung	95°C	50 sec	
3. Annealing	60°C	50 sec	
4. Elongation	68°C (72°C)	2 min / Kb	Goto 2. ×18
5. Terminale Elongation	68°C (72°C)	7 min	
6. Pause	4°C	∞	

4. 0.5µl Dpn1 (10U/µl) direkt in jede Mutations – PCR, 3 Stunden bei 37°C inkubieren und danach in *E.coli* transformieren.
5. Auf die erhaltenen Klone wird eine Test – PCR mit flankierenden Primern gefahren, diese mit dem QIAquick Kit aufgereinigt und zum Nachweis einer erfolgreiche Mutation sequenziert.

#### 5.4.12 Herstellung von Proteinchimären über PCR

Prinzipiell ist es möglich Chimären aus verschiedenen DNAs über Verdau und Ligation herzustellen. Eine weitere Möglichkeit bietet die PCR-basierte Herstellung. Dafür werden im ersten Schritt die gewünschten Fragmente über PCR amplifiziert. Die Primer werden so gewählt, dass sich 20 Basen überschneiden. Im zweiten Schritt werden die aufgereinigten PCR-Fragmente mit den gewünschten 3'- und 5'-Primern in einer PCR eingesetzt. Das Ergebnis sind PCR-Fragmente in welchen auch die überlappenden Regionen hybridisiert haben.

#### 5.4.13 DNA Sequenzierung

Für die DNA Sequenzierung werden je Ansatz 400 ng Plasmid-DNA oder 100 ng PCR-DNA aufgereinigt eingesetzt (QIAquick PCR Purification Kit). Dazu werden 5 nM Primer und 2µl DNA sequencing Kit (ABI) zugegeben (Gesamtansatz 10 µl). Nach einer PCR (25x, 96°C: 10", 45°C – 60°C: 5", 72°C: 1') wird die Sequenzier-PCR über die Sequenziergeräte 310 und 377 von Perkin Elmer aufgetrennt und die Sequenz bestimmt.

#### 5.4.14 Enzymatischer Verdau von DNA

Bei einem enzymatischen Verdau werden chromosomale DNA, Plasmid DNA oder PCR Produkte an spezifischen Sequenzen von Restriktionsenzymen gespalten. Im Prinzip wird DNA mit H<sub>2</sub>O, Puffer und Enzym gemischt und bei einer, für die optimale Wirkung des Enzyms nötigen Temperatur für 1 – 24 Stunden inkubiert. In vielen Fällen kann das verwendete Enzym anschließend hitzeinaktiviert werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme stammen von NEB und wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Wichtig: Vor dem Einsatz eines Enzyms zuerst im NEB-Katalog (oder an anderer Stelle) nachschlagen. Kummer lässt sich vermeiden, wenn man im Vorfeld nach Dam-Phosphorylierungen, Reaktionstemperaturen, Reaktionszeiten und ähnlichem sieht.



### 5.4.15 Ligation

Bei der Ligation werden DNA – Fragmente miteinander verbunden. Verwendet werden T4-DNA-Ligase und Quick-Ligase (beide NEB).

$$1. X = \text{Vektor (bp)} / \text{Insert (bp)}$$

X beschreibt das Größenverhältnis zwischen Insert und Vektor

$$2. Y = 100\text{ng} \times 3 / X$$

Y ist die Menge an Insert in ng, die zu 100 ng Vektor zugegeben werden muß. Normalerweise werden auf einen Vektor 3 Inserts gegeben (Vektor : Insert = 1 : 3)

$$3. \text{Errechnung der } \mu\text{l die eingesetzt werden müssen. (Wichtig: davor die DNA-Konzentration von Vektor und Insert photometrisch oder über ein Agarosegel bestimmen konz. = ng/\mu\text{l})$$

$$\text{Vektor } \mu\text{l} = 100 \text{ ng} / \text{konz. Vektor}$$

$$\text{Insert } \mu\text{l} = Y \text{ ng} / \text{konz. Insert}$$

#### 4. Ligation

Ligation mit T4 DNA-Ligase

Vektor (100ng)      Vektor  $\mu\text{l}$

Insert Y ng)      Insert  $\mu\text{l}$

10  $\times$  Ligase Puffer    2 $\mu\text{l}$

T4 DNA - Ligase    1  $\mu\text{l}$

dH<sub>2</sub>O                    x  $\mu\text{l}$

20  $\mu\text{l}$

Ligation mit Quick Ligase (NEB)

Vektor (100ng)      Vektor x  $\mu\text{l}$

Insert (Y ng)      Insert x  $\mu\text{l}$

5  $\times$  Quick Ligase Puffer    2 $\mu\text{l}$

Quick Ligase      0.5  $\mu\text{l}$

dH<sub>2</sub>O                    x  $\mu\text{l}$

10  $\mu\text{l}$

Ansatz 4 – 16 Stunden bei 16°C inkubieren, dann transformieren.

Ligationsreaktion: 5 min bei RT, dann Transformation.

$$5. \text{Sollte die Konzentration an Vektor oder Insert zu gering sein, d.h. man müsste mehr als 5 } \mu\text{l einsetzen, dann kann man die einzusetzende Menge herunterrechnen ohne das wichtige 3 : 1 Verhältnis zu ändern (für Quick-Ligase).}$$

$$Z = 5 \mu\text{l} / (\text{Vektor } \mu\text{l} + \text{Insert } \mu\text{l})$$

$$\text{Vektor } \mu\text{l} \times Z = \mu\text{l Vektor neu}$$

$$\text{Insert } \mu\text{l} \times Z = \mu\text{l Insert neu}$$

### 5.4.16 TA-Klonierung und Topo-TA-Klonierung (Invitrogen)

Taq DNA Polymerase hängt während der Amplifikation A-Überhänge an die 3'-Enden der DNA-Fragmente. Besonders wichtig ist die Wahl der Primer, die an ihrem 5'-Ende ein G, aber auf keinen Fall ein T, enthalten sollen. Auch blunt-end DNA-Fragmente die mit einer Proofreading-Polymerase hergestellt oder durch einen Restriktionsverdau erhalten wurden, können durch Inkubation in einem Taq-PCR-Ansatz mit überhängenden Adeninen versehen werden (Inkubation bis zu 30

min). Die PCR kann direkt oder aufgereinigt eingesetzt werden. Sind mehrere PCR-Fragmente sichtbar, dann muß die gewünschte Bande aus dem Gel eluiert werden (Qiagen Gel Extraction Kit), vor allem wenn unter der gewünschten Bande kleinere sind (diese werden bevorzugt eingebaut). Eine sehr einfache, schnelle und spezifische Methode ist, die PCR-Fragmente sehr sauber aus dem Gel zu schneiden, in einem Eppendorff-Gefaß bei  $-20^{\circ}\text{C}$  einzufrieren und dann während dem Auftauen mit einer gelben Spitze zu zerquetschen. Dabei wird etwas Flüssigkeit (2-8  $\mu\text{l}$ ) aus dem Gel gedrückt, welche direkt eingesetzt werden kann.

Die DNA mit den A-Überhängen wird dann in den verschiedenen TA- und TOPO-TA-Systemen (Qiagen, Invitrogen) nach den Angaben der Hersteller eingesetzt, wobei die TA-Klonierung eine klassische T4-Ligase-Ligation ist, während im TOPO-TA-System eine Topoisomerase die DNA-Stränge verbindet.

#### 5.4.17 Southern-Blot (chr DNA)

Im Southern-Blot wird eine, auf einer Membran fixierte, DNA mit einer markierten Sonde hybridisiert. Der Southern-Blot besteht daher aus den drei Arbeitsschritten, Vorbereitung und Übertragung der DNA auf eine Membran, Herstellung einer Sonde (Wichtig: ist  $[\text{P}^{32}]$ - $\gamma\text{dATP}$  oder  $[\text{P}^{32}]$ - $\gamma\text{dCTP}$  bestellt) und Hybridisierung mit anschließender Visualisierung.

**Vorbereitung und Übertragung der DNA auf eine Membran:** Chromosomale DNA wird mit Restriktionsenzymen nach Anleitung der Hersteller verdaut und jeweils 20  $\mu\text{g}$  dieser Verdauung je Tasche auf ein 0.8 % Agarosegel aufgetragen und bei 80 V aufgetrennt. Das Gel wird anschließend in Ethidiumbromid gefärbt und photographiert, wobei mit einem Lineal die Größe des Gels in Verbindung mit dem DNA-Größenmarker festgehalten wird. Eine andere Möglichkeit ist, auf das Gel eine durchsichtige Plastikfolie zu legen und dann darauf die Größe und die Markerpositionen einzuzeichnen.

Das Gel wird jetzt in eine Wanne gelegt und auf einer Wippe 15 min gut bedeckt in Lösung 1 (0.25 N HCl; 11 ml 25% HCl / 300 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) inkubiert. Darauf folgen 2 Waschschrte für je 15 min in Lösung 2 (20 g NaOH, 87.7 g NaCl, ad 1l  $\text{H}_2\text{O}$ ) und anschließend 2 Waschschrte für je 30 min in Lösung 3 (121 g Tris, 26 g NaCl, ad 1l  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Für den Blot wird  $20 \times \text{SSC}$  (3M NaCl, 0.3M Na-Citrat, pH 7.0) benötigt. Im nachfolgenden Aufbau wird die Übertragung der DNA auf die Nylon-Membran über Nacht durchgeführt. Gefäß mit  $20 \times \text{SSC}$ , Glasplatte, Docht (in  $20 \times \text{SSC}$  eingeweicht), Gel, Nylon-Membran (kurz eingeweicht in  $\text{H}_2\text{O}$ ), 1 Whatman-Papierzuschnitt (in  $20 \times \text{SSC}$  eingeweicht), 4 Whatman-Papierzuschnitte, 15 cm Lage aus grünen Tüchern, Glasscheibe, fixiertes fixierendes Gewicht (z.B. Flasche). Am nächsten Tag das Gel mit der Membran auf die Membranseite gelegt und mit einem Kugelschreiber durch die Taschen des Gels, die Taschen des Gels auf der Membran markiert. Anschließend wird die Membran vom Gel abgezogen, bei RT an der Luft getrocknet und anschließend unter UV-Einwirkung gecrosslinkt. Diese Membran ist jetzt geschützt bei RT für längere Zeit lagerbar.

**Herstellung einer Sonde:** Für die Sonde wird ein 600 – 800 bp großes PCR-Produkt amplifiziert und über eine Aufreinigungssäule (Qiagen) gereinigt. 25 ng dieser PCR werden dann für die Herstellung der Sonden mit dem -Prime it II- RANDOM PRIMER LABELING KIT (Stratagene) eingesetzt (vergl A,B,C).

A	B	C
25 ng Template DNA (PCR) xx µl H <sub>2</sub> O <u>10 µl RANDOM Primer</u> 34 µl Ansatz  5' kochen, 14000 rpm bei RT	Ansatz A + 10 µl 5× dNTP-Mix (dATP oder dCTP) +5 µl markiertes Nucleotid <u>+1µl Exo (-) Klenow</u> 50 µl Ansatz  10', 37°C – 40°C	Ansatz B mit Nucleotide-Removal-Kit (Qiagen) aufreini-gen und Sonde vor Hybridisierung 5' kochen.

**Hybridisierung:** Die Membran wird in ein 50 ml Greiner-Röhrchen gegeben, dieses dann mit 45 ml auf 65°C erwärmten Monod-Puffer (7% SDS, 0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2, 1mM EDTA) gefüllt und anschließend bei 65°C für 1h im Hybridisierungssofen rotierend geblockt. Danach wird die markierte und aufgekochte Sonde zugegeben und ÜN hybridisiert, wobei um radioaktive Kontaminationen zu verhindern, das Greiner-Röhrchen in ein Glasröhrchen gegeben wird. Der Blot wird dann in ein Glasröhrchen überführt und 1 × kurz und 1 × für 1h in 2 × SSC / 0.1% SDS gewaschen. Anschließend wird der Blot an der Luft getrocknet, auf ein Whatman-Papier gelegt, in Frischhaltefolie eingeschlagen und ÜN auf einen Röntgenfilm gelegt. Um die Größe der erhaltenen Banden abzuschätzen, wird der Blot vermessen und mit den Daten des Größenmarkers verglichen.

#### 5.4.18 virtueller Northern-Blot (cDNA)

Im virtuellen Northern-Blot wird die RNA-Expression über die aus ihr hergestellte cDNA bestimmt. Diese Methode eignet sich vor allem bei sehr geringen RNA-Ausgangsmengen, die für einen klassischen Northern-Blot nicht ausreichen. Der gesamte Versuchsaufbau entspricht dem Southern-Blot (Kapitel 5.4.17). Im Versuchsablauf wird zuerst aus der zu untersuchenden RNA wie unter 5.3.5 beschrieben cDNA hergestellt und davon dann 500 ng je Spur eingesetzt.

## 5.5 Arbeiten mit Proteinen

### 5.5.1 Gelelektrophorese mit Proteinen

Proteingemische können in einem Poly-Acrylamid-Gel (PAA-Gel) größenspezifisch aufgetrennt werden. Es existieren verschiedene Versuchsanordnungen, um die Proteine nativ oder denaturierend (Puffer mit SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufzutrennen. Ein Gel zur Auftrennung von Proteinen besteht aus zwei Teilen: einem Sammelgel, in dem die Proteine konzentriert werden und einem Trenngel, in dem die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Für Proteine mit einem MG von 10-60 kDa eignen sich 15% Trenngele, einem MG von 30-120 kDa eignen sich 10% Trenngele und einem MG von 50-200 kDa eignen sich 8% Trenngele. 18% Trenngele, die 7-8 M Harnstoff enthalten eignen sich für sehr kleine Proteine von 1,5 – 10 kDa.

#### Arbeitslösungen:

- 30% Acrylamid-/0.8% bis-Acrylamid-Lösung (AA-Lsg)
- 4x Lower-Tris (für Trenngel): 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS
- 4x Upper-Tris (für Sammelgel): 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS
- TEMED
- 10% APS: 0.5g Ammonium-Persulfat in 5 ml H<sub>2</sub>O
- Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM Glycin, 0.1% SDS
- 5x Sample-Puffer: 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% Glycerol, 2% SDS, 14.4 mM  $\beta$ -ME, 0.1% Bromphenolblau
- 2x Stop-Mix: 250 mM Tris-HCl, pH 6.8 (10 ml), Glycerol (4 ml), 20% SDS (4ml),  $\beta$ -ME (2 ml), kleiner Krümel Bromphenolblau

#### PAA-Gel:

Trenngel	5%	7.5%	10%	12%	15%	17.5%
30% PAA-Lsg (ml)	4	6	8	10	12	14
4x Lower-Tris (ml)	6	6	6	6	6	6
H <sub>2</sub> O (ml)	14	12	10	8	6	4

Die Polymerisation erfolgt nach Zugabe von 40 $\mu$ l TEMED und 120  $\mu$ l APS (mindestens 30 min, bei RT bis 40°C)

Sammelgel: 1.5 ml PAA-Lsg, 2.5 ml 4x Upper-Tris, 6.5 ml H<sub>2</sub>O. Die Polymerisation erfolgt nach Zugabe von 40 $\mu$ l TEMED und 70  $\mu$ l APS (Vorsicht, polymerisiert sehr schnell!)

#### Ablauf:

Nach der Herstellung des Gels wird dieses in einer Elektrophoresekammer fixiert und diese mit Elektrophorese-Puffer gefüllt bis über die Taschen des Gels befüllt. Die proteinhaltigen Proben werden in 5x Sample-Puffer (oder 2X StopMix) aufgenommen, 3 min aufgeköcht (manche Proteine vertragen das nicht, dann 5' 40°C), 1' bei 14.000 rpm zentrifugiert und in die Taschen des Gels geladen. Anschließend wird bei 135-200 V (40-100 mA) elektrophoriert.

### 5.5.2 Färbung eines Protein-PAA-Gels mit Coomassie-Blue

Nach der Gel-Elektrophorese wird das Gel für 10-20' in Coomassie-Färbelösung (1g Coomassie Blue R-250, 450 ml Methanol, 450 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml Eisessig) gelegt und gewippt. Anschließend wird das Gel mit Coomassie-Entfärber (100 ml Methanol, 100 ml Eisessig, 800 ml H<sub>2</sub>O) entfärbt. Gibt man in die Entfärbelösung zusätzlich ein Papiertuch, kann dieser Vorgang beschleunigt werden. Noch schneller geht es in der Mikrowelle.

### 5.5.3 Nachweis von Proteinen über Western – Blot

**Semi-Dry-Methode:** 5 Whatman-Papiere werden in Western-Blot-Puffer (3.06 g Tris, 14.4 g Glycin, ad. 800 ml H<sub>2</sub>O, + 200 ml MeOH) eingeweicht und auf die semi-dry Western-Blot-Apparatur gelegt. Mit einem Glasröhrchen werden Luftblasen entfernt. Auf diese Lage wird das PAA-Gel mit den aufgetrennten Proteinen gelegt. Darauf wird zuerst eine, in Western-Blot-Puffer eingeweichte, Nitrocellulosemembran gelegt und darauf wieder 5 in Western-Blot-Puffer eingeweichte Whatman-Papiere. Anschließend werden wieder störende Lufteinschlüsse entfernt, der Deckel auf die Apparatur gelegt und die Proteine bei ~ 200 mA aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

Nach dem Blotten sollten die Banden des Markers deutlich auf der Nitrocellulosemembran zu sehen sein. Die Proteine können auf der Nitrocellulosemembran über eine Ponceau-Färbung sichtbar gemacht werden. Dafür wird die Membran für wenige Minuten in Ponceau-Färbelösung (0,2 % Ponceau S, 3 % TCA, in H<sub>2</sub>O) gegeben. Der Farbstoff kann anschließend über mehrere Waschschritte mit 1x TBB (100mM NaCl, 10mM Tris, pH 7.5, 0.1% Tween20) oder 1x PBS wieder entfernt werden.

Der Nachweis von Proteinen erfolgt über spezifische Antikörper (Sämtliche Inkubations- und Waschschritte erfolgen auf einer Wippe. In den meisten Fällen führt TBB (100mM NaCl, 10mM Tris, pH 7.5, 0.1% Tween20) und Magermilch zu den schönsten Ergebnissen). Zuerst wird die Membran für 1 Stunde geblockt. Dabei binden Proteine (Magermilch, BSA, Top-Block, Gelatine o.ä.), die dem Blocking-Puffer (TBB oder PBS + 3-5% Proteinzusatz) an die unbesetzten Stellen der Membran. Anschließend wird der erste, proteinspezifische Antikörper in TBB oder PBS über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran 3 x für 10' mit TBB oder PBS gewaschen und ein zweiter Antikörper, der spezifisch für den ersten Antikörper ist, in TBB oder PBS aufgenommen und für 1 Stunde auf die Membran gegeben. Nach der Inkubation wird wieder 3x für je 10' mit TBB oder PBS gewaschen. Der zweite Antikörper ist mit alkalischer Phosphatase oder mit POX (horseradish peroxidase) gekoppelt. Der Nachweis des gesuchten Proteins erfolgt über diese gekoppelten Faktoren.

**Alkalische Phosphatase:** Für den Nachweis mit alkalischer Phosphatase wird der Blot 10 min mit 0.1 M Tris pH 9.6 gewaschen, in Substratlösung (siehe unten) geschwenkt, bis die Banden die gewünschte Intensität erreicht haben und anschließend 3x mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

Substratlösung: 9 vol 0.1 M Tris pH 9.6  
 1 vol NBT-Lösung (50 mg NBT in 50 ml H<sub>2</sub>O)  
 0.1 vol Indolyl-Lösung (50 mg Indolyl in 10 ml DMF)  
 0.02 vol 2M MgCl

**POX:** Die Membran wird mit der Entwicklungsflüssigkeit des ECL-Kits (Amersham) für 1' inkubiert, anschließend mit einer Frischhaltefolie eingeschlagen und für 30 sec bis 30 min auf einen Röntgenfilm gelegt.

### 5.5.4 Herstellung von proteinhaltigen Lysaten

Proteinhaltige Lysate werden für verschiedene Anwendungen, wie z. B. die Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine aus *E. coli* oder Immunpräzipitationen benötigt. Prinzipiell können Zellen so aufgeschlossen werden, dass die Proteine in ihrer nativen Form oder in einer denaturierten Form vorliegen. Dafür werden die Zellen in einem Puffer aufgenommen und über verschiedene Methoden lysiert oder zerstört. Nach einer abschließenden Zentrifugation erhält man ein Pellet, das die unlöslichen Bestandteile enthält (manchmal auch genau die, die man haben möchte) und einen Überstand, in dem die löslichen Proteine enthalten sind.

Die folgenden Puffer eignen sich für die Herstellung von Proteinlysaten, in welchen die Proteine in ihrer nativen Form vorliegen. Dabei können je 1 ml Puffer bis zu  $1 \times 10^7$  Säuger- und Insektenzellen oder bis zu  $1 \times 10^9$  *E.coli*- und Hefe-Zellen eingesetzt werden. Dafür wird das Zellpellet in dem Puffer aufgenommen, resuspendiert und dabei lysiert. Manchmal ist es sinnvoll, das Gemisch bis zu einer Stunde auf einem Über-Kopf-Rotor zu drehen oder auf andere Weise in Bewegung zu bringen. Da Proteinase vorhanden sein können, empfiehlt sich, bei 4°C zu arbeiten (außer D). Schwer lösliche Pellets oder Zelllysate, die ohne Detergenz hergestellt werden sollen, werden über das Fast-Prep-System (QBiogene) mechanisch lysiert oder mittels Ultraschall geknackt (z.B. Gesamtlarvenantigen). Nach der Lyse wird 20 min bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wird vorsichtig in ein steriles Gefäß überführt und auf Eis gestellt (bei der Suche nach bestimmten Proteinen, wie z.B. Membranproteinen, schadet es nicht, auch das Pellet zu testen). Die Herstellung von Gesamtlarvenantigen und anderen Echinokokkenextrakten ist in Kapitel 5.9.4 genauer beschrieben.

A) RIPA - Buffer (150 mM NaCl, 1% NP 40, 0.5% Deoxycholat (DOC), 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 7.5)

B) NP 40 oder Triton X 100 Lysis Buffer (150µM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 1% Nonidet P 40 oder Triton X 100)

C) Coli-Extraktionspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.2, 40 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% Na-Deoxycholat)

D) *E. coli*-Lysat mit Lysozym: Das Bakterienpellet wird in 3 ml TE-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH8) je Gramm Pellet aufgenommen und auf 20 -37°C erwärmt. Je ml Suspension werden 200 µg Lysozym gegeben und der gesamte Ansatz 10 -20 min bei 20 - 37°C leicht geschwenkt. Eine Zugabe von 2 mg Lysozym je Gramm Pellet ermöglicht die Lyse bei 4°C in etwa 5 min.

In jeden Puffer können noch Proteinaseinhibitoren (z.B. von Roche), 0.5 mM PMSF, 0.1% SDS (stört evtl. in nachfolgenden Schritten) und 1 mM aktiviertes Na-Orthovanadat (Tyrosinphosphatase-Inhibitor) zugegeben werden.

**Denaturierende Puffer:** Häufig lassen sich Proteine nur sehr schwer in Lösung bringen. Wenn in den folgenden Anwendungen kein aktives Protein benötigt wird (z.B. bei der Herstellung von Antikörpern) eignet sich die Herstellung eines Lysates mit einem denaturierendem Puffer. Eine Erhöhung der SDS-Konzentration in den oben genannten Puffern auf 1% und eine Erwärmung ermöglicht häufig die Solubilisierung. Verschiedene Aufreinigungssysteme, wie z.B. His-Tag/Nickel-Granulat sind sehr unempfindlich gegenüber denaturierenden Substanzen.

Lysepuffer für die denaturierende Aufreinigung von His-getagten Proteinen: 6M Guanidin-HCl, pH 7.8

### 5.5.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

**Photometrische Bestimmung bei  $A_{280}$ :** Die Proteinlösung wird gegen den Lysepuffer (0-Wert) bei  $A_{280}$  gemessen. Eine Absorption von 1.0 in einer 1 cm-Küvette entspricht ungefähr 1 mg Protein pro ml. Diese Methode ist auf der einen Seite sehr schnell durchzuführen, aber auch sehr ungenau, da die ermittelte Proteinmenge von der Menge an Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin abhängt. 1 mg/ml BSA hat z.B. einen  $A_{280}$ -Wert von 0.7, während  $\alpha$ -Amylase einen  $A_{280}$ -Wert von 2.42 hat.

**BCA-Test (Pierce):** In diesem Test werden proteinhaltige Proben gegen BSA-Standards gemessen. Dafür werden 50  $\mu$ l Puffer in dem das Protein gelöst ist (Blank-Kontrolle), jeweils 50  $\mu$ l der verschiedenen BSA-Verdünnungen und 1:2, 1:5 und 1:10 Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinprobe in Elisa-Platten pipettiert, mit 200  $\mu$ l Working Reagent gemischt (bestehend aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B, vergl. Kit-Beschreibung) und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Nach Abzug des Wertes der Blank-Kontrolle (manche Geräte machen das automatisch) kann eine Standardkurve erstellt werden (Absorption gegen Proteinkonzentration) und darüber die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.

### 5.5.6 Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine

Für die Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine werden häufig Fusionsproteine verwendet, die neben dem spezifischen Proteinteil eine AS-Sequenz enthalten, die an bestimmte Proteine oder Chemikalien binden kann. Anschließend werden nichtbindende Proteine gewaschen und das Protein dann eluiert. Der gesamte Vorgang unterscheidet sich zwischen den einzelnen Systemen nur im Detail. Im ersten Schritt wird die Proteinsynthese über mehrere Stunden induziert (2-6 Std. bei Bakterien, in eukaryontischen Zellen kann dieser Vorgang auch mehrere Tage dauern). Danach werden die Bakterien oder andere Zellen pelletiert, lysiert und die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert. Der Überstand, in dem im Idealfall das Protein gelöst vorliegt, wird mit Beads inkubiert, an welchen das Protein haften bleibt. Nach mehreren Waschschritten wird das Protein eluiert. Im folgenden werden die verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Systeme kurz erläutert.

**Proteine mit His-Tag:** Der His-Tag besteht aus sechs Histidinen, die N- oder C-terminal mit dem Protein fusioniert sein können und bindet an Metall-chelatierende Beads, z.B. ProBond von Invitrogen, einer Nickel-beladenen Sepharose. Die Bindung erfolgt sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen. Die Elution erfolgt über einen Puffer mit niedrigem pH-Wert oder mit einem 500 mM Imidazole-Puffer. Die zwei folgenden Aufreinigungs-Beispiele beziehen sich auf ein in *E. coli* rekombinant exprimiertes Protein.

**Denaturierende Aufreinigung:** Das Pellet von 1l Kultur wird in 25 ml 6 M Guanidin-HCl (500 mM NaCl, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 6 M Guanidin-HCl, pH 7.8) lysiert. Nach einer Zentrifugation (20', RT, 12000g) werden dem Überstand weitere 5 ml 6 M Guanidin-HCl zugegeben und nochmals zentrifugiert (20', RT, 12.000g). Der Überstand wird ein weiteres mal zentrifugiert (20', RT, 13.000g) und zu 1 ml ProBond-Resin (Invitrogen), das in 6 M Guanidin-HCl äquilibriert wurde, gegeben und ÜN bei 4°C rotierend inkubiert. Danach wird das gesamte Gemisch über eine Säule gegeben, in der die Beads hängen bleiben. Anschließend wird mehrmals (3x -10x) mit 8 M Harnstoff (500 mM NaCl, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5.8) gewaschen. Die Elution erfolgt mit 2x 1 ml pH-Elutionspuffer (500 mM NaCl, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 3.8) oder Imidazole-Elutionspuffer (300 mM NaCl, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 250 - 500 mM Imidazole), wobei die Puffer etwa 5-10 min einwirken müssen. Anschließend muß für die meisten Anwendungen eine Dialyse gegen geeignete Puffer (z.B. 1x PBS) durchgeführt werden.

**Native Aufreinigung mit Imidazole:** Der wichtigste Schritt ist die Lyse der *E. coli*-Zellen (vergleiche Kapitel: 5.5.4). Dem Lyse-Puffer sollten 10 mM Imidazole zugegeben werden. Nach einer Zentrifugation (10', 4°C-RT, 12.000g) wird der Überstand auf ProBond-Resin (Invitrogen), das in Lyse-Puffer äquilibriert wurde, gegeben und 1 Stunde bis ÜN bei 4°C bis RT inkubiert. Ein Überkopf-Rotor schadet hierbei nicht. Nachdem die Beads in einer Säule gesammelt wurden wird 3 x mit einem Puffer der 20 mM Imidazole enthält (z.B. der Lysepuffer, evtl. ohne Detergentien) gewaschen. Anschließend wird mit Imidazole-Elutionspuffer (300 mM NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 - 500 mM Imidazole) eluiert. Natürlich funktioniert auch ein anderer Puffer, der die Menge an Imidazole enthält.

**Proteine mit Thioredoxin-Tag:** Proteine, in den Vektor pBAD/TOPO-ThioFusion kloniert werden, enthalten an ihrem 5'-Ende ein 11.7 kDa langes Thioredoxin. In seiner nativen Form bildet dieses Thioredoxin eine natürliche Metall-bindende Domäne, die an Metall-chelatierende Beads, (z.B. ProBond von Invitrogen) binden kann. Die Aufreinigung ist nur in nativen Systemen möglich (vergleiche oben: His-Tag, native Aufreinigung). Auf SDS und andere Detergentien sollte so weit möglich verzichtet werden.

**PinPoint™ Xa:** Bei dem PinPoint Xa-System (Promega) wird das gewünschte Protein mit einem Protein fusioniert, das in *E. coli* biotinyliert wird. Biotinylierte Proteine können über Avidin-Beads aufgereinigt werden. Von Promega gibt es zwei verschiedene Avidin-Beads. Zum einen Soft-Link, von dem das Protein wieder eluiert werden kann und Tetra-Link, an dem das Protein unlösbar haften bleibt. Das zweite eignet sich hervorragend für die Aufreinigung von Antikörpern. Eine ausführliche Beschreibung dieses Systems findet sich in der Gebrauchsanweisung (Promega, PinPoint™ Xa Protein Purification System).

### 5.5.7 Dialyse

Über die Dialyse können Proteinlösungen umgepuffert und störende Reagenzien (z.B. Imidazole, Seifen, Salze, kleine Peptide und ähnliches) entfernt werden. Dafür wird die proteinhaltige Lösung in einen Dialyseschlauch (evtl. muss dieser vorbereitet werden) gegeben und mehrmals für einige Stunden (auch ÜN) gegen den Puffer (1000 bis 10000 faches Volumen der Probe) mit den gewünschten Eigenschaften dialysiert.

### 5.5.8 Konzentration von Proteinen

**Fällung mit TCA** (Konzentration von Proteinen für die PAA-SDS-Gelelektrophorese): Auf ein Volumen Proteinlösung wird ein Volumen 20% TCA (Trichloressigsäure) gegeben, resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird bei 14.000 rpm, 4°C für 15 min zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und das Pellet mit ~ 300 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C, 5 min) wird das Pellet getrocknet und kann jetzt in SDS-Puffer (z.B. 2x Stop-Mix, vergl 5.5.1) aufgenommen werden.

**Centriprep:** Mit dieser Methode können Proteine über Zentrifugation angereichert werden. Weiterhin bietet sich die Möglichkeit, Proteine die eine bestimmte Grösse über- oder unterschreiten zu entfernen. Centriprep-Röhrchen bestehen aus zwei Kompartimenten, die durch eine Membran getrennt sind. Die Porengrösse der Membran bestimmt die Grösse der Proteine, die angereichert werden. Durch Zentrifugation wird die Proteinlösung von einem Kompartiment des Röhrchens in das andere gepresst, wobei alle Proteine, die nicht durch die Membran passen zurückgehalten werden. Diese Methode eignet sich auch zur Umpufferung von Proteinlösungen.



### 5.5.9 Immunopräzipitation

Ansatz für 1ml Proben

1. A) RIPA - Buffer (150 mM NaCl, 1% NP 40, 0.5% Deoxycholat (DOC), 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 7.5) oder  
B) NP 40 oder Triton X 100 Lysis Buffer (150µM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0, 1% NP 40 oder Triton X 100)

In jeden Puffer können noch Proteinaseinhibitoren und Phosphatasehemmer gegeben werden.

2. Die Zellen werden in einem dieser Puffer lysiert. Pro 1 ml Puffer können bis zu  $1 \times 10^7$  Säuger- und Insektenzellen oder bis zu  $1 \times 10^9$  *E.coli* und Hefe-Zellen eingesetzt werden. Über die FastPrep-Methode können auch seifenfreie Puffer verwendet werden.
3. Das Lysat wird 20 min lang bei 4°C und  $10.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig in ein steriles Gefäß überführt und auf Eis gestellt.
4. Um das Lysat vorzureinigen werden 50 µl Protein G Sepharose oder 50 µl Protein G Agarose zu dem Überstand gegeben, bei 4°C für 1 h geschüttelt, anschließend 1 min bei 4°C und  $10.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird dann in ein frisches steriles Gefäß überführt.
5. Jetzt werden zu dem Überstand 1-2 µg Antikörper sowie 50 µl Protein G resin (Sepharose oder Agarose) gegeben. Alles zusammen wird für 2 – 24 Stunden bei 4°C geschüttelt.
6. Nach einer Zentrifugation (1 min,  $10.000 \times g$ , 4°C) wird der Überstand abgenommen und das verbleibende Resin-Pellet 2 mal mit 500 µl Lysis – Buffer gewaschen.
7. Der Protein – Immun – Komplex kann jetzt eingesetzt werden.
8. Für ein SDS-PAA Gel werden 50µl 2×SDS Sample Buffer zum Resin gegeben, resuspendiert, 2 min auf 85°C – 100°C erhitzt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird auf das Gel geladen.

### 5.5.10 GTP – Bindungsassay

Kleine GTP-bindende Proteine können GTP binden nachdem sie denaturiert, auf eine Nylon- oder Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend renaturiert wurden.

Das kleine GTP-bindende Protein wird in *E.coli* exprimiert. 1ml der Bakteriensuspension wird bei 14.000 rpm pelletiert und das resultierende Pellet in 100 µl 2×Stop-Mix resuspendiert. Der Ansatz wird 5 min gekocht und dann bei 14.000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand werden 10µl in die Tasche (kleines Gel, 10-zähliger Kamm) eines 12.5 % PAA-Gels gefüllt. Nach der Gelelektrophorese wird das Protein auf eine Nylon- oder Nitrocellulosemembran geblottet und diese anschließend 1h bei RT (auch alle anderen Waschschrte finden bei RT statt) in 1×TBB (100mM NaCl, 10mM Tris, pH 7.5, 0.1% Tween20 + 5% Magermilch geblockt). Nach zwei bis dreimaligem kurzen Waschen mit 1×TBB wird die Membran dann zur Renaturierung der Proteine 3 mal für je 25 min in Renaturierungspuffer (200 mM Mops, 100 mM Na-Acetat, 5 mM Mg-Acetat, 5 mM DTT und 0.05% Tween 20, pH 7.7) oder in GTP-Buffer B (25mM Tris/190mM Glycin, pH 8.3, 20% Methanol) inkubiert. Auf zweimaliges 10 minütiges Waschen in GTP-Buffer C (50mM Tris, pH 7.4, 0.3% Tween 20, 10µM MgCl<sub>2</sub>) folgt der GTP-Bindungs-Assay, für den die Membran 1h in GTP-Buffer D (GTP-Buffer C mit 100 mM DTT, 100 µM ATP und 1µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP/ml) inkubiert wird, wobei das [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP frisch sein muß (nicht älter als 1 Halbwertszeit). Anschließend wird die Membran zwei bis dreimal für je 10 min in GTP-Buffer E (GTP-Buffer C mit 10mM Mg-Cl<sub>2</sub>) gewaschen, getrocknet und über Nacht auf einen Röntgenfilm gelegt [170]. Statt der Bakteriensuspension kann auch aufgereinigtes Protein verwendet werden.

### 5.5.11 Kinaseassay – EmERK und Emp38

ERK und p38 sind MAP-Kinasen die mit Myelin-Basic-Protein phosphorylieren. Die Anleitung für diesen Versuch findet sich in Kapitel 5.15.1

### 5.5.12 *In vitro* Translation mit rabbit – Reticulocytenlysat

*In vitro* Translation (mit kombinierter Prenylierungsreaktion):

Zuerst werden die 4  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] - Farnesyl – PP oder 4  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] - Geranylgeranyl – PP in ein Eppi vorgelegt und solange bei 30°C mit Stickstoff begast (der Stickstoff soll leicht über die Oberfläche streichen) bis sämtliche Flüssigkeit verdunstet ist. Vor allem Ethanol kann die *in vitro* Translation stören. Anschließend werden die anderen Komponenten hinzugegeben und der Ansatz 90 min bis 6 Stunden bei 30 °C inkubiert. Das resultierende Protein kann entweder direkt auf ein PAA Gel aufgetragen oder über Immunpräzipitation aufgereinigt werden.

	standard	Farnesyl	Geranylgeranyl
Retico-Lysat	30 $\mu\text{l}$	15 $\mu\text{l}$	15 $\mu\text{l}$
AS -L	2.5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
AS -M	2.5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
RNAse Inhibitor	5 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
RNA (2 $\mu\text{g}$ bei 200ng/ $\mu\text{l}$ )	10 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
[ $^3\text{H}$ ] - Farnesyl - PP	-	4 $\mu\text{Ci}$	-
[ $^3\text{H}$ ] - Geranylgeranyl - PP	-	-	4 $\mu\text{Ci}$
H2On (RNAse frei)	8 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$
	50 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$

### 5.5.13 Prenylierung kleiner GTP-bindender Proteine

Der Nachweis der Prenylierung kleiner GTP – bindender Proteine erfolgt in drei Abschnitten. Zuerst wird das Protein in *E.coli* exprimiert oder über *in vitro* Translation hergestellt. Die so erhaltenen Proteine werden geeignet aufgereinigt und dann in Gegenwart von [ $^3\text{H}$ ] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl–Pyrophosphat in Kaninchen-Reticulocytenextrakt oder in Echinokokken-Lysat inkubiert. Es ist auch möglich, die Proteine während der *in vitro* Translation zu prenylieren. Anschließend werden die prenylierten Proteine in einem PAA Gel aufgetrennt, dieses getrocknet und die Prenylierung dann über einen aufgelegten Röntgenfilm visualisiert.

#### 1. Einsatz von [ $^3\text{H}$ ] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl–Pyrophosphat:

Zuerst werden die 4  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] - Farnesyl – PP oder 4  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] - Geranylgeranyl – PP in ein Eppi vorgelegt und solange bei 30°C mit Stickstoff begast (der Stickstoff soll leicht über die Oberfläche streichen) bis sämtliche Flüssigkeit verdunstet ist. Vor allem Ethanol kann die *in vitro* Translation stören. Anschließend werden die anderen Komponenten hinzugegeben und der Ansatz 90 min bis 6 Stunden bei 30 °C inkubiert. Das resultierende Protein kann entweder direkt auf ein PAA Gel aufgetragen oder über Immunpräzipitation aufgereinigt werden.

2. Gekoppelte *in vitro* Translation und Prenylierung:

Sämtliche kleine GTP-bindene Proteine wurden als 5'-Myc-Fusion in den Vektor pBGKT7 (Yeast-Two-Hybrid Vector von Clontech) kloniert. Diese Vektoren dienten als Template für die *in vitro* Transkription von RNA über den T7 Promoter. 1 - 2 µg der resultierenden RNA wurden für die gekoppelte *in vitro* Translation und Prenylierung eingesetzt.

Gekoppelte *in vitro* Translation (Promega) und Prenylierung:

	0-Wert	Farnesyl - PP	Geranylgeranyl -PP
Retico-Lysat	30 µl	15 µl	15 µl
AS -L	2.5 µl	1 µl	1 µl
AS -M	2.5 µl	1 µl	1 µl
RNAse Inhibitor	5 µl	2 µl	2 µl
RNA (2µg bei 200ng/µl))	10 µl	5 µl	5 µl
[3H] - Farnesyl - PP	-	4 µCi	-
[3H] - Geranylgeranyl - PP	-		4 µCi
H <sub>2</sub> O (RNAse frei)	8 µl	4 µl	4 µl
	50 µl	25 µl	25 µl

3. Der Ansatz wird bei 30°C für 4 Stunden inkubiert. Das resultierende Protein kann entweder direkt auf ein PAA Gel aufgetragen oder über Immunpräzipitation aufgereinigt werden.

4. Prenylierung von immunpräzipitierten *in vitro* translatierten Proteinen:

*In vitro* Translation wie in 2., aber ohne [<sup>3</sup>H] markiertes Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat (vergl Nullwert). Die translatierten Proteine werden über eine anti-Myc-Antikörper immunpräzipitiert (1µg Antikörper, 20 µl Protein G- Agarose beads, ÜN 4°C drehen, vergleiche Kapitel 5.5.9).

5. Prenylierung von, in *E.coli*, rekombinant exprimierten Proteinen

Die codierenden Sequenzen der kleinen GTP-bindenden Proteine wurden mit einem Stopcodon am 3'- Ende der codierenden Sequenz über geeignete Primer amplifiziert und in den Vektor TOPO pBAD/Thio (Invitrogen) als 5' Fusion kloniert. Nach dreistündiger Induktion mit 0.2% Arabinose werden die Bakterien durch Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm) pelletiert und das resultierende Pellet über FastPrep in 1x TBB (100mM NaCl, 10mM Tris, pH 7.5, 0.1% Tween20) lysiert. Die Fusionsproteine werden über Immunpräzipitation (Kapitel 5.5.9) mit dem α-Thio Antikörper (Invitrogen) aufgereinigt und in 60%-igem Kaninchen-Reticulocytenextrakt (Promega) oder in Echinokokken-Lysat (vergl. Kapitel 5.9.5), in Gegenwart von 1mM GTP und 4µCi [<sup>3</sup>H] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat für 4 Stunden bei 32°C inkubiert. Die Reaktionen wurden über ein 15% PAA-Gel aufgetrennt, das Gel fixiert (2-Propanol/H<sub>2</sub>O/Eisessig, 25:65:10), mit Amplify (Amersham) behandelt, getrocknet und für acht Tage auf einen Röntgenfilm gelegt.

6. Für den Prenylierungsnachweis von EmRap1 und EmRap2 wurde das wie unter 5. beschriebene rekombinant exprimierte und immunpräzipitierte Protein in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit Ponceau-Lösung gefärbt. Jede Bande wurde ausgeschnitten und in zwei Hälften geteilt. Die beiden Hälften wurde dann wie in 5. beschrieben mit oder ohne Echinokokken- bzw. Kaninchen-Reticulocytenextrakt in Gegenwart von 4µCi [<sup>3</sup>H] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat für 4 Stunden bei 32°C inkubiert. Die Blotschnipsel wurden dann mit Amplify (Amersham) behandelt, getrocknet und

für acht Tage auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Unterschiede waren deutlich zu erkennen, die Blotschnipsel jedoch zu klein um eine gute Abbildung zu bekommen. Daher eignet sich diese Methode nur zur schnellen Überprüfung, liefert jedoch keine publizierbaren Abbildungen.

## 5.6 Arbeiten mit *E. coli*

### 5.6.1 Stämme

**DH5 $\alpha$** : F'/endA1 hsdR17 ( $r_K^-$   $m_K^+$ ) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal<sup>r</sup>) relA  $\Delta$ (lacIZYA-argF) U169 deoR ( $\Phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15)

**Top10**: F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

**BL21**: F<sup>-</sup> ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub> ( $r_B^-$   $m_B^-$ ; ein *E. coli* B Stamm) mit DE3, einem  $\lambda$ -Prophagen der das T7-RNA-Polymerasegen trägt

**dam<sup>-</sup>**: Genotyp unbekannt, Verwendung für die Gewinnung von Plasmiden für einen XbaI-Verdau.

### 5.6.2 Medien und Zusätze

**LB (Luria-Bertani)**: 1% Trypton, 0.5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl in Wasser lösen, pH 7 mit NaOH einstellen und autoklavieren.

**SOB**: 2% Trypton, 0.5% Hefe-Extrakt, 0.05 % NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl in Wasser lösen, pH 7 mit NaOH einstellen und autoklavieren.

**Antibiotikazugabe**: Nach dem Autoklavieren das Medium auf ~55°C abkühlen lassen und AB in gewünschter Menge zugeben (Ampicillin 100  $\mu$ g/ml, Kanamycin 30  $\mu$ g/ml).

**Agarplatten**: In die Medien vor dem Autoklavieren 15g/l Agar zugeben, nach Zugabe von AB (fakultativ) Platten gießen.

**X-Gal (für blau-weiss-Selektion)**: 400mg X-Gal in 10 ml Dimethylformamid lösen. Lagerung lichtgeschützt bei -20°C, 40  $\mu$ l auf jede Agarplatte ausplattieren.

### 5.6.3 Herstellung kompetenter *E. coli*

**CaCl**: 50 ml 2x LB-Medium mit 350 $\mu$ l einer *E. coli*-ÜN-Kultur beimpfen und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.45 - 0.55 bei ca. 170 rpm wachsen lassen (~ 3 Stunden). Dann Kultur für 30 min im Kühlschrank abkühlen lassen (fakultativ) und bei 4°C abzentrifugieren (4000 – 8000 rpm, 10 -20 min). Pellet in 25 ml Calciumchlorid (100 mM, eiskalt) vorsichtig resuspendieren und für 2 h auf Eis stehen lassen. Anschließend erneut abzentrifugieren (4000 rpm, 4°C, 15') und Pellet in 2.5 ml Calciumchlorid (100 mM, eiskalt) aufnehmen und sehr vorsichtig resuspendieren. Zellen anschließend mindestens 2 Stunden auf Eis stehen lassen. Zum Einfrieren wird die Zellsuspension mit 1/3 vol kaltem Glycerin gemischt und anschließend in 50 $\mu$ l-Aliquots aufgeteilt, die bei -80°C eingefroren werden.

**TSS**: *E. coli* aus einer ÜN-Kultur, einer Kultur OD<sub>600</sub> ~0.4 (gewachsen bei RT bis 37°C) oder direkt von einer Platte in frisch angesetzttem TSS-Puffer (5ml 2xLB, 3.5 ml PEG-8000 (29%ige Lsg.), 1ml 0.5M MgCl, 500  $\mu$ l DMSO) resuspendieren und direkt für die Transformation einsetzen, 42°C-Schritt nicht notwendig. Lagerung der kompetenten Zellen bei -80°C möglich, jedoch Transformationseffizienzverlust.

**Super-Kompetent (RbCl)**: 10 ml SOB-Medium (20g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10 mM NaCl, auf pH 7 einstellen und auf 1l mit H<sub>2</sub>O auffüllen und autoklavieren. Anschließend sterilfiltriertes KCl

(2.5 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), MgSO<sub>4</sub> (10 mM) zugeben.) mit einer *E. coli*-Kolonie animpfen und ÜN bei RT schütteln. Am nächsten Tag 5 ml ÜN-Kultur und 36 ml 5M NaCl in 500 ml SOB geben und in einem sehr großen Kolben (4l) bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4 – 0.5 schütteln. Zellen bei 4000 rpm zentrifugieren und jeden Rest Medium entfernen. Pellet sehr vorsichtig in 50 ml eiskaltem TFB (100 mM MES (aus 1M MES, pH6.2 mit KOH einstellen und nach Sterilfiltration bei -20°C lagern), 100 mM RbCl, 45 mM MnCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM Hexamin-Kobalt-Chlorid; Lagerung bei 4°C) resuspendieren und 15 min auf Eis inkubieren. Danach Gefäß vorsichtig schwenken und dabei 1.75 ml eiskaltes DMSO zugeben. Anschließend Zellen 15 min auf Eis inkubieren und dann in vorgekühlte Eppis aliquotieren und sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren. Lagerung 12 Monate bei -80°C.

**Ultra-Kompetent:** ÜN-Kultur in SOB-Medium (2% Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, autoklavieren) ansetzen. Diese am nächsten Tag 1:100 in frisches SOB überführen (250 ml) und in einem möglichst großen Kolben bei 19°C unter starkem Schütteln auf eine OD<sub>600</sub> von ~0.5 wachsen lassen (24-36 h). Kolben anschließend 10-20 min auf Eis abkühlen und Zellen dann 10' bei 4000 rpm und 4°C zentrifugieren. Nachdem jeder Rest Medium entfernt wurde wird das Pellet sehr vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl; pH 6.7 mit KOH oder HCl einstellen und dann MnCl<sub>2</sub> zugeben (55mM). Sterilfiltration, Lagerung bei 4°C) resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wird 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet dann vorsichtig in 20 ml eiskaltem TB + 1.4 ml DMSO (-20°C) resuspendiert. Die resuspendierten *E. coli* werden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

**kompetentere Zellen (gilt für alle Protokolle):** Zellen schon bei einer OD<sub>600</sub> von 0.3 - 0.4 abzentrifugieren, dann aber am Ende auch in weniger Puffer aufnehmen und/oder Wachstum bei 18-30°C.

## 5.6.4 Transformation

50 – 500 ng Plasmid-DNA oder bis zu 8 µl Ligationsansatz werden auf Eis gekühlt und anschließend in ein Cap mit auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* (50 µl) gegeben und vorsichtig untergerührt (nicht resuspendieren). Der Gesamte Ansatz bleibt 30 – 60 min. auf Eis, wird dann für 90 sec. in einem Heizblock auf 42°C erwärmt und dann für 2 min. wieder auf Eis gestellt. Sofort danach werden 200µl LB-Medium zugegeben und das Cap für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird die Bakteriensuspension auf geeignete LB-Agarplatten ausgestrichen (Antibiotikazugabe hängt von der plasmidcodierten AB-Resistenz ab).

**Blau-weiß-Selektion:** 40µl X-Gal-Lösung auf jede Platte pipettieren, kurz eintrocknen lassen und dann die *E. coli* zugeben (Vektor: z.B. pCR2.1 von Invitrogen).

**Effizienz-Enhancer:** 25 mM β-Mercaptoethenol (1M β-Mercaptoethenol = 0,59 ml β-Me in 10 ml H<sub>2</sub>O) in den Transformationsansatz führt zu einer 5-fachen Transformationseffizienz, 17 mM DTT in den Transformationsansatz führt zu einer 20-fachen Transformationseffizienz.

## 5.6.5 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Für die Expression rekombinanter Proteine wird das gewünschte Protein in einen Expressionsvektor kloniert und dieser dann in *E. coli* transformiert. Zuerst wird eine ÜN-Kultur angesetzt (AB zugeben) und diese dann am folgenden Tag 1:100 verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird die Proteinexpression induziert. Für verschiedene Expressionssysteme gibt es verschiedene Induktoren.

Für Proteine, die über pBAD und pBAD/ThioFusion (Invitrogen) induziert werden, wird 0.02 – 0.2% Arabinose zugegeben und die Kultur für weitere 3-5 Stunden bei 37°C geschüttelt.

Für Proteine, die über pGEX (GST-Fusion) und das PinPoint-System von Promega (Vektor: Xa, Biotin muß zugegeben werden) induziert werden, wird 100 µM IPTG zugegeben und die Kultur für weitere 3-5 Stunden bei 37°C geschüttelt.

Anschließend wird die Bakteriensuspension zentrifugiert und das Pellet in Lyse-Puffer aufgenommen. Je nach Art der Aufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins, z.B. nativ oder denaturierend, wird das Pellet in unterschiedlichen Puffern aufgenommen, lysiert und das Protein aufgereinigt (vergl. Kapitel: proteinhaltige Lysate 5.5.4, Aufreinigung 5.5.6).

## 5.7 Arbeiten mit Hefen

### 5.7.1 Material

#### Medien:

**YPDA:** (20 g/l Difco Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Agar (für Platten), dH<sub>2</sub>O ad 950 ml, pH 5,8). Nach dem Autoklavieren abkühlen auf 55°C und dann 50 ml 40% sterilfiltrierte Glucose (Endkonzentration 2%) und 3 ml 1% Adenin-Hemisulfat (Endkonzentration 0,003%) zugeben.

**SD:** (6,7 g Difco™ Yeast Nitrogen Base ohne Amino Acids, 20 g Difco™ Bacto Agar (für Platten), X g des entsprechenden Drop Out (DO) Supplement Pulvers, dH<sub>2</sub>O ad 950 ml, pH 5,8). Nach dem Autoklavieren abkühlen auf 55°C und dann 50 ml 40% sterilfiltrierte Glucose (Endkonzentration 2%) und weitere Komponenten (zum Beispiel DO-Supplements) zugeben.

#### Zusätze für die Medien:

**DO Supplements:** Clontech –Leu/-Trp DO Supplement (0,64 g/l)

Clontech –Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement (0,6 g/l)

**Weitere Komponenten:** 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT; Sigma Aldrich) in verschiedenen Konzentrationen und 50x Adenin-Hemisulfat (1 g/l)

#### Hefestämme:

Eingesetzt wurden zwei verschiedene Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*:

**Y187:** MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, met<sup>-</sup>, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , URA3::GAL1, UAS-GAL1, TATA-lacZ

**AH109:** MAT $\alpha$ , trp1-901, leu2-3, 112, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ

### 5.7.2 Transformation von Hefen

100 ml YPDA werden mit 4-5 Hefe-Kolonien (Durchmesser jeweils 2-3 mm) angeimpft und für 16-18 h bei 30°C und 250 rpm inkubiert (OD<sub>600</sub> > 1,5). Je Transformation werden 2 ml dieser Kultur für 5 min bei 1000 rpm pelletiert. Das Pellet wird in frisch hergestelltem ONE-STEP-Puffer (0,2 M Lithiumacetat pH 7,5, 40% Polyethylenglycol 3350 (PEG 3350), 100 mM Dithiothreitol) vorsichtig aber gründlich resuspendiert. Je Transformationsansatz werden 100 µl ONE-STEP-Puffer eingesetzt. Auf jeweils 100 µl dieser resuspendierten Zellen werden 500 ng des, bzw der zu transformierenden Plasmide pipettiert und vorsichtig resuspendiert. Der Ansatz wird für 30 min bei 45°C im Heizblock inkubiert und anschließend auf SD-Platten (-Trp/-Leu) ausplattiert (bei Y2H-versuchen mit AD- und BD-Vektoren). Innerhalb von 2-3 Tagen wachsen die ersten Kolonien.

### 5.7.3 Yeast 2 Hybrid

In dieser Arbeit wurde das Yeast-Two-Hybrid-System Matchmaker von Clontech verwendet (Eine genaue Beschreibung der Methode bietet das Handbuch „Yeast Protocols“ von Clontech). Das System beruht auf der Tatsache, dass viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren aus zwei unabhängigen Domänen, der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) bestehen. Die DNA-BD bindet an eine spezifische Promotorsequenz und die AD-Domäne dirigiert den RNA-Polymerase-II-Komplex an die richtige Stelle um das nachfolgende Gen abzulesen. Die Domänen agieren als unabhängige Module, wobei keine der beiden alleine die Transkription aktivieren kann, aber auch noch funktionieren, wenn sie mit einem anderen Protein fusioniert sind. Im Matchmaker-System ist ein Protein mit der BD-Domäne und ein anderes mit der AD-Domäne fusioniert. Wenn beide Proteine miteinander interagieren, werden die beiden Domänen in unmittelbare Nachbarschaft gebracht und aktivieren die Transkription des Reportergens. Die BD-Bindungsdomäne bindet die DNA an einer UAS-Sequenz (**u**pstream **a**ctivating **s**equences). Je nach genauer Basenfolge dieser Sequenz bindet die BD-Bindungsdomäne unterschiedlich gut. Im Matchmaker-System ist das Gen für die Synthese von Histidin hinter einer „guten“ und das für Adenin hinter einer „schlechten“ UAS-Sequenz. Daraus ergibt sich die Möglichkeit verschieden starke Interaktionen durch die Wahl verschiedener Reportergene, die hinter diese Sequenzen gesetzt werden, nachzuweisen. Eine mittelstarke Interaktion kann durch Hefenwachstum in histidinfreiem und eine starke Interaktion durch wachstum in histidin- und adeninfreiem Medium nachgewiesen werden. Das System besteht aus den zwei Vektoren pGBKT7, der für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne, einen c-Myc-Tag und die Synthese von Leucin codiert und dem Vektor pGADT7, der neben der GAL4-Aktivierungsdomäne und einem HA-Epitop für die Synthese von Tryptophan codiert. Die über diese Vektoren exprimierten Proteine können mit Antikörpern gegen das HA-Epitop bzw das Myc-Epitop durch einen Western-Blot nachgewiesen werden.

Im Versuch wurden die codierenden Sequenzen der zu untersuchenden Faktoren in-frame mit den jeweiligen GAL4-Domänen der Vektoren kloniert, die erhaltenen Klone sequenziert und in Hefen nach dem oben beschriebenen Protokoll transformiert. Positive Klone wuchsen auf tryptophan- und leuzinnegativen SD-Agarplatten. Die erhaltenen Klone wurden auf Agar ohne Histidin (schwache Stringenz, mittelstarke Interaktion) und Agar ohne Histidin und ohne Adenin (starke Stringenz, starke Interaktion) überimpft und das Wachstum der Hefen beobachtet.

In dieser Arbeit wurden über das Matchmaker-Y2H-System die Interaktionen zwischen EmRaf und den folgenden Faktoren untersucht: EmRas, EmRap1, EmRap2, EmRal, Em14-3-3-2, EmMKK-A und EmMKK-B. Weiterhin wurden Interaktionen zwischen EmMKK-A und EmMKK-B mit EmERK-A und EmERK-B untersucht. Die Transfektionsmethode ist unter 5.7.2 beschrieben und die verschiedenen Klone unter 5.1.3.

## 5.8 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

### 5.8.1 Medien und Medienzusätze

1. Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM, GIBCO BRL) + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin G und 100 U/ml Streptomycin (PenStrep, Biochrom KG, 10.000U/ml).
2. DES Expression Medium +10% FCS oder Ultimate Insect Serum-Free Medium (beide Invitrogen)
3. RPMI + 10% FCS + 100U/ml PenStrep + 2% L-Glutamin + 25 mM HEPES
4. RPMI + 10% FCS + 100U/ml PenStrep + 2% L-Glutamin + 10% WEHI-3B-konditioniertes Medium 3 (für Il-3)

### 5.8.2 verwendete Zelllinien

**RH**: Ratten Reuber Leberzellen (ATCC: CRL-1600), Medium 1, 6

**HepG2**: Humane Leberzellen (ATCC: HB-8065), Medium 1

**Hep2**: Humane Epithelzellen eines Larynxcarzinoms (ATCC: CCL-23), Medium 1

**HEK-293**: Humane embryonale Nierenzellen (ATCC: CRL-1573), Medium 1

**SH-SY5Y**: Humane neuroblastom-Zellen (ATCC: CRL-2266), Medium 1

**CHO**: Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (ATCC: CCL-61), Medium 1

**MMN02**: Humane Magen-Adenocarcinom-Zellen [328], Medium 1

**HeLa**: Humane Epidermoid-Carcinom-Zellen (ATCC: CCL-2), Medium 1

**HEC1B**: Humane Endometrial-Carcinom-Zellen (ATCC: HTB-113), Medium 1

**U937**: Humane Makrophagen-ähnliche Zelllinie (ATCC: CRL-1593.2), Medium 1

**WEHI-3B**: murine myelomonocytäre Zelllinie (ATCC: TTB-68), Medium 4

**BaF3**: murine pre-lymphoide Zelllinie (ATCC: CRL-1593), Medium 5

**SF9**: Zelllinie von *Spodoptera frugiperda* (ATCC: CRL-1711), Medium 3

**S2**: Zelllinie von *Drosophila melanogaster* (ATCC: CRL-1963), Medium 2

### 5.8.3 Kultivierung von Zellen

Die verschiedenen Zelllinien können über einen langen Zeitraum unter *in vitro* Bedingungen kultiviert werden.

**Start einer *in vitro* Kultur aus einem Gefrierstock**: Die Zellen ( $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^7$ ) werden vorsichtig, aber schnell auf 37°C erwärmt und sehr vorsichtig in eine 25 cm<sup>2</sup> (incl ~ 10ml Medium) oder 75 cm<sup>2</sup> (incl. ~ 40 ml Medium) Zellkulturflasche überführt und ÜN bei 37°C inkubiert (SF9 und S2 bei 23°C). Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt, ca. 15 ml Medium je 75 cm<sup>2</sup>-Flasche (vorsicht, manche Zellen sind nicht adhärent). Etwa alle 3 - 8 Tage muß das Medium gewechselt werden.

**Splitten einer Zellkultur**: Wenn die Zellen weit gewachsen sind, z.B. deutlich mehr als einen Monolayer bilden oder bei nichtadhärenten Zellen zu einer starken Trübung des Mediums führen, müssen sie gesplittet werden. Bei den Nichtadhärenten Zellen wird ein geeigneter Teil mit einer Pipette abgenommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Adhärente Zellen müssen zuerst



von dem Boden der alten Flasche gelöst werden. Mechanisch können sie mit einem Zellschaber vom Boden gekratzt oder durch Klopfen und resuspendieren gelöst werden (z.B. HEK-293). Stark adhärierende Zellen (z. B. RH-) werden durch einen Trypsinverdau vom Boden gelöst. Dabei wird das gesamte Medium (auch der allerletzte Tropfen) von den Zellen abpipetiert und 3 ml Trypsin/EDTA-Lsg. auf die Zellen gegeben und ~ 10 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Wenn sich die Zellen nach leichtem Klopfen lösen, werden sie vorsichtig resuspendiert und auf neue Flaschen verteilt.

**Herstellung eines Gefrierstocks:** Trypsinierte Zellen werden bei 400 g zentrifugiert und das Pellet in 4°C-kaltem Medium vorsichtig resuspendiert (bei manchen Zellen, z.B. S2 wird 50% Medium aus einer wachsenden Kultur verwendet). Nach Zugabe von 10% DMSO werden die Zellen aliquotiert und eingefroren. Bei manchen Zellen funktioniert ein direkter Transfer in flüssigen Stickstoff, andere müssen gut eingepackt erst im Kühlschrank vorgekühlt und dann ÜN bei -80°C gekühlt werden, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden können.

#### 5.8.4 Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen

Das hier beschriebene Protokoll ist für die Transfektion von HEK-293-Zellen über Calciumphosphat optimiert.

Aus einer mit HEK-293-Zellen bewachsenen 75 cm<sup>2</sup>-Flasche werden die Zellen durch Trypsinierung (3ml Trypsin/EDTA, 10' 37°C) gelöst und mit 7 ml DMEM + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin G und 100 U/ml Streptomycin gemischt. Nach einer Zellzählung (Neubauer-Zählkammer: Zellzahl von 16 Feldern x 10<sup>4</sup> x Verdünnung = Zellen/ml) werden in eine 4 cm-Zellkulturschale 4 ml Medium (DMEM, 10% FCS, P/S) gegeben, anschliessend 1.3 x 10<sup>6</sup> Zellen zugegeben und ÜN bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium abgezogen und durch 4 ml frisches Medium ersetzt.

Für jede Transfektion werden 500 µl 2xHBS (50 mM HEPES, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 280 mM NaCl, pH 7.1) in ein 1.5 ml Eppendorff-Cap pipetiert. In einem zweiten 1.5 ml Eppendorff-Cap werden 10 µg Plasmid, 62 µl 2M CaCl<sub>2</sub> mit x µl H<sub>2</sub>O gemischt und gut resuspendiert (Gesamtvolumen 500 µl). Für die Negativkontrolle wird anstelle der Plasmid-DNA H<sub>2</sub>O verwendet. Anschließend wird die DNA-haltige Lösung mit dem 2xHBS gemischt und nach kurzem vortexen 45 min bei Raumtemperatur zur Ausbildung des Calciumphosphat-Komplexes inkubiert.

Die Transfektionslösung wird jetzt vorsichtig unter leichtem Schwenken zu den Zellen gegeben und für 6 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschliessend wird das Medium vorsichtig abgezogen und durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Die Zellen werden jetzt für 16 -72 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion kann z.B. über einen Western-Blot erbracht werden.

#### 5.8.5 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen (S2-Zellen)

Die induzierbare rekombinante Expression von Proteinen in S2-Drosophilazellen erfolgte über die Vektoren pMT/V5-His A,B,C und pMT/Bip/V5-His A,B,C (incl. Sekretionssignal) nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen: Drosophila Expression System).

## 5.9 Arbeiten mit *E. multilocularis* Parasitenmaterial

### 5.9.1 *In vivo* Kultursystem von *E. multilocularis* (Passagieren von PM)

Einzelne *E. multilocularis*-Isolate können durch wiederholtes Passagieren des Metacestodengewebes von einem Gerbil auf einen anderen über Jahre hinweg am Leben erhalten und vermehrt werden. Das Metacestodengewebe wird wie in 5.9.3 beschrieben verarbeitet und jeweils zwischen 0,2 und 0,8 ml in eine 2 ml Spritze aufgezogen. Mit einer 0,9 mm Kanüle wird das Metacestodenmaterial dann in das Peritoneum eines Gerbils injiziert. Innerhalb von 8 bis 16 Wochen schwillt der Bauch des infizierten Gerbils durch das Wachstum des Metacestoden stark an. Zu diesem Zeitpunkt, jedoch spätestens wenn der Gerbil durch die Folgen der Infektion träge wird, sollte diese mit CO<sub>2</sub> getötet werden. Dafür füllt man ein Gefäß (Volumen mindestens 1 Liter) mit CO<sub>2</sub> setzt den Gerbil hinein und schließt das Gefäß dicht ab. Nach spätestens 60 Sekunden ist der Gerbil tot und kann zur Entnahme des Metacestodengewebes geöffnet werden.

### 5.9.2 verschiedene *E. multilocularis*-Isolate

H95: natürliches Isolat aus Oncosphären, durchschnittliche Menge an Protoscolices, durchschnittliche Menge an Kalziumkörperchen, Konsistenz weich.

H95-hart: während der Kultivierung aus H95 entstanden, durchschnittliche Menge an Protoscolices, große Menge an Kalziumkörperchen, Konsistenz hart.

MP1: Patientenisolat, annähernd keine Protoscolices, wenig Kalziumkörperchen, Konsistenz sehr weich.

UP1: Patientenisolat, ausgestorben.

K188: Patientenisolat, viele Protoscolices, viele Kalziumkörperchen, Konsistenz hart, Versuchstiere zeigen Entzündungsreaktionen.

J31: Isolat aus einem Javaner-Affen, viele Protoscolices, viele Kalziumkörperchen, Konsistenz hart.

7030: Isolat aus einem Javaner-Affen, viele Protoscolices, viele Kalziumkörperchen, Konsistenz hart.

Töle: Isolat aus einem Hund mit alveolärer Echinokokkose, durchschnittliche Menge an Protoscolices, viele Kalziumkörperchen, Konsistenz mittelhart.

### 5.9.3 Isolierung und Verarbeitung von *in vivo* kultivierten Parasitenmaterial

Ein intraperitoneal mit Metacestoden infizierter Gerbil (*Meriones unguiculatus*) wird etwa 8 - 16 Wochen nach Infektion mit CO<sub>2</sub> getötet und der Bauchraum steril geöffnet. Das Metacestodengewebe wird mit einer Pinzette und einem Skalpell steril entnommen, wobei darauf zu achten ist, möglichst wenig Gewebe des Gerbils zu verschleppen. Sollten Darm oder Magen des Gerbils verletzt werden ist mit einer starken mikrobiellen Verunreinigung des Metacestodengewebes zu rechnen und dieses daher zu verwerfen. Weiterhin sollten weder Galle, Speiseröhre noch Harnröhre verletzt werden.

Das Metacestodengewebe wird in 1-2 mm starke Scheiben geschnitten und diese dann mit dem Kolben einer 20 ml Einwegspritze durch ein handelsübliches steriles Teesieb passiert. Teesiebe aus Metall eignen sich durch ihre Stabilität besser als jene aus Kunststoff, sie sollten aber auf jeden Fall rostfrei sein. Mehrmaliges spülen mit 1×PBS erleichtert das Passieren. Um das Metacestodenmaterial von Verunreinigungen wie zum Beispiel Blutzellen des Wirts zu befreien wird die breiige Masse mit 1×PBS auf ein Volumen von 50 ml gebracht, in ein 50 ml Falcon Rörchen überführt

und durch Absetzen lassen, Verwerfen des Überstandes sowie neues Auffüllen mit 1×PBS so oft gewaschen, bis der Überstand klar ist.

Das so gewonnene Metacestodenmaterial kann direkt für die Gewinnung von RNA, chromosomaler DNA oder Gesamtlarvenantigen eingesetzt werden. Für spätere Anwendungen kann es auch bei -20°C bis -80°C eingefroren werden.

Für die Verwendung in der *in vivo* und der *in vitro* Kultivierung muss das Metacestodenmaterial frisch sein und noch einer Antibiotikabehandlung unterzogen werden. Auf das durch Absetzen erhaltene Pellet werden 1 bis 3 Volumen 1×PBS gegeben. Nach Zugabe von 10 µl/ml Ciprobay 400 und/oder 10 µl/ml PenStrep (10000U/ml) erfolgt eine Inkubation bei 4°C für ca 16 Stunden. Nach dreimaligem Waschen mit 1×PBS kann das Metacestodenmaterial für weitere Versuche eingesetzt werden.

Zusätzliche Quellen für Metacestodenmaterial können infizierte Wild- oder Zootiere, wie zum Beispiel Nagetiere oder auch Affen sein. Auch Patientenisolat können eingesetzt werden.

#### 5.9.4 Herstellung von Gesamtlarvenantigen

Gesamtlarvenantigen ist ein Lysat aus Metacestodengewebe, das aus einem infizierten Zwischenwirt isoliert wurde. Das wie in Kapitel 5.9.3 beschrieben, passierte Metacestodenmaterial wird 1:1 mit 1×PBS versetzt, auf Eis plaziert und mit einer Ultraschallsonde 5× für 30 Sekunden beschallt (Branson-Sonifier B12/15, Output 4-5, Duty-cycle 40-50%). Das Lysat wird dann 15 min lang bei 4°C mit 10000g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand aliquotiert und bei -20 bis -80°C gelagert.

#### 5.9.5 Herstellung von Echinokokkenlysat

Das Echinokokken-Lysat für die Prenylierungsversuche (kleine GTP-bindende Proteine) wurde aus 150 µl frisch isolierten *Protoscolices* hergestellt (auch Metacestodenvesikel, von Hydatidenflüssigkeit befreit wurden eingesetzt), die in 100 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EGTA und Protease Inhibitor Cocktail von Roche) mit dem Fast Prep Purification Systems und der Lysing Matrix B (beides Qiogene) lysiert wurden.

#### 5.9.6 Isolation von CA-Körperchen, *Protoscolices* und deren Aktivierung

Die von uns verwendeten *E. multilocularis*-Isolate enthalten wenn sie aus einem Gerbil isoliert werden sehr unterschiedliche Mengen an *Protoscolices* und Calciumkörperchen (MP1: annähernd keine *Protoscolices*, H95: mittelviele *Protoscolices*, K188, Java: sehr viele *Protoscolices*). Die Menge an *Protoscolices* hängt mit der Menge an Calciumkörperchen zusammen (viele *Protoscolices* = viele Calciumkörperchen).

Zur Isolation werden bis zu 15 ml passiertes Metacestodenmaterial mit 15 ml 1 xPBS in ein 50 ml Kunststoffröhrchen gegeben und mindestens 10 Minuten kräftig geschüttelt. Dabei lösen sich die *Protoscolices* vom Metacestodengewebe. Der Inhalt wird dann durch 150 µm Gaze gesiebt (mit Mulde auf ein Becherglas geklebt). Um eine große Ausbeute zu erzielen muß mehrmals mit 1 xPBS gespült werden und das auf der Gaze liegende Metacestodenmaterial mit einer 10 ml Pipette ständig auf und ab pipettiert werden. In diesem Schritt fallen kleine Partikel wie *Protoscolices* und Calciumkörperchen durch die Gaze. Diese kleinen Partikel werden jetzt durch eine 50 µm Gaze gesiebt und mehrmals mit 1 x PBS gewaschen. Die *Protoscolices* bleiben in der Gaze hängen, während die Calciumkörperchen durchfallen. Die Calciumkörperchenfraktion wird in ein 50 ml Kunststoffröhrchen überführt und mehrmals mit 1 x PBS, durch Absetzen lassen und wieder Auffüllen, gewaschen. Die *Protoscolices* können entweder in etwas 1 x PBS resuspendiert und von der Gaze abgesaugt oder von dieser durch Abspülen in ein frisches Becherglas überführt werden.

Die *Protoscolices* werden in ein 50 ml Kunststoffröhrchen überführt und mehrmals durch Absetzen lassen und erneutes Auffüllen mit 1 x PBS gewaschen. Normalerweise sind die *Protoscolices* jetzt sehr sauber und fast frei von Verunreinigungen (mikroskopische Kontrolle). Um auch die letzten störenden Verunreinigungen zu entfernen, werden die *Protoscolices* in 1 x PBS aufgeschüttelt und kleine Mengen davon in eine Petrischale gegeben (Flüssigkeitsstand etwa 5 mm). Durch langsames Kreisen der Petrischale sammeln sich die *Protoscolices* in der Mitte und können mit einer Pipette abgesaugt werden. Wenn das immer noch nicht sauber genug ist, kann die *Protoscolices* natürlich auch unter dem Mikroskop oder einem Binokular einzeln picken.

**Aktivierung der *Protoscolices*:** *Protoscolices* in 25 ml 0,05% Pepsin/MEM überführen, Inkubation für 30', 37°C, 125 rpm. Danach 3x mit 1xPBS waschen, dann die *Protoscolices* in 25 ml 0,2% Natrium-Taurocholat/MEM aufnehmen, Inkubation 3h, 37°C, 125 rpm. Abschließend 3x mit 1x PBS waschen.

## 5.10 *In vitro* Co – Kultivierung von *E. multilocularis*

### 5.10.1 Co-Kultivierung von Metacestodenesikeln mit Fütterzellen

Die Metacestodenesikel wachsen und entwickeln sich in Gegenwart von Fütterzellen wie zum Beispiel Rattenhepatozyten (Reuber: RH<sup>7</sup>). In der hier beschriebenen, von der Sandwich-Methode, bei der das Parasitenmaterial und die Fütterzellen zwischen zwei Schichten aus Kollagen gegossen werden [169], abgeleiteten Flüssigkultur-Methode wird kein Kollagen verwendet. Die Metacestodenesikel schwimmen frei im Medium während die Fütterzellen am Boden der Zellkulturflasche adhären. Der Vorteil gegenüber der Sandwich-Methode liegt an dem geringeren Arbeitsaufwand, der besseren Handhabbarkeit, in dem leichten Zugang zu den Metacestodenesikeln und der großen Ausbeute an Metacestodenesikeln, die erreicht werden kann.

#### Anleitung Co-Kultur:

Etwa 1 ml des passierten und mit Antibiotika behandelten Metacestodengewebes wird in 50 ml Medium B (DMEM, 10% FCS, 100U/ml PenStrep) aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Anschließend werden 1x10<sup>7</sup> frisch trypsinisierte Rattenhepatozyten (Reuber) dazu gegeben und die Flasche bei 37°C in einem Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) bebrütet. Der erste Medienwechsel erfolgt nach 10-20 Tagen, anschließend wird das Medium wöchentlich, durch Absetzen lassen des Metacestodenmaterials in einem 50 ml Greiner Röhrchen, Verwerfen des Überstandes und Auffüllen mit frischem Medium B, gewechselt (möglichst lange die gleiche Kulturflasche verwenden). Bei jedem Wechsel werden einige Tropfen frisch trypsinierter Hepatocyten zu der Kultur gegeben. Während dem Wechsel muß auf schwimmende Vesikel geachtet werden, die abgesiebt werden können.

Die Metacestodenesikel, die als blasige Struktur zu erkennen sind, wachsen in 2-3 Schüben heran. Innerhalb der ersten 1-3 Wochen wachsen diejenigen, die die Verarbeitungsprozedur überstanden haben und schon in dem Gerbil vorhanden waren. Oft enthalten sie Einschlüsse wie Calciumkörperchen, Brutkapseln und *Protoscolices*, haben eine sehr grobe Abgrenzung oder sind von nicht kugelförmiger Gestalt. In den folgenden Wochen entwickeln sich dann kleine, 2-4 mm messende Metacestodenesikel, die frei von Einschlüssen und Ähnlichem sind. Neben den Metacestodenesikeln sind in den Kulturflaschen noch *Protoscolices*, Calciumkörperchen, Gerbilmaterial und weitere Verunreinigungen die für manche Anwendungen entfernt werden müssen. Dafür werden die Metacestodenesikel sehr vorsichtig durch ein Teesieb gesiebt (d.h. langsam und mit der Gefäßöffnung sehr nah am Sieb, damit der Fallweg sehr gering ist). Der Durchfluss wird zurück in die Flasche gegeben und, wenn sich 2-3 Wochen später erneut Vesikel gebildet haben, nochmals gesiebt. Die gesiebten Metacestodenesikel werden 2-3 mal vorsichtig mit 1xPBS ge-

waschen. Dafür wird das Sieb gekippt und über dessen konvexen Seite 1×PBS gegossen. Dabei lösen sich die Vesikel aus dem Sieb und können in einem Becherglas aufgefangen werden. Das Becherglas wird mit 1×PBS gefüllt und der Inhalt anschließend wieder sehr vorsichtig gesiebt. Nach den Waschschritten werden die Metacestodenvesikel mit Medium B vom Sieb gelöst und in eine neue Flasche, die mit Hepatocyten konfluent bewachsen ist, überführt. Jetzt sind sie weitgehend frei von mitgeschlepptem Gerbilgewebe oder unspezifischem Metacestodenmaterial (beides wächst nicht oder nur sehr langsam).

Während die Vesikel in PBS vorliegen, können sehr leicht kaputte Zysten an ihrer gelblich bis roten Farbe, die durch Aufnahme von Medium herrührt, identifiziert und heraus sortiert werden. Intakte Metacestodenvesikel sind in 1×PBS farblos.

Medienwechsel und Splitten der Co-Kulturen: 1-3 mal wöchentlich wird das verbrauchte Medium durch Absetzen lassen des Metacestodenmaterials in einem 50 ml Greiner Röhrchen, Verwerfen des Überstandes und Auffüllen mit frischem Medium B, gewechselt. Sterben die Hepatocyten, was an einem Farbumschlag des, dem Medium beigeetzten, Indikators von rot nach gelb, sowie einem Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu erkennen ist, müssen die Metacestodenvesikel sofort in eine neue, mit Hepatocyten bewachsene, Flasche überführt werden. Besser ist es jedoch, das Medium zu wechseln wenn es noch rot oder höchstens orangerot ist. Eine Färbung des Mediums in Richtung dunkelrot-violett tritt meist dann auf, wenn am Flaschenboden keine Hepatocyten mehr am Leben sind und auch die Metacestodenvesikel tot oder fast tot sind. In einer idealen Co-Kultur färbt sich das Medium nach etwa 4-7 Tagen orangerot, was natürlich auch von der Gesamtmenge an stoffwechselaktiven Zellen und Metacestodenvesikeln abhängt. Spätestens wenn die Menge an Metacestodenvesikeln 20 ml je 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche übersteigt, sollten diese gesplittet werden. Sind mehr als 25 ml Vesikel in einer Flasche, dann wachsen diese nicht mehr.

### 5.10.2 sterile Adultstadien von *E. multilocularis*

Sterile Adultstadien differenzieren sich während einer Kultivierung in Gegenwart von humanen Fibroblasten (Hep2). Wichtig ist eine möglichst alte Fibroblastenkultur, in der die Zellen an der Flasche in Höhe des Flüssigkeitspegels gelbliche Wülste bilden. 1x wöchentlich oder wenn das Medium gelb ist (niedriger pH-Wert) wird die Hälfte des Mediums gewechselt. Ein Transfer in frische Hepatocytenkulturen bewirkt eine metacestodenvesikelartige Aufblähung der Proglottiden. Das gleiche passiert, wenn zuviel frisches Medium zugegeben wird.

In dem ersten der hier beschriebenen Versuche wuchsen zuerst Metacestodenvesikel, die Protoscolices bildeten, aus welchen sich dann die sterilen Adultwürmer differenzierten. Daher kann für diese Beobachtung auch die Anwesenheit von Metacestodenvesikeln in der Kultur wichtig sein.

Im zweiten Versuch differenzierten sich Protoscolices aus einer passierten in vivo Kultur zu sterilen Adultwürmern. Eingesetzt wurde frisch isoliertes Echinokokkenmaterial, in dem sich eine große Anzahl Protoscolices befand. Verwendet wurde eine über 3-4 Wochen kultivierte Hep2-Kultur.

### 5.11 Axenische Kultivierung von *E. multilocularis*

Im Gegensatz zur Co-Kultivierung, in der Metacestodenvesikel gemeinsam mit Fütterzellen kultiviert werden, wachsen die Metacestodenvesikel unter axenischen Bedingungen ohne Fütterzellen. Da sie für ein gutes Wachstum aber bestimmte, bisher unbekannte Faktoren der Hepatozyten benötigen, werden sie in Medium kultiviert, das zuvor mit Hepatozyten konditioniert wurde (cMEM). Zusätzlich muß für reduzierende bedingungen gesorgt werden. Dafür wird dem Medium L-Cystein, 10 µM Bathocuproinedisulfonic-Acid und βMercaptoethanol zugegeben und die Gasphase des Kulturgefäßes durch Stickstoff ersetzt.

### 5.11.1 Medien für die axenische Kultivierung

**Reduzierende Bedingungen (ax):** Eine axenische Kultivierung von Metacestodeneskelen ist bisher nur unter reduzierenden Bedingungen möglich. Daher müssen den verwendeten Medien reduzierende Agenzien zugesetzt werden. Das beste Wachstum sowie das längste Überleben konnte nach einer Zugabe von 100  $\mu$ M L-Cystein (100 mM-Stock: 12.1 mg/ml, 1  $\mu$ l/ml einsetzen), 10  $\mu$ M Bathocuproinedisulfonic-Acid (10 mM-Stock 5.6 mg/ml, 1  $\mu$ l/ml einsetzen) und 0,01%  $\beta$ -Mercaptoethanol (1:100 Verdünnung in H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ l/ml einsetzen) erreicht werden. Sämtliche Stocklösungen werden sterilfiltriert.

**Medium A (MEM) :** Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM, GIBCO BRL), und einem Zusatz von 100 U/ml Penicillin G und 100 U/ml Streptomycin (PenStrep, Biochrom KG, 10.000U/ml).

**Medium B (dMEM):** Medium A mit einem 10 prozentigem Anteil an fötalem Kälberserum (FCS, GIBCO BRL, 30 Minuten bei 58°C inaktiviert).

**Medium C (cMEM):** Medium B das zwischen 48 Stunden und 7 Tagen in der Anwesenheit von Fütterzellen konditioniert wurde. Dabei geben die Fütterzellen verschiedene Faktoren ins Medium ab oder verändern dessen Zusammensetzung auf andere Weise. Besonders gutes Wachstum von Metacestodeneskelen ist unter axenischen Bedingungen mit einem über 7 Tage auf Rattenhepatozyten (Reuber, RH) konditionierten Medium zu erreichen. Dafür werden  $1-4 \times 10^6$  RH-Zellen in eine 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät und 50 ml Medium B zugegeben. Nach 7 Tagen Inkubation bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) wird das Medium abgenommen, 5 min bei 1000 g zentrifugiert und das resultierende Pellet verworfen. Der Überstand wird sterilfiltriert (0,2  $\mu$ m) und kann entweder direkt eingesetzt oder bei -20°C bis -80°C gelagert werden. Auf jeden Fall ist darauf zu achten, das Medium vor dem Einfrieren steril zu filtrieren, da verschleppte Fütterzellen durch die sich bildenden Eiskristalle zerstört werden können und dadurch das Medium mit Cytosolbestandteilen verunreinigt wird.

### 5.11.2 Herstellung und Umgang mit axenischen Metacestodeneskelen

Für die Herstellung von axenischen Metacestodeneskelen müssen eigentlich nur die Fütterzellen entfernt werden. Die Fütterzellen verhalten sich aber sehr unterschiedlich. Während sich Rattenhepatozyten (RH) sehr leicht von den Metacestodeneskelen trennen lassen sind z.B. humane Hep G2 – Zellen sehr hartnäckig und nicht zu entfernen, da sie auf der Oberfläche der Vesikel adhären.

Metacestodeneskel die in Co-Kultur auf einen Durchmesser von 2-4 mm (entspricht etwa 10-20  $\mu$ l Volumen) gewachsen sind werden 3-5 mal sehr vorsichtig durch ein Teesieb oder besser noch durch eine 150  $\mu$ m Gaze gesiebt. Der Durchfluss wird jedes mal verworfen (bis auf den ersten, der kommt zurück in die Flasche) und die Vesikel mit etwa 100 ml DMEM (Medium A) oder 1xPBS vorsichtig vom Sieb gelöst (von hinten) und in einem Becherglas aufgefangen. Während dieser Waschschritte werden die meisten der im Medium frei schwimmenden Fütterzellen entfernt.

Nach dem letzten Waschschritt werden bis zu 10 ml Metacestodeneskel in MediumCax, das alle Zusätze für eine axenische Kultivierung enthalten muss, aufgenommen und in eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt (Gesamtvolumen 50 ml). Anschließend wird die Flasche mit Stickstoff begast und bei 37°C inkubiert.

Dem Waschen entgangene Fütterzellen adhären am Flaschenboden, deshalb muss alle zwei Tage das Medium und die Flasche gewechselt werden. Nach 3-6 Wechseln sind die Kulturen axenisch, was über Tests nachgewiesen werden kann. Mikroskopisch sollten natürlich keine Zellen

zu sehen sein, auch nicht außen auf den Metacestodenvesikeln. In gebrauchten Flaschen, die mit 20ml frischem MediumB bei 37°C bebrütet werden dürfen keine Zellinseln wachsen.

Wichtig: RH<sup>-</sup> - Zellen nehmen, HepG2 funktionieren nicht (wachsen auf den Metacestodenvesikeln) und andere Zellen sind noch nicht getestet. MediumC ax funktioniert besser als MediumB ax, zumindest bei H95. Niemals die Zusätze vergessen. Immer mit Stickstoff begasen, O<sub>2</sub> ist tatsächlich schädlich.

### 5.11.3 Aufbau eines axenischen Versuchs

In der hier beschriebenen Versuchsanordnung lässt sich der Einfluss verschiedener löslicher Faktoren auf das Wachstum und die Differenzierung von *E. multilocularis* Metacestodenvesikeln *in vitro* studieren. Die axenischen Bedingungen ermöglichen Beobachtungen ohne den möglicherweise störenden Einfluss von Fütterzellen. Jeder Versuch gliedert sich in drei Teile. Zuerst muss eine axenische Metacestodenkultur hergestellt und daraus geeignete Vesikel geerntet werden. Darauf folgt der eigentliche Versuch, in dem die Metacestodenvesikel unterschiedlichen Faktoren oder Wachstumsbedingungen ausgesetzt werden. Veränderungen in Wachstum und Differenzierung werden registriert und können dann abschließend ausgewertet werden. Durch Probennahme während des Versuchs können z.B. Sekretionsprofile, Expressions- oder Transkriptionsuntersuchungen durchgeführt werden.

### 5.11.4 Die „richtigen“ Metacestodenvesikel

Die wie in Kapitel 5.11.2 hergestellten axenischen Metacestodenvesikel sind in ihrer Qualität sehr heterogen. Für einen Versuch sind oft nur 5 – 30% der vorhandenen Vesikel geeignet. Diese müssen mit einer sterilen abgeschnittenen 1ml Eppendorff-Spitze unter dem Mikroskop gesammelt werden. Dafür werden axenische Vesikel in eine sterile Petrischale überführt und aus dieser unter einem geeigneten Mikroskop oder einem Binokular möglichst kontaminationsfrei gepickt. Ausschlaggebend für einen erfolgreichen Versuch sind die Metacestodenvesikel, die eingesetzt werden. Manchmal sterben während eines Versuchs viele Vesikel ab, ohne dass ein Grund dafür erkennbar ist. Oft ist das von der Charge oder auch dem verwendeten Isolat abhängig. Es ist zum Beispiel möglich, dass Vesikel aus einer Flasche unter axenischen Bedingungen hervorragend wachsen, während die aus einer anderen Flasche schon nach wenigen Tagen sterben. Das ist sehr ärgerlich und daher ist es sehr wichtig, schon im Vorfeld nur solche Vesikel auszusuchen, die erfolgsversprechend sind.

Richtlinien für die erfolgreiche Wahl von Metacestodenvesikeln:

1. Die Vesikel sollen rund und unverletzt sein. Weiterhin sollen sie klar durchscheinend sein und eine dünne Vesikelabgrenzung haben. Schwimmende Vesikel sind überdurchschnittlich häufig sehr gut geeignet. Daher kann es sich lohnen diese schon frühzeitig auszusortieren (Abschütten aus einem 50 ml Kunststoffgefäß, anschließend sieben).
2. Die Vesikel sollten natürlich frei von kontaminierenden Zellen sein.
3. Die Vesikel dürfen keine seltsamen Formen, kraterartige Veränderungen, Tochtervesikel, Gewebefetzen, Einschlüsse, Trübungen, Kalziumkörperchen, Brutkapseln oder Protoscolices haben.
4. Kleine blasige Strukturen im Inneren, die sehr leicht mit jungen Brutkapseln zu verwechseln sind sowie weiße flächige Trübungen der Vesikeloberfläche sind Indizien für bald sterbende Metacestodenvesikel. Diese Vesikel sehen zwar auf den ersten Blick oft gut aus, sind es aber nicht.
5. Für jeden Versuchsansatz nur Vesikel aus einer Charge verwenden. Niemals mischen!

### 5.11.5 Versuchsablauf

Der Versuch besteht aus 3 Teilen. Zuerst werden perfekte Metacestodenvesikel ausgewählt. Diese werden anschließend verschiedenen interessanten Wachstumsbedingungen ausgesetzt. Während dieser Zeit wird das Wachstum der Vesikel sowie eventuelle Differenzierungen festgehalten. Am Ende wird der Versuch ausgewertet.

#### Tag 1: Picken und Vorbereitung der Metacestodenvesikel

Je nach Versuch werden zwischen 1 und 10 perfekte Metacestodenvesikel in 48-Napf Schalen gepickt. Das Medium wird vorsichtig abgenommen und durch 1-2 ml frisches MediumCax ersetzt. Dies ist die letzte Kontaminationskontrolle, die eventuell übrige Fütterzellen, vor allem aber eventuelle Pilz- oder Bakterienkontaminationen, die durch das Picken eingeführt werden können, detektieren soll. Außerdem können kaputte Vesikel erkannt und entfernt werden. Die 48-Napf Schale wird in einen Plastikschlauch gegeben, dieser mit Stickstoff gefüllt und verschweißt. Der Schlauch wird samt Schale anschließend 48 Stunden bei 37°C bebrütet. Kontaminationen sind oft schon an der gelben Verfärbung des Mediums zu erkennen.

Wer sich sicher ist, sauber zu arbeiten kann die Metacestodenvesikel gleich in 15 ml Kunststoffröhrchen picken. Je nach Versuchsanordnung werden jeweils 1 bis 10 Vesikel in 15 ml Kunststoffröhrchen überführt. In diesen Röhrchen findet der Versuch statt. Die Röhrchen werden mit Stickstoff begast und 48 h bei 37°C inkubiert. Dabei fallen eventuell beim Picken verletzte Vesikel in sich zusammen und können aussortiert werden.

#### Tag 3 – Ende:

Für den Versuch werden jetzt jeweils 1 bis 10 Vesikel aus der 48-Napf Schale in 15 ml Kunststoffröhrchen überführt (entfällt natürlich wenn sie schon drin sind). Das Medium wird sehr vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Vesikelvolumen am Gefäßrand markiert. Ideal sind 100 – 200 µl Vesikelvolumen ohne Medium.

Prinzipiell ist es möglich, mit nur einem Vesikel pro Gefäß einen Versuch durchzuführen, es ist jedoch schwer, das Volumen genau zu bestimmen. Außerdem ist eine einigermaßen sichere Volumenbestimmung erst ab etwa 100 µl möglich. Diese 100 µl werden durch etwa 5 Vesikel erreicht. Für vergleichbare Ergebnisse sollten in jedem Gefäß gleich viele Vesikel sein und diese auch ein annähernd gleiches Volumen haben.

Die Röhrchen werden mit 1 bis 4 ml Medium befüllt (verschiedenste Medien, je nach Fragestellung), mit Stickstoff begast und bei 37°C bebrütet. Die Medien werden drei mal pro Woche gewechselt (Mo/Mi/Fr). Dabei wird das Medium vorsichtig mit einer 10ml Pipette abgesaugt. Nach jedem Wechsel muß das Volumen und die Zahl der Vesikel notiert werden. Durch eine mikroskopische Kontrolle können verschiedene Differenzierungen (z.B. eine unterschiedlich schnelle Protoscolexentwicklung) beobachtet werden. Bei optimalen Wachstumsbedingungen können 5 Vesikel nach 4 bis 6 Wochen ein Volumen von 4 ml einnehmen.

#### Wichtig:

1. Steril arbeiten!
2. Reduzierende Bedingungen, anders klappt es nicht.
3. Mit Stickstoff begasen. Sauerstoff schadet. Deckel gut schließen.
4. Jeder Ansatz muss mindestens doppelt angesetzt werden. Als Kontrollen sollten immer die jeweiligen Medien ohne Zusätze sowie eine Totkontrolle (MediumA, Metacestodentod nach spätestens 14 Tagen) mitlaufen.



5. Pipetten wechseln, Kontaminationen vermeiden.
6. Nicht an die Röhren schnippen, die Metacestodenvesikel sind empfindlich.

### 5.11.6 Auswertung von Wachstum und Differenzierung

Wachstum:

Das Volumen einzelner Vesikel kann sehr einfach und genau mit einer Pipette bestimmt werden. Der Vesikel wird eingesaugt und das Volumen durch Verstellen der Pipette ermittelt. Da mit dieser Methode die Vesikel zerstört werden, eignet sie sich nur zur Feststellung des durchschnittlichen Vesikelvolumens zu Beginn eines Versuchs oder zur exakten Volumenbestimmung am Ende eines Versuchs

Bei Versuchen mit jeweils nur einem Vesikel sollten diese ein Volumen von etwa 20 µl haben. Kleinere Unterschiede sind nicht so relevant, da das Volumen nach 4 – 6 Wochen auf über 2 ml je Vesikel anwachsen kann. Das Volumen einzelner Vesikel kann anhand der ml Einteilung auf den Plastikgefäßen erst ab einem Volumen von etwa 100 µl sicher bestimmt werden.

Für einen Ansatz mit mehreren Metacestodenvesikeln eignet sich die ml Einteilung des Plastikröhrchens sehr gut. 5 – 10 Vesikel haben Anfangs ein Volumen von 80 – 200 µl. Bei jedem Medienwechsel kann das Volumen dann sehr leicht abgelesen werden.

Anhand des Gesamtvolumens und der Anzahl der Vesikel kann ein Durchschnittsvolumen je Vesikel berechnet werden. Dabei macht es dann nichts aus, wenn einige Vesikel während des Versuchs sterben. Auffällige Ausreißer sollten jedoch ausgenommen werden. Auch bei parallelen Ansätzen mit Einzelvesikeln kann ein Durchschnittswert je Vesikel ermittelt werden.

#### Differenzierung:

Mikroskopische Beobachtung von Brutkapselbildung oder anderen sichtbaren Veränderungen.

### 5.11.7 Axenische Kultur: Kurzanleitung

1. Metacestodenvesikel in Co-Kultur heranziehen und von Verunreinigungen durch Sieben befreien.
2. Vesikel mehrmals sehr gut waschen um Fütterzellen zu entfernen. Vesikel mit MediumCax (konditioniertes Medium mit Zusätzen die für reduzierende Bedingungen sorgen) in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche geben, mit Stickstoff begasen und 2 Tage bei 37°C bebrüten. 3 – 6 mal, jeweils nach 2 Tagen Medium und Flasche wechseln.
3. Die perfekten Metacestodenvesikel picken und 48h (MediumCax, Stickstoff) bebrüten. Danach eventuelle Kontaminanten und kaputte Vesikel entfernen.
4. Gewünschte Zahl an Vesikeln in 15 ml Kunststoffröhrchen geben, Medium vollständig abnehmen und Vesikelstartvolumen markieren.
5. Versuch durchführen. Medien 3 x wöchentlich (Mo/Mi/Fr) wechseln. Volumen und Vesikelzahl mind. 1x wöchentlich notieren, Differenzierung mikroskopisch verfolgen.

## 5.12 Herstellung von Echinokokken-Primärzellen

Ein Problem bei der Isolierung von Echinokokken-Zellen aus *in vivo* gewonnenem Parasitenmaterial ist die Gefahr kontaminierender Wirtszellen. In der Praxis geschieht genau das. Vor allem Fibroblasten und andere sich schnell teilende Zellen des Wirts überwuchern das Gefäß und die Echinokokken-Zellen wodurch eine Unterscheidung oder Auftrennung nicht mehr möglich ist. Das gleiche Problem entsteht bei dem Versuch Echinokokken-Zellen aus einer *in vitro* kultivierten Co-Kultur zu isolieren. Die Hepatocyten sind schneller. Durch die Etablierung des axenischen Kultursystems besteht jetzt die Möglichkeit Echinokokken-Gewebe zu verwenden, das frei von kontaminierenden Zellen ist.

Für die Isolierung von Echinokokken-Zellen werden axenische Metacestodenvesikel (1) oder sehr sehr gut gewaschene Protoscolices (2) aus *in vitro* gewonnenem Echinokokkenmaterial verwendet.

1. Die Metacestodenvesikel werden vorsichtig mit einer 10 ml Pipette in einem 50 ml Greiner-Röhrchen resuspendiert und dabei mechanisch zerstört. Dann werden die Metacestodenvesikelreste durch Zentrifugation (10', 400 - 1000g) von der Hydatidenflüssigkeit getrennt und sehr vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen. Jetzt gibt es zwei Möglichkeiten, entweder man gibt 1 x PBS dazu und schüttelt das Röhrchen 5-10 min kräftig, wobei sich einzelne Zellen und kleinere Zellverbände von der Lamellären Schicht lösen oder man gibt reichlich Trypsin-EDTA dazu wodurch die Oberflächenproteine der Zellen abgespaltet werden und Einzelzellen freigesetzt werden. In beiden Fällen werden die Zellen von grobem Material über eine Siebung durch Gaze (30 µm) getrennt. Durch eine Zentrifugation (10', 400 - 1000g) werden die Zellen pelletiert und entweder in Hydatidenflüssigkeit oder c-MEM aufgenommen. Zellen in Hydatidenflüssigkeit wachsen unter reduzierenden Bedingungen (vergl. axenisches Kultursystem) bei 37°C zu kleinen schwimmenden Zellhaufen. Besonders gut funktioniert das mit Zellen, die aus axenisch kultivierten Metacestodenvesikeln isoliert wurden. Zellen die in c-MEM aufgenommen wurden wachsen nicht ohne Fütterzellen und sterben nach kurzer Zeit ab. Diese Zellen wachsen jedoch sehr gut in einem Transwell-System mit einer Porengröße von 30 µm zu großen gewebeartigen Strukturen heran. Dafür werden die Echinokokken-Zellen gemeinsam mit Hepatocyten, nur getrennt durch die perphorierte Membran, bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Wachstum und Überleben der Echinokokken-Zellen kann so weit über 10 Wochen lang beobachtet werden.
2. Protoscolices sind nicht einfach zu knacken. Vor einem Trypsin-Verdau schützen sie sich durch Schleimbildung und anschließende unlösbare Aggregation. Daher müssen sie zuerst mechanisch zerstört werden, zum Beispiel durch Zerreiben mit einer 30 µm Gaze. Dann wird Trypsin-EDTA in großer Menge dazu gegeben und mindestens 30' bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wird dann durch eine 30 µm Gaze gesiebt und die Einzelzellen anschließend durch eine Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wird wie unter Punkt 1 beschrieben in Hydatidenflüssigkeit oder c-MEM gelöst und weiter kultiviert.

## 5.13 Vektorsequenzen

### 5.13.1 pSecTag2/Hygro A,B,C (Invitrogen)

Vektor für die Expression von Proteinen in Säugerzellen. Proteine, die mit der vektorcodierten Signalsequenz (Ig  $\kappa$ -chain leader sequence) fusioniert vorliegen, werden aus der Zelle geschleust.

#### pSecTag2/Hygro A (MCS):

```

          ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
          969  GCGGCCCAGC CGGCCAGGCG CGCCGTACGA AGCTTGGTAC CGAGCTCGGA
                                v.R.          Kpn1
                                Not1
          1019 TCCACTCCAG TGTGGTGGAA TTCTGCAGAT ATCCAGCACA GTGGCGGCCG
          1069 CTCGAGGAGG GCCCGAACAA AAACTCATCT CAGAAGAGGA TCTG

```

#### pSecTag2/Hygro Oligonucleotide

T7 promotor Primer (5')	pSecTag2/Hygro A bp 864 - 883	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH reverse Primer (3')	pSecTag2/Hygro A bp 1185- 1168	TAGAAGGCACAGTCGAG

#### Klone:

emer: 5' Kpn1, 3' Not1 (C-terminales Stop Codon TAA)

5' Kpn1- **GGTACC**TTTTAAGCTATCC.....TAAACCCGTTTAA**GCGGCCGC** - 3' Not1  
 ..L..P..F..K..L..S.....

HsErbB3: 5' Kpn1, 3' Not1 (C-terminale Fusion mit Myc-Epitop und His-Tag)

5' Kpn1- **GGTACC**AGAGGTGGGCAAC.....TGCCCAGAGAAC**GCGGCCGC** - 3' Not1  
 ..L..P..E..V..G..N.....

Chimäre 1: HsErbB3 5' Kpn1, emer 3' Not1 (C-terminales Stop Codon TAA)

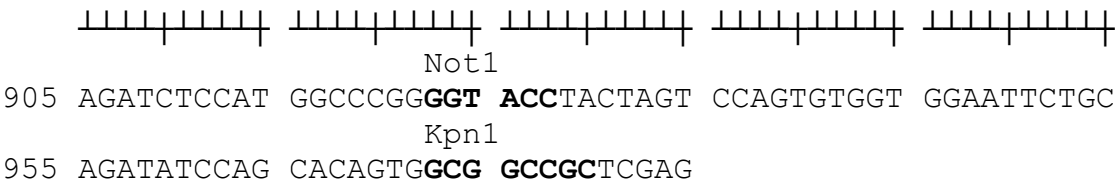
5' Kpn1- **GGTACC**AGAGGTGGGCAAC.....TAAACCCGTTTAA**GCGGCCGC** - 3' Not1  
 ..L..P..E..V..G..N.....

Chimäre 2: emer 5' Kpn1, HsErbB3 - 3' Not1 (C-terminale Fusion mit Myc-Epitop und His-Tag)

5' Kpn1- **GGTACC**TTTTAAGCTATCC.....TGCCCAGAGAAC**GCGGCCGC** - 3' Not1  
 ..L..P..F..K..L..S.....

**5.13.2 pMT/BiP/V5-His A,B,C (Invitrogen)**

Induzierbare Expression von sekretierten Proteinen in Drosophila Zellen.

**pMT/BiP/V5-His C (MCS):**

## pMT/BiP/V5-His Oligonucleotide

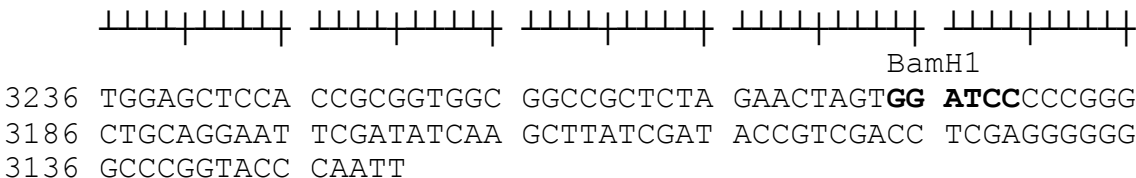
MT forward Primer (5')	pMT/BiP/V5-His bp 814 - 831	CATCTCAGTGCAACTAAA
BGH reverse Primer (3')	pMT/BiP/V5-His bp 1112 - 1095	TAGAAGGCACAGTCGAGG

**5.13.3 pB3385 und pB3386 Hefevektoren (Hum, ATCC 77106)**

Vektoren für Komplementationsversuche.

pB3385 (pRS 426, Gal1, Leu2): EmRaf, EmErk-A/B

pB3386 (pRS 425, Gal1, Ura3): EmRas, EmRal, EmRap1, EmRap2, EmMKK A/B, Em1433-2

**pB3385 und pB3386 (MCS):**

## Hum Oligonucleotide (B3385, B3386)

Hum seq dw (T3)	pRS 425 DNA 3366 - 3346	GCTTTACTTTATGCTTCCG
Hum seq up (Topo T7)	pRS 425 DNA 3200 - 3219	TAATACGACTCACTATAGGG

## Klone:

## 3385 Raf:

5' - BamH1- **GGATCC**AAAAAAATGATCGACAA . . . . AAGGTCCAATGA**GGATCC** - 3' - BamH1

## 3385 Erk-A:

5' - BamH1- **GGATCC**AAAAAAATGAGTGGTGAT . . . . GATGCAGGTTGA**GGATCC** - 3' - BamH1

## 3385 Erk-B:

5' - BamH1- **GGATCC**AAAAAAATGAGTGGTGAT . . . . ATTGTCGTATGA**GGATCC** - 3' - BamH1

3386 MKK-A/B:

5' - BamH1- **GGATCC**AAAAAAAAATGTCAGCCGTT . . . . .GATCACCAATGAG**GGATCC** - 3' - BamH1

3386 Ral-4:

5' - BamH1- **GGATCC**AAAAAAAAATGACTCAACAG . . . . .AAGATTTTGTA**GGATCC** - 3' - BamH1

3386 Ras-3 (pMSHUM-EmRas):

5' - BamH1- **GGATCC**AAAAAAAAATGCCTGAGTAC . . . . .CATCTGCTGTAG**GGATCC** - 3' - BamH1

3386 Rap1-1:

5' - BamH1- **GGATCC**AAAAAAAAATGCGAGACTAC . . . . .AGCATCTGCTAG**GGATCC** - 3' - BamH1

3386 Rap2-K13-4:

5' - BamH1- **GGATCC**AAAAAAAAATGGACGAATAC . . . . .GCTATCCTCTGA**GGATCC** - 3' - BamH1

3386 1433-2:

5' - BamH1- **GGATCC**AAAAAAAAATGGCAGCTATC . . . . .ACCGACTCCTAA**GGATCC** - 3' - BamH1

### 5.13.4 pCS2 + MT

Vektor für die Expression von Proteinen in Säugerzellen. Proteine werden je nach verwendeter Schnittstelle N- oder C-terminal mit sechs Myc - Tags fusioniert.

#### pCS2 + MT (MCS):

1	AAGCTTGATT	TAGGTGACTC	TATAGAATAC	AAGCTACTTG	TTCTTTTTGC
	BamH1				
51	<b>AGGATCC</b> CAT	CGATTTAAAG	CTATGGAGCA	AAAGCTCATT	TCTGAAGAGG
101	ACTTGAATGA	AATGGAGCAA	AAGCTCATT	CTGAAGAGGA	CTTGAATGAA
151	ATGGAGCAA	AGCTCATTTC	TGAAGAGGAC	TTGAATGAAA	TGGAGCAAAA
201	GCTCATTCT	GAAGAGGACT	TGAATGAAAT	GGAGCAAAAG	CTCATTCTG
251	AAGAGGACTT	GAATGAAATG	GAGAGCTTGG	GCGACCTCAC	CATGGAGCAA
			EcoR1		
301	AAGCTCATT	CTGAAGAGGA	CTT <b>GAATTCA</b>	AGGCCTCTCG	QAGCCTCTAG
351	AACTATAGTG	AGTCGTATTA	CGTA		

#### pCS2 + MT (SK) Oligonucleotide

pCS2 MT 5' - 1 (dw)	pCS2 + MT (s.o.) bp 7-30	GATTAGGTGACTCTATAGAATAC
pCS2 MT 5' - 2 (dw)	pCS2 + MT (s.o.) bp 13-33	GGTACTCTATAGAATACAAG
pCS MT2 - 3' (up)	pCS2 + MT (s.o.) bp 371-350	GTAATACGACTCACTATAGTTC
pCS2-SP6	pCS2 + MT (s.o.) bp 7-25	GATTAGGTGACTCTATAG
pCS2-MT-RR67	pCS2 + MT (s.o.) bp 273-289	GAGCTTGGGCGACCTCACCATG
pCS2-T7 rev	pCS2 + MT (s.o.) bp 371-353	GTAATACGACTCACTATAG

Klone:

SK Erk-A 3-1N (5' Fusion mit 6 × Myc)

5' - EcoR1 - **GAATTC**AATGAGTGGT . . . . . GATGCAGGTTGAG**GAATTC** - 3' - EcoR1

SK MKK-A 21-4, 21-5, 21-9 (5' Fusion mit 6 × Myc)

5' - EcoR1 - **GAATTC**GATGTCAGCC . . . . . GATCACCAATGAG**GAATTC** - 3' - EcoR1

SK Raf mut2 - 5/9 (5' - Kozak - Sequenz, 3' Fusion mit 6 × Myc)

5' - BamH1 - **GGATCC**GCCGCCATGGATCGA . . . . . AAAGTCCA**GGATCC** - 3' - BamH1

### 5.13.5 pGADT7 und pGBKT7 (Clontech)

Yeast-2-Hybrid Vektoren für Interaktionsstudien von Fusionsproteinen in Hefen.

pGADT7 (AD): GAL4 Aktivierungsdomäne, Amp<sup>R</sup>, HA - Tag

pGBKT7 (BD): GAL4 DNA-Bindungsdomäne, Kan<sup>R</sup>, Myc - Tag

#### pGADT7 (MCS):

```

      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      HA - Epitop                                EcoR1
1948 TACGACGTAC CAGATTACGC TCATATGGCC ATGGAGGCCA GTGAATTCCA
                                BamH1
1998 CCCGGGTGGG CATCGATACG GGATCCATCG AGCTCGAGCT GCAGATGAA

```

#### pGBKT7 (MCS):

```

      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      Myc - Epitop
1248 GAGGAGCAGA AGCTGATCTC AGAGGAGGAC CTGCATATGG CCATGGAGGC
      EcoR1          BamH1
1298 CGAATTCCCG GGGATCCGTC GACCTGCAGC GGCCGCATAACTAG

```

#### AD und BD Oligonucleotide

Y2H T7 seq (dw)	AD bp 1905 - 1925 BD bp 1213 - 1235	TAATACGACTCACTATAGGGCGA
Y2H AD seq (AD up)	AD bp 2102 - 2083	AGATGGTCACGATGCACAG
Y2H BD seq (BD up)	BD bp 1494 - 1471	TAAGAGTCACTTTAAAATTTGTAT

Klone:

Erk-A AD: Erk-A BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**ATGAGTGGTGAT . . . . . GATGCAGGTTAGGATCC - 3' – BamH1

Erk-B AD: Erk-B BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**ATGAGTGGTGAT . . . . . ATTGTCGTATAGGATCC - 3' – BamH1

MKK-A AD: MKK-A BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**ATGTCAGCCGTT . . . . . GATCACCAATAGGATCC - 3' – BamH1

MKK-B AD: MKK-B BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**ATGTCAGCCGTT . . . . . GATCACCAATAGGATCC - 3' – BamH1

Raf AD:

5' - Nde1 - **CATATG**ATGGATCGACAA . . . . . AAGGTCCAATAGGATCC - 3' – BamH1

Ral AD: Ral BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**ATGACTCAACAG . . . . . AAGATTTTGTAGGATCC - 3' – BamH1

Rap1 AD: Rap1 BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**ATGCGAGACTAC . . . . . AGCATCTGCTAGGATCC - 3' – BamH1

Rap2 AD: Rap2 BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**ATGGACGAATAC . . . . . GCTATCCTCTAGGATCC - 3' – BamH1

Ras AD: Ras BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**ATGGACGAATAC . . . . . GCTATCCTCTAGGATCC - 3' – BamH1

1433-2 AD: 1433-2 BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**ATGGCAGCTATC . . . . . ACCGACTCCTAGGATCC - 3' – BamH1

emer N-Terminus:AD: BD:

5' - Nde1 - **CATATG**TTTAAGCTA . . . . . CTGGACGAGTAACGGATCC - 3' – BamH1

emer C-Terminus:AD: BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**AAATTACAAG . . . . . AAACCCGTTTAGGATCC - 3' – BamH1

HsErbB3 N-Terminus:AD: BD:

5' - Nde1 – **CATATG**GAGGTGGGC . . . . . CATCTGACATAAACGGATCC - 3' – BamH1

HsErbB3 C-Terminus:AD: BD:

5' - EcoR1 - **GAATTC**AGGCGATAC . . . . . CAGAGAACGTAGGATTC - 3' – EcoR1

### 5.13.6 VEKTOR Ig4-5

Yeast-Two-Hybrid-Vektor, enthält cDNA-Pools

Oligonucleotide

Ig4-5 nest	CTCCCGAATTCGGCACGAG
Jg4-5 dw	GATGCCTCTACCCCTTATGATG
Jg4-3 up	TTGGAGACTTGACCAAACCTCTG
TD Ig4-3	GACCAAACCTCTGGCGAAGAAGTCCAAAG
Ig4-3 nest	CTGGCGAAGAAGTCCAAAG
Jg5-nest2	GATTATGCCTCTCCCGAATTCGG
Jg4-3'- nest	CTGGCGAAGAAGTCCAAAG

### 5.13.7 pBAD /pBAD ThioFusion (Invitrogen)

**pBAD ThioFusion:** Insert über TA-Klonierung bei bp 714, Fusion des Proteins 5' mit Thioredoxin und 3' mit V5-Epitop und 6xHis Tag. Aufreinigung über Nickel-Beads (z.B. Invitrogen). Immunpräzipitation über anti-V5 oder anti Thioredoxi (beide Invitrogen). Fusionspartner 16 kDA.

	10	20	30	40	50	
CTTTGCTATG	CCATAGCATT	TTTATCCATA	AGATTAGCGG	ATCCTACCTG		
ACGCTTTTTTA	TCGCAACTCT	CTACTGTTTC	TCCATACCCG	TTTTTTTTGGG	300	
CTAGAAATAA	TTTTGTTTAA	CTTTAAGAAG	GAGATATACA	TACCCATGGG		
ATCTGATAAA	ATTATTCATC	TGACTGATGA	TTCTTTTGAT	ACTGATGTAC	400	
TTAAGGCAGA	TGGTGCAATC	CTGGTTGATT	TCTGGGCACA	CTGGTGCGGT		
CCGTGCAAAA	TGATCGCTCC	GATTCTGGAT	GAAATCGCTG	ACGAATATCA	500	
GGGCAAACCTG	ACCGTTGCAA	AACTGAACAT	CGATCACAAC	CCGGGCACTG		
CGCCGAAATA	TGGCATCCGT	GGTATCCCGA	CTCTGCTGCT	GTTCAAAAAC	600	
GGTGAAGTGG	CGGCAACCAA	AGTGGGTGCA	CTGTCTAAAG	GTCAGTTGAA		
AGAGTTCCTC	GACGCTAACC	TGGCCGGCTC	TGGATCCGGT	GATGACGATG	700	
ACAAGCTCGC	CCT <b>TA</b> AGGGC	GAGCTTGAAG	GTAAGCCTAT	CCCTAACCCT		
CTCCTCGGTC	TCGATTCTAC	GCGTACCGGT	CATCATCACC	ATCACCATTG	800	
AGTTTAAACG	GTCTCCAGCT	TGGCTGTTTT	GGCGGATGAG	AGAAGATTTT		
CAGCCTGATA	CAGATTAAAT	CA			900	

**pBAD:** Insert über TA-Klonierung bei bp 387, Fusion des Proteins 3' mit V5-Epitop und 6xHis Tag. Aufreinigung über Nickel-Beads (z.B. Invitrogen). Immunpräzipitation über anti-V5 (Invitrogen). Fusionspartner 4 kDA.

	10	20	30	40	50	
CTTTGCTATG	CCATAGCATT	TTTATCCATA	AGATTAGCGG	ATCCTACCTG		
ACGCTTTTTTA	TCGCAACTCT	CTACTGTTTC	TCCATACCCG	TTTTTTTTGGG	300	
CTAGAAATAA	TTTTGTTTAA	CTTTAAGAAG	GAGATATACA	TACCCATGGG		
CTCTGGATCC	GGTGATGACG	ATGACAAGCT	CGCCCT <b>TA</b> AAG	GGCGAGCTTG	400	
AAGGTAAGCC	TATCCCTAAC	CCTCTCCTCG	GTCTCGATTC	TACGCGTACC		
GGTCATCATC	ACCATCACCA	TTGAGTTTTAA	ACGGTCTCCA	GCTTGGCTGT	500	
TTTGCGCGAT	GAGAGAAGAT	TTTCAGCCTG	ATACAGATTA	AATCA		



Oligonucleotide		
pBAD forward	pBAD/pBAD ThioFusion 8-27	ATGCCATAGCATTTTTATCC
pBAD reverse	pBAD 544-527 pBAD ThioFusion 871-854	GATTTAATCTGTATCAGG
pBADup-60C	pBAD 546-527 pBAD ThioFusion 873-855	CTGATTTAATCTGTATCAGGC
PolyT-Thio/pBAD up	pBAD *546-527 pBAD ThioFusion *873-855	G-T <sub>60</sub> -CTGATTTAATCTGTATCAGGC
T7-Kozak-pBAD dw	pBAD *344-367	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCGAAC-CATGGGCTCTGGATCCGGTGATG
T7-Kozak-Thio dw	pBAD ThioFusion *344-370	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCGAAC-CATGGGATCTGATAAAAATTATTCATC
TRX forward	pBAD ThioFusion 655-672	TTCCTCGACGCTAACCTG
TRXdw-60C	pBAD ThioFusion 654-672	GTTTCCTCGACGCTAACCTG

### 5.13.8 pCR 2.1 TOPO (Invitrogen)

#### pCR 2.1: Insert über TA-Klonierung bei bp 294

10		20		30		40		50		
CACACAGGAA	ACAGCTATGA	CCATGATTAC	GCCAAGCTTG	GTACCGAGCT						
CGGATCCACT	AGTAACGGCC	GCCAGTGTGC	TGGAA <b>TTCGC</b>	<b>CCTTAAGGGC</b>	300					
<b>GAA</b> TTCCTGCA	GATATCCATC	ACACTGGCGG	CCGCTCGAGC	ATGCATCTAG						
AGGGCCCAAT	TCGCCCTATA	GTGAGTCGTA	TTACAATTCA	CTGGCCGTCG	400					
TTTTACAACG	TCGTGACTGG	GAAAACCCTG	GCGTTACCCA	ACTTAATCGC						

T7 seq (Topo-T7, Topo- T7 seq)	pCR 2.1 380-361	TACGACTCACTATAGGGCGA
M13 seq (Topo-M13, Topo-M13 seq)	pCR 2.1 205 - 224	CAGGAAACAGCTATGACCAT

## 5.14 EmER

### 5.14.1 EmER - Material und Methoden

Sämtliche molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden finden sich in den Kapiteln 5.1 - 5.13. Die verwendeten Organismen und deren Kultivierung ist in den Kapiteln 5.6 - 5.12 beschrieben. Für Computeranalysen wurden die Programme und Methoden aus Kapitel 5.1 verwendet.

#### Klonierung der *emer*-cDNA und des chromosomalen Locus:

Die Charakterisierung der cDNA-Sequenz und des chromosomalen Locus von *emer* wurde von A. Kroner durchgeführt und in ihrer Promotionsschrift beschrieben [183, 295].

#### Southernblot-Analyse:

Für den Southern-Blot wurde chromosomale *E. multilocularis*-DNA aus *in vivo* gewachsenem Parasitengewebe (DNA-Isolation: 5.1.4, Parasitenmaterial: 5.9.3) verwendet. Jeweils 20 µg der chromosomalen DNA wurden für jeden Restriktionsverdau (NsiI, PstI, SpeI, HindIII, PvuII, TthIII1, XmnI, BglI) eingesetzt (Restriktionsverdau: 5.4.14). Die Auftrennung der DNA-Fragmente, der Transfer auf die Nylon-Membran, die Herstellung und Aufbereitung der Sonden, die Hybridisierung und die verschiedenen Waschschriffe wurden wie unter 5.4.17 beschrieben durchgeführt. Die Sonden für die Hybridisierung wurden über PCR aus chromosomaler Echinokokken-DNA mit den Primern EGR5'4 (5'-CTATCCCTTGCCCCAGAATACG-3', *emer* cDNA: 126-147) × EGR-Tup1 (5'-CACGGCAAGACTACGAAG-3', *emer* cDNA: 524-507) amplifiziert.

#### Nachweis der Echinokokkenspezifität

Für den Nachweis das *emer* ein Echinokokkenfaktor ist, wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestodovesikeln (vergl. 5.10.1) und der Leber eines uninfizierten Gerbils (*M. unguiculatus*) mit dem DNeasy Kit (Qiagen) chromosomale DNA isoliert. Mit jeweils 1 µl (1:100 verdünnt) dieser DNAs als Template wurden PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") durchgeführt, in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Echinokokken-spezifischen Primer für *emer* waren für den N-Terminus EGR5'4 (5'-CTATCCCTTGCCCCAGAATACG-3', *emer* cDNA: 126-147) × EGR-Tup1 (5'-CACGGCAAGACTACGAAG-3', *emer* cDNA: 524-507), die ein PCR-Produkt von ~ 550 bp ergaben sowie für den C-Terminus ER-dw7 (5'-GCACAAGTGGAGCGTGATGAT-3', *emer* cDNA: 4482-4502) × EGR-3' (5'-CACGGCAAGACTACGAAG-3', *emer* cDNA: 4751-4737), mit einem PCR-Produkt von ~500 bp. Für die Gerbil-spezifische PCR wurden die Primer Tub12up (5'-CCCCAAGTGTATGATACTGG-3') und Tub12ST (5'-CTGGGCAGTGC GGCAACCA-3') eingesetzt, die im Gen für β-Tubulin [46] von *M. unguiculatus* binden und ein Produkt von ~1.1 kbp ergaben.

#### Expression von *emer* in verschiedenen Larvenstadien:

**1. Northern-Blot:** Um die Expression eventuelle alternative Spleißformen von *emer* in den zwei Larvenstadien Metacestode und Protoscolex nachzuweisen wurde über den RNeasy-Kit (Qiagen) Gesamt-RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodovesikeln und sehr gut gewaschenen Protoscolices einer *in vivo* Kultur nach Anleitung des Herstellers isoliert und jeweils 15 µg/Tasche in einem Northern-Blot-Experiment eingesetzt. Die Auftrennung der RNA-Fragmente, der Transfer auf die Nylon-Membran, die Herstellung und Aufbereitung der Sonden, die Hybridisierung und die verschiedenen Waschschriffe wurden wie in Kapitel 5.3.7 beschrieben durchgeführt. Der Nachweis erfolgte über [<sup>32</sup>P]-γATP markierte Sonden. Für den extrazellulären Teil mit EGR5'4 (5'-CTATCCCTTGCCCCAGAATACG-3', *emer* cDNA: 126-147) × EGR-Tup1 (5'-CACGGCAAGACTACGAAG-3', *emer* cDNA: 524-507) und für den intrazellulären Teil mit EGR5'4 (5'-CTATCCCTTGCCCCAGAATACG-3', *emer* cDNA: 126-147) × EGR-Tup1 (5'-CACGGCAAGACTACGAAG-3', *emer* cDNA: 524-507).

**2. RT-PCR:** Um die Expression von *emer* während einer Infektion des Zwischenwirts (*M. unguiculatus*) und in den verschiedenen Larvenstadien zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA (vergl. 5.3.1) aus 5 *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln und ~ 50 frisch isolierten *in vivo* kultivierten Protoscolices isoliert und mit dem Omniscript RT-Kit (Qiagen) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (vergl. 5.3.5) und auf die gleiche Konzentration eingestellt (über kompetitive PCR mit primern für die konstitutiv exprimierten Faktoren *tkl* und *elp*). Je 1 µl der cDNAs (entspricht 10<sup>6</sup> Moleküle *tkl*/µl) wurde dann in einer PCR (20 µl vol, 25 Zyklen, 94°C-30", 58°C-30", 72°C-2') eingesetzt. Die Primerkombinationen für den *emer*-N-Terminus waren EGR-up29 (5'-AACTGCCATTCCTGCTGATG-3', *emer* cDNA: 1116-1097) × EGR-dw23 (5'-CGTTGGAATGTCGGTGATG-3', *emer* cDNA: 428-447), für den *emer*-C-Terminus EGR-up3 (5'-GCTGTCCTCGTTGTTGGTG-3', *emer* cDNA: 3578-3560) × EGR-dw6 (5'-ACGATGCCAACATCCCATCG-3', *emer* cDNA: 2965-2985) und für die Kontrolle *elp* Elp-15 (5'-AATAAGGTCAGGGTGACTAC-3') × Elp-21 (5'-TCACCACTGCCATTGACCTG-3'). Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### 3. kompetitive PCR:

Die kompetitive PCR wurde wie unter 5.4.9 beschrieben durchgeführt. Ausgehend von dem Kompetitorplasmid pKELP [47] wurde über PCR mit den Primern KP-Elp-Er-dw (5'-CCGTTGCAAGCTCTCAGCTGGCAGGATCTCTTCGATCAAGTG-3') × KP-Elp-Er-up (5'-ACGCTGTCTCCTCGTTGTTGGTGACCATACTTGGCAACACAGG-3') ein Fragment amplifiziert, das in den Vector pCR2.1 (Invitrogen) kloniert wurde. Dieses Plasmid wurde als Kompetitor für *emer* eingesetzt. Eine PCR mit den *emer*-spezifischen Primern ER-KP-dw (5'-CCGTTGCAAGCTCTCAGCTGG-3') × Er-KP-up (5'-ACGCTGTCTCCTCGTTGTTGGTG-3') auf dieses Plasmid ergab ein Fragment von 495 bp, während mit cDNA als Template ein Fragment von 420 bp amplifiziert wurde. Für die Analyse von *egfd* wurde das Kompetitorplasmid pKEGF [47] verwendet. Beide Plasmide wurden auf eine Konzentration von 300 ng/µl eingestellt (entspricht ~100fmol/µl oder 6x10<sup>10</sup> Kompetitormoleküle/µl). Für die kompetitive PCR wurden von diesen Plasmiden 10fach, 5fach und 3fach Verdünnungen als Template eingesetzt und die eingesetzte cDNA-Menge konstant gehalten. Die kompetitive PCR (25 µl-Ansätze) wurde mit 1 µl cDNA und 10<sup>8</sup> oder weniger Kompetitormolekülen durchgeführt, anschließend in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt um die unterschiedlichen expressionen von *emer*, *egfd* und *elp* sichtbar zu machen.

## 5.14.2 *emer* (cDNA)

	10		20		30		40		50		60		70		80		90		100
AAAAAAAAAACGTCAGTT	TTGAACCTCTGCCAGTCCAGG	GTGATGTGGTTTTTCTAGGA	TGCTCCGGATTTGGACAAAC	GCTTTCATCCCTTTATTGTT	100														
TTCTGGGGCCAAATTTTGCAT	TTAAGCTATCCCTTGCCCCA	GAATACGAGGATATAAAAAT	ATGTCGAAGCAGGAATATTG	ATTGCCGCAACTCGATGAAT	200														
GCTAAAACCTTACTTGCATA	CTATAAAAGACAGTATTCTC	AGTGACACATATTATAGGC	AATCTTGTTTTGTGCAACTT	AAAACGACTAGAGGATGGTA	300														
GTGATCCTGATCTCTCCTTC	CTGAATCAATTCGAGAAGT	ATCCGGCTATGTTTATATAG	GTAATAATGAGGTGAAACGG	ATACCACATCTCATTACG	400														
GATCATTCGTGGACGAGTAC	CATATCACGTTGGAAATGTC	GGTGATGGAGCCCTAATTTGT	GACTCGTAATGCCAAAAAT	ACACTCATGGATTAGAAGTT	500														
TTGGATCTTCGTAGTCTTGC	CGTGATACAGGAGCACAATA	TAATAGCATGGGACAATCCA	ATGCTATGCCACTTCCAATA	CACCGTCGACTTCCACAGC	600														
TCTTCGTGGATGTGAAGAAT	CAGAGACGACTGAGTGTCTC	TAAGGAGAATCTCATATCTG	GCAGTGGCTGCGATTACGAT	ACTGACTCGCCAAATGCGTCCG	700														
CAACACGACCTGTGCATAGTG	CCTGCTCCGAGAATGACGAG	AAGGGGCACGTGGGGACC	AGAGAAGAATCAGTGTCAAC	TTCGTTCAAAATGTACCAAG	800														
GAATCCACCACGTAAGTCCG	TTTAGACAACCTTTTCGAAC	GGATAAAGTGTGATGATGCC	TGTATTGGCGGTTGCAATGG	TAGCACCTCGAATTTGTTGGG	900														
CGTGTCGATCCAAGAGGAAT	GGCGACACCTGTGTGAGCTT	CTGTCCCCACGCCACCATG	TGAACCCGACGACGAGTCCA	CAGGAGCTGAATCCCGACTT	1000														
CAAGTACGAGCTGCATGACA	TCTGTGTGAGACAGTGTCCA	GAGCCGCTGTTGAAGATGGA	CACGGTGTGCGTGATTGAAT	GTGACTTCAAAAACAACCATA	1100														
CCAGTGAATGGCAGTTGTGT	TCCTGTGCAAAAACCTCCAT	GTGCTAATCATTGTGAACAG	AAGGATATTTTGGTTCGCG	ATTTCCCTTGATGACATCTG	1200														
CGGCTGCAAGCGGATGAGC	CAGTGTGCTCTTATTTCAGG	CGTATCTACATCAATAAAG	ATTCATTCAAGGTAACATTA	AAGCGACAGGCCTCCAAAT	1300														
TGAAGATCTCTGGAATCTGC	ATAATATACGCGAAATTTGTC	GGTACATTTTACCTCGATTT	GGATGCCTCCTCGCCGGAGT	TGAGAAATTTGACATTTTGT	1400														
GGAACCTCTACAAGTTTAC	TACTGAATTTTCTGATGGAG	TATCGTTGGATCAACCTCTG	GTGATATATCATTCAAAGTA	TTTGGAGTTTTTGGGACTAA	1500														
AAAGTCTTCGCTATATGGAC	ATGACTGCCTATTTGGAGGC	GCTGCCATCTTTGTGCTATA	CAAGCGCTCTGGAGAAGAT	CTTCTGTTCGAACCTAAGGG	1600														
AGTCAAGGATCCAGCCACTT	GCATCCGGGAAGGCCACGTG	TGTCACAGTGAATGCCTCC	CGAAGCAGGTTGCTGGGGTC	CTGGGCCGCAATGTGTGCC	1700														
CACGTCTGCACCTTCGAAGC	CAACGGTGTCTGTGCTCCG	ATTGCTCTGAGGCACCCGGG	TTCTACCTCCCCCGAGCTC	TGCTGTCTCTACGCTCACGT	1800														
CGAAATTTCTGTTCGCACT	TTGCCACTTTCATGAAACA	AGTGGCACAAATGCAGGAGG	AGGAGGTGTAGCGGCTATC	CGACCTGCAGTGAAGTGTGC	1900														
ACGATGTCACGAAGAATGCG	CGGAGTCGTGCACCTGCACCT	GGGCCGGATCAGTGTCTAGG	CGAATGTAAGCATTTCAAGT	CAGGAGACACTTGTGTCAAG	2000														
CGTGTCTGCAAGGAGCAGTA	CGTGTGAGGAGAAGCAGAAGC	TCTGTCAACCTTCAACTCC	AAGTGTTAGCGTCTCTGAA	GTCCAAATTCCTCCAGATG	2100														
ACATCTCCGCTGCTCTGGA	CCCGCGATTACCTCGGACT	TGGGGGATGTGCTTTCTGCT	ACTTTGTGAAAAAGACAAA	GCCACCTCCAAGTACCAGTG	2200														
CCTGGATATGAAATGTCCAC	CCAACACTTCGGCAAGCGG	ACATCTTTGACGCATCTGAA	CTTGAAGAAAGAGGAATTC	CCTTAGTCAGTGTGCGGGCA	2300														



### 5.14.4 emer (Map)

AAAAAAAAAACGTCAGTTTTGAACTCTGCCAGTCCAGGGTGATGTGGTTTTCTAGGATGCTCCGGATTTGGACAAACGCTTTCATCCCTTTATGTT TTTTTTTTTTGACAGTCAAACCTTGAGACGGTCAGGTCCCACTACACAAAAGATCCTACGAGGCCATAACCTGTTTGCAGAAAGTAGGAAATAACAA	100
 M L R I W T N A F I P L L F	14
TTCTGGGGCAATTTTGCATTTAAGCTATCCCTTGCCCCAGAATACGAGGATATAAAAAATATGTCGAAGCAGGAATATTGATTGCCGCAACTCGATGAAT AAGACCCCGGTTAAACGTAATTCGATAGGGAACGGGGTCTTATGCTCCTATATTTTATACAGCTTCGTCTTATAACTAACGGCGTTGAGCTACTTA	200
 S G A N F A F K L S L A P E Y E D I K I C R S R N I D C R N S M N	47
GCTAAACCTTACTTGCATACTATAAAAGACAGTATTCTCAGTGCACACATATTATAGGCAATCTGTTTTGTGCAACTTAAACGACTAGAGGATGGTA CGATTTTGGAAATGAACGTATGATTTTTCTGTCATAAGAGTCACGTGTGTATAATATCCGTTAGAACAAAACACGTTGAATTTTGTGATCTCCTACCAT	300
 A K T L L A Y Y K R Q Y S Q C T H I I G N L V L C N L K R L E D G	80
GTGATCCTGATCTCTCTCTCTGAATTCAAATTCGAGAAGTATCCGGCTATGTTTTATATAGGTAATAATGAGGTGAAACGGATACCCTCATCTCATTACG CACTAGGACTAGAGGAAGACTTAAGTTAAGCTCTTCATAGCCGATACAAATATATCCATTATTACTCCACTTGCCTATGGTGAGTAGAGTAATGC	400
 S D P D L S F L N S I R E V S G Y V Y I G N N E V K R I P L I S L R	114
GATCATTGCGTGGACGAGTACCATATCACGTTGGAAATGTCGGTGATGGAGCCCTAATTTGACTCGTAATGCCAAAAATTACACTCATGGATTAGAAGTT CTAGTAAGCACCTGCTCATGTTATAGTCAACCTTTACAGCCACTACCTCGGGATTAACACTGAGCATTACGGTTTTTAATGTGAGTACCTAATCTTCAA	500
 I I R G R V P Y H V G N V G D G A L I V T R N A K N Y T H G L E V	147
TTGGATCTTCGTAGTCTTGCCTGTATACAGGAGCACAATATAATAGCATGGGACAATCCAATGCTATGCCACTTCCAATACACCCGTCGACTGTCCACAGC AACCTAGAAGCATCAGAACGGCACTATGCTCTGTTATATTATCGTACCCTGTTAGGTTACGATACGGTGAAGTTATGTGGCAGCTGACAGGTGTCG	600
 L D L R S L A V I Q E H N I I A W D N P M L C H F Q Y T V D C P Q	180
TCTTCGTGGATGTGAAGAAATCAGAGACGACTGAGTGTCTCTAAGGAGAATCTCATATCTGGCAGTGGCTGCGATTACGATACTGACTCGCCAATGCGTGG AGAAGCACCTACACTTCTTAGTCTCTGCTGACTCACAGAGATTCTCTTAGAGTATAGACCGTACCGACGCTAATGCTATGACTGAGCGTTACGCAGC	700
 L F V D V K N Q R R L S V S K E N L I S G S G C D Y D T D S P M R R	214
CAACACGACCTGTATAGTGCCTGCTCCGAGAATGACGAGAAGGGGCACTGCTGGGACAGAGAAGAAATCAGTGTCAACTTCGTTCAAAATGTACCAAG GTTGTGCTGGACAGTATCACGGACGAGGCTCTTACTGCTCTTCCCGTGACGACCCCTGGTCTCTTCTTAGTCACAGTTGAAGCAAGTTTACATGGTTC	800
 N T T C H S A C S E N D E K G H C W G P E K N Q C Q L R S K C T K	247
GAATCCACCAGTACTGCCGTTTAGACAACCTTTTCGAACGGATAAAGTGTGATGATGCCTGTATTGGCGGTTGCAATGGTAGCACCTCGAATTTGTTGGG CTTAGGTTGGTGCATGACGGCAAATCTGTTGGGAAAGCTTGCTTATTTACACTACTACGGACATAACCGCAACGTTACCATCGTGGAGCTTAACAACCC	900
 E S T T Y C R L D N P F E R I K C D D A C I G G C N G S T S N C W	280
CGTGTGATCCAAGAGGAATGGCGACACCTGTGTGAGCTTCTGTCCTCCACGCCACCATGTGAACCCGACGACGAGTGCACAGGAGCTGAATCCCGACTT GCACAGCTAGTTCCTTACCCTGTGGACACACTCGAAGACAGGGGTGCGGTGGTACACTTGGGCTGCTGCTCAGCTGTCTCGACTTAGGGCTGAA	1000
 A C R S K R N G D T C V S F C P P R H H V N P T T S R Q E L N P D F	314
CAAGTACGAGTGCATGACATCTGTGTGAGACAGTGTCCAGAGCCGCTGTTGAAGATGGACACGGTGTGCGTGATTGAATGTGACTTCAAAAACACCATA GTTTACGCTGACGACTGTAGACACACTCTGTACAGGCTCTCGGCGACAATCTACCTGTGCCACACGCACTAATACACTGAAGTTTGTGGTAT	1100
 K Y E L H D I C V R Q C P E P L L K M D T V C V I E C D F K T T I	347
CCAGTGAATGGCAGTTGTTCCCTGTGCAAAAACCTCCATGTGCTAATCATTGTGAACAGAAGGATATTTTTGGTTCCGATTTCCCTTGTGACATCTG GGTCACTTACCGTCAACACAAGGGACACGTTTTTGGAGTACAGATTAGTAACACTTGTCTTCTATAAAAACCAAGCGCTAAAGGGAACACTGTAGAC	1200
 P V N G S C V P C A K T P C A N H C E Q K D I F G S R F P L M T S	380

CGGCTGCAAAGCGGATGAGCCAGTGTGTCTTCTATTTCAGGCGCTATCTACATCAATAAGGATTCATTCAAGGTAACATTAAGCGACCAGGCTCCAAAT  
 1300  
 GCCGACGTTTCGCCTACTCGGTACACAGAAGATAAGTCCGCGATAGATGTAGTTATTCTTAAGTAAAGTTCATTGTAATTTTCGCTGGTCCGGAGGTTTA

A A A K R M S Q C V F Y S G A I Y I N K D S F K V T L K R P G L Q I  
 414

TGAAGATCTCTGGAATCTGCATAATATACGCGAAATTTGTGGGCTACATTTACCTCGATTTGGATGCCTCCTCGCCGGAGTTGAGAAATTTGACATTTTGT  
 1400  
 ACTTCTAGAGACCTTAGACGTATTATATGCGCTTTAACACCCGATGTAATGGAGCTAACCTACGGAGGAGCGCCTCAACTCTTAAACTGTAAAAAC

E D L W N L H N I R E I V G Y I Y L D L D A S S P E L R N L T F L  
 447

GAGAACCTCTACAAAGTTACTACTGAATTTTCTGATGGAGTATCGTTGGATCAACCTCTGGTGATATATCATTCAAAGTATTTGGAGTTTTGGGACTAA  
 1500  
 CTCTTGGAGATGTTTCAATGATGACTTAAAAGACTACCTCATAGCAACCTAGTTGGAGACCCTATATAGTAAAGTTTCAATAAACCTCAAAAACCTGATT

E N L Y K V T T E F S D G V S L D Q P L V I Y H S K Y L E F L G L  
 480

AAAGTCTTCGCTATATGGACATGACTGCCTATTTGGAGGCGTGCATCTTTGTGCTATACAAGCGCTCTGGAGAAGATTCTTCTGTTTCCGAACCTAAGGG  
 1600  
 TTTCAGAAGCGATATACCTGTACTGACGGATAAACCTCCGCGACGGTAGAACACGATATGTTCCGCGACCTCTTCTAAGAAGGACAAGCTTGATTCCC

K S L R Y M D M T A Y L E A L P S L C Y T S A L E K I L P V R T K G  
 514

AGTCAAGGATCCAGCCACTTGCATCCGGGAAGGCCACGTGTGTCAAGTGAATGCCTCCCGAAGCAGGTTGCTGGGGTCTGGGCCCAGTGTGTGCC  
 1700  
 TCAGTTCCTAGGTGGTGAACGTAGGCCCTTCCGTTGCACACAGTGTCACTTACGGAGGGGCTTCGTTCAACGACCCAGGACCCGGGGTACACACGG

V K D P A T C I R E G H V C H S E C L P E A G C W G P G P A M C A  
 547

CACTGTCGACCTTCGAAGCCAACGGTGTCTGTGCTCCGATTGCTCTGAGGCACCCGGTTCCTACCTCCCCCGAGCTCTGCTGTCTTACGCTCACGT  
 1800  
 GTGACGACGTGGAAGCTTCGGTTGCCACAGACACAGAGGCTAACGAGACTCCGTGGGCCAAGATGGAGGGGGCTCGAGACGACAGAGATGCGAGTGCA

H C C T F E A N G V C V S D C S E A P G F Y L P P S S A V S T L T  
 580

CGAAATTCGTTGTCGCACTTTGCCACTTTCAATGAAACAAGTGGCACAAATGCAGGAGGAGGAGGTTAGCGGCTATCCGACCTGCAGTGAAGTGTGC  
 1900  
 GCTTTAAAGCAACAGCGTGAACCGTGAAGTTACTTTGTTCCACGTTGTTACGTCCTCCTCCTCCACAATCGCGATAGGCTGGACGCTACTTACACAG

S K F R C R T L P L S M K Q V A Q M Q E E E V L A A I R P A V K C A  
 614

ACGATGTCACGAAGAATCGCGGAGTCTGCACTGCACCTGGGCCGATCAGTGTCTAGGCGAATGTAAGCATTTCAGTCAAGTCAAGGACACTTGTGTCAAG  
 2000  
 TGCTACAGTGTCTTCTACGCGCTCAGCACGTGACGTGGACCCGGCTAGTACAGATCCGCTTACATTTCGTAAGTTTCAAGTTCAGTCTCTGTGAACACAGTTC

R C H E E C A E S C T A P G P D Q C L G E C K H F K S G D T C V K  
 647

CGTGCTCGAAGGAGCAGTACGCTGAGGAGAAGCAGAAGCTCTGTCAACCCGCAACTCCAAGTGTTTAGCGTCTCTGAAGTCCAATTCCTCCAGATG  
 2100  
 GCGACGAGCTTCCCTGTCATGCGACTCCTCTCGTCTTCGAGACAGTTGGGACGTTGAGGTTCACAAAATCGCAGAGACTTCAGGTTTAAAGGAGGTTCTAC

R C S K E Q Y A E E K Q K L C Q P C N S K C L A S L K S K F P P D  
 680

ACATCTCCGCTGTCTGGACCCGCGATTACCTCGACTTTGGGGATGTGCTTTCTGCTACTTTGTGAAAAAAGACAAAGCCACCTCCAAGTACCAGTG  
 2200  
 TGTAGAGGCGACGAGACCTGGGCGCTAATGGAGCCTGAACCCCTACACGAAAGACGATGAAACACTTTTTTCTGTTTCGGTGGAGGTTTACATGGTAC

D I S A C S G P G D Y L G L G G C A F C Y F V K K D K A T S K Y Q C  
 714

CCTGGATATGAAATGTCCACCAAACTTCCGGCAACGCGACATCTTTGACGATCTGAACCTGAAGAAAGAGGAATTTCCCTTAGTCAAGTGTGCGGGCA  
 2300  
 GGACCTATACTTTACAGTGGGTTTGTGAAGCCGTTGCGCTGTAGAACTGCGTAGACTTGAACCTTTCTCCTTAAAGGGAATCAGTACACGCGCGT

L D M K C P P K H F G N A T S L T H L N L K K E E F P L V S V R A  
 747

GCAAATGCGGATCTTCAGGAATGCGTTCCCTGCCATCCTGAATGCGAGGTTTGTGTCGGTCCAGGAAATCAGTCTCCGTTTGTGCAAAATGTCGAAATF  
 2400  
 CGTTTACGCTTAGAAGTCTTACGCAAGGGACGGTAGGACTTACGCTCCAACACAGCCAGGTCCTTTAGTGCAGAGGCAACAGCTTTTACAGCTTTAA

A N A D L Q E C V P C H P E C E V C V G P G N H V S V C R K C R N  
 780

GGATGTACCGGTCCGAGTGTGTCAATGCCTGTCTCCTGACGACACCTATGTGCCGAATGCAACGGCAACGAAACCTCTCAGAGAGAGAAAAACAGAT  
 2500  
 CCTACATGGCCAGCCTCACACAGTTACGGACAGGAGGACTGCTGTGGATACACGGCTTACGTTGCCGTTGTCTTGTGGAGAGTCTCTCTTTTGTCTA

W M Y R S E C V N A C P P D D T Y V P N A T A T E H L S E R E K Q M  
 814

GTTGGAGAGCGGGAATGCCTACGATGTCATGAGCAATGTGCTGGAGGGTGTACGGCCTACGGACCGGAGTTCTGCAACAACCTGTCGCTATGCCAAAATC  
 CAACCTCTCCGCCCTTACGGATGCTACAGTACTCGTTACACGACCTCCACATGCCGGATGCCTGGCCTCAAGACGTTGTTGACAGCGATACGGTTTATG 2600  
 L E R R E C L R C H E Q C A G G C T A Y G P E F C N N C R Y A K I 847  
 ATGATTGATGTGCAGGCGAATAAGTTTATCTGCAACTCAACATGCCACCAGAGCTCTACAAAATGGAAAACCAATCTCTGCCTGGACGAGGAGCAGT  
 TACTAACTACACGTCGGCTTATTCAAATAGACGTTGAGTTGTACGGTGGTCTCGAGATGTTTACCTTTTGTGGTTAGAGACGGACCTGCTCCTCGTCA 2700  
 M I D V Q A N K F I C N S T C P P E L Y K M E N T N L C L D E E Q 880  
 ACGAAAAATGTCGGGTGCAAAATGGCGCGTGCAGAAATCAGGCCCTCATAGCGGCTGGGATTGTCCTCTCTTCTCCTCATTTCTCTCTCGTACT  
 TGCTTTTTTACAGCCCACGTTTAAACCGCGCAGAGCTTTAGTCCGGGAGTATCGCCGACCTAACAGGAGGAAAGAGGAGTAGAAGAGAGAGCATGA 2800  
 Y E K M S G A K L A R A R N Q A L I A A G I V L L F L L I F S L V L 914  
 TTCTGTCTCTGCTTCAATTACAAGGCCAAACGAGTGTATTAAGGAAGCCTTAAAATCTACCTACACTAATACCAAAGCACCAGGATATGAAGGACGCA  
 AAGACAAGAGACGAAGTAAATGTTCCGGTTTGGCTCAGCATAATTCCTTCGGAATTTAGATGGATGTGATTATGGTTTCGTGGCCTATACTTCTCGCT 2900  
 S V L C F N Y K A K R S R I K E A L K S T Y T N T K A P D M K D A 947  
 AAATCAAGCAGGGAACCAAAATATGGGCCGTTGGGAGATGATCAACATTGATGACTTGACTTTCGACGATGCCAAACATCCCATCGGCAGAGGGGCATTTG  
 TTTAGTTCGTCCTTGGTTTATAACCGCAACCCCTACTAGTTGTAAGTACTGAACTGAAAGCTGCTACGGTTGTTAGGGTAGCCGCTCCCCGTAAC 3000  
 K S S R E P N M G R W E M I N I D D L T F D D A N N P I G R G A F 980  
 GTGAGGTGATCGAGGCAAGTGGCGAGTACCGAAGCGAGTGTGAATCAGTTCAATGGGCACGGAACACTTCGCTGGATGTGGCTATCAAAGTGATTAG  
 CACTCCACATAGTCCGTTACCGCTCATGGCTTCGCTCACAACCTTAGTCAAGTTAACCCTGCCTTGTGAAGCGACCTACACCGATAGTTTCACTAATC 3100  
 G E V Y R G K W R V P K R V L N Q F N W A R N T S L D V A I K V I R 1014  
 ATCAGCTGCGCCCACAGCTCAAGGTGGTGCCTCAAAATCTCGGTGCCTCTGGATTAGACGGCAATGTCAGCACCCTGCAAGCTCTCAGCTGGGCGCC  
 TAGTCGACGCGGGTGTGAGTTCCACCACGACGAGTTTAGAGCCACGGAGACCTAATCTGCCGTTACAGTCTGGCAACGTTTCGAGAGTCGACCCGCGG 3200  
 S A A P T A Q G G A A S N L G A S G L D G N V S T V A S S Q L G A 1047  
 AACACCATTGATCGCATCTCCGCTAGAAGTAATCTCCAGGATATGCTTACGGAAGCCAAAGTAATGGCCTCGGTGCAGCATAAGAATTGTCTGCCCTCA  
 TTGTGGTAAC TAGCGTAGAGCGATCTCATTAGAGGTCCTATACGAATGCCTTCGGTTTCATTACCGGAGCCACGTCGTATTCTTAACAGACGGGGAGT 3300  
 N T I D R I S A R S N L Q D M L T E A K V M A S V Q H K N C L P L 1080  
 TTGGTGTCTGTTTACC CGGAAAATGCAATGCATGGTGTGATGTTTGTGGAGGAGGGCAGTCTGGATCGTTACCTACGCCCTCCACAGGGACGACTTGAA  
 AACCCAGACAAAATGGCCCTTTTACGTTACGTACCACAGCTACAACACCTCCCTCCCGTACAGCTAGCAATGGATGCGGAGGTGTCCTGCTGAACTT 3400  
 I G V C L T R K M Q C M V S M F V E E G S L D R Y L R L H R D D L N 1114  
 TAGTTACCTTGGCTTTCATGGGCGAACAGATTGCTGACGGGATGGCTACCTAGAGGAACGTTGGGATTTATTCATCGTGATTTGGCTGCAAGAACGTTG  
 ATCAAAGTGAACGAAAGTACCGCCTTGCTAACGACTGCCCTACCGGATGGATCTCTTGCACCTAATAAGTAGCCTAAACCGACGTTCTTTGCAC 3500  
 S F T L L S W A E Q I A D G M A Y L E E R G I I H R D L A A R N V 1147  
 CTTGTTCAATCTCGGGAGCTGGTGCATAAACCATTTCGGATTGGCTAAAATGTTGGACCAACAACGAGGACAGCGTTGTAGTTTCGCACTGGACGTTG  
 GAACAAGTTAGAGCCCTCGACCAGTTTATGGCTAAAGCCTAACGATTTTACAACCTGTGGTTGTTGCTCCTGTCGCAACATCAAGCGTGACCTGCAC 3600  
 L V Q S R E L V Q I T D F G L A K M L D T N N E D S V V V R T G R 1180  
 TTCCAATTCGTTGGTTGGCTATTGAGACGCTTCAAGCTGGCATCTACTCTCAGAAAACCGATGCTGGAGCTACGTTGTGACGCTGTGGGAGATTTTAC  
 AAGTTAAGCAACCAACCGATAACTCTGCGAAGTTGACCGTAGATGAGAGTGTGTTGGCTACAGACCTCGATGCCACACTGCGACACCTCTAAAAGTG 3700  
 V P I R W L A I E T L Q A G I Y S H K T D V W S Y G V T L W E I F T 1214  
 ATTTGGCAAAACCCCTACGAAAATATAAGCACCTCGGAGATTAAGGATCATGTAATGAAGGGAGTGGGCTGAGTCAGCCAGAAATTTGTACGCTTGAC  
 TAAACCGTTTGTGGGATGCTTTTATATTCGTGGAGCCTTAATTCCTAGTACATTACTTCCCTCAGCCGACTCAGTCGGTCTTTAAACATGCGAACTG 3800  
 F G K Q P Y E N I S T S E I K D H V M K G V R L S Q P E I C T L D 1247

ACCTACATGGTGATGGTGAATGCTGGATGGAAGAACACGAATCCAGACCGACTTTCTTAGAGCTGATGAAATGTTCCACAAGTACTGTCAAACGCCGG  
 TGGATGTACCCTACCAGTACGACCTACCTTCTGTGCTTAGTCTGGCTGAAAGAATCTCGACTACTTTACAAAGTGTTCATGACAGTTTGGCCG 3900

T Y M V M V Q C W M E E H E S R P T F L E L M K C F H K Y C Q T P 1280

GCAGATACTTGTACATCGAGGGCGATGAGTATGCGATAACTCGTGCCTCTCCGTACACCCCTTACCAGGCTCCTTGGACCGAGATGAAGCCGTGCCCG  
 CGTCTATGAACATGTAGCTCCCGTACTCATACGCTATTGAGCACGGAGAGGCATGTGGGAAGTGGCCGAGGAACCTGGCTCTACTTCGGCGACGGGTC 4000

G R Y L Y I E G D E Y A I T R A S P Y T P S P A P W T E M K P L P S 1314

TAGTTTCCGGGGCGTACCAGACGGCCTTTGGGGCCACCCAAATGGGACGGGGTGTGCCCTTAGGTTCCCTGAAGAGCACTTCTTCGATGATCATCAACAC  
 ATCAAAGGCCCGCATGGTCTGCCGTGAAACCCCGTGGGTTACCTGCCCCACCGAAATCCAAAGGACTTCTCGTGAAGAAGTACTAGTAGTTGTG 4100

S F R G V P D G T L G P P N G T G C A F R F P E E H F F D D H Q H 1347

CACCTTCTGGGAGAGACAATGGGAGAGGGCAGTGGCAACCCGGAGGCAGAATCTCTTCTCCGCAGAGAGTTGGCAACGATCATCATCATCATCGCCGAT  
 GTGGAAGACCTCTCTGTACCTCTCCCGTACCGTGGGCTCCGTCTTAGAGAAGAAGCGCTCTCAACCGTTGCTAGTAGTAGTAGTAGAGCGCTA 4200

H L L G E T M G E G S G N P E A E S L L P Q R V G N D H H H H R R 1380

TTTTCTCCCACTCAAATGAGACGAGAATGCGACAAGCGGGCGACAGGAGCGTGTCCGGCTGCTGGTGGTGGTGCATCGACAAACACTTCCGTGGTCTC  
 AAAAGAGGGTGAAGTTACTCTGCTCTTACGCTGTTTCGCCGCTGTCTCGCACGAGCCGACGACCACCACCGTAGCTGTTGTGAAGCACCAGAG 4300

F F S H S N E T R M R Q S G R Q E R A P A A G G G A S T N T S V V S 1414

GACGAATTTGGACTCGTGGCCAGCTGGAAGCGGGATGGGATTGAATGCCGCCTTCCCTGTCTTAGAGCATAGTCGAAACCAGCAACAACCCGAAATAC  
 CTGCTTAAACCTGAGCACCGTTCGACCTTCGCCCTACCTAACTTACGGCGGAAGGACAGAATCTCGTATCAGCTTTGGTCTGTTGTTGGCTTTATG 4400

T N L D S W P A G S G M G L N A A F P V L E H S R N Q Q Q Q P K Y 1447

TACAACACCGCTTTTCTGGCCAGTGGCACTTACGGACCCCTTGTAGACCACCATCACCACCGCCAGCGCCACCACCCCTTGCACAAGTGGAGCGTGATG  
 ATGTTGTGGCGAAAAGACCGTACCGTGAATGCCTGGGGAACAATCTGGTGGTAGTGGTGGCGGTCGCGGTGGTGGGAACGTGTTACCTCGCACTAC 4500

Y N T A F L A S G T Y G P L V R P P S P P P A P P P L A Q V E R D 1480

ATGACTTAGACACGATGGGTAGTGGGATTAAGACGCTGAGATTAACCTACCTCTCCACTCTCGAGATGTCTATGGACGGTGTGAGGGAGCGGGTGGAGG  
 TACTGAATCTGTGCTACCCATCACCTAATTTCTGCGACTCTAATGTAGGAGAGGTGAGAGCTCTACAGATACCTGCCACAACCTCCCTCGCCACCTCC 4600

D D L D T M G S G I K D A E I N Y L S T L E M S M D G V E G A G G G 1514

GGAACAATCGTTGCAGCCAGAAGACTACCTGGAACCCAGAGCAAGTGGCGATGGCAAAAAACGGTCGAGAGGTTTCAATGCCGTTGGAAATCCCGATTAC  
 CCTTGTAGCAACGTCGGTCTTCTGATGGACCTTGGGTCTCGTTCACGGCTACCGTTTTTTGCCAGCTCTCCAAAGTTACGGCAACCTTTAGGGCTAATG 4700

E Q S L Q P E D Y L E P R A S A D G K K R S R G F N A V G N P D Y 1547

TTGGTGGATAATCAAGAATACTTCCAACCTGCCGTCGACTAAACCCGTTTAAAAATGCGTATCTCTACTCCCTTCCCACCTGACCCCTTCCTTACA  
 AACCCATATTAGTTCTTATGAAGTTGGACGGCAGGTGATTTGGGCAATTTTACGCATAGAGATGAGGGAAGGGGTGGACTGGGGAAGGAAGTGT 4800

L V D N Q E Y F Q P A G P T K P V . 1564

TCTGGTGTAAATATCACCCAATCAGCACAGGTGGTGGAGAGATGGAAGAGCACATATCATTCTGTTATTGTTTATACCCTCCACACACATCCATCTTCA  
 AGACCACATTTATAGTGGGTAGTCTGTCCACCACTCTCTACCTTCTCGTGTATAGTAAGCAATAACAATATGGGAGGTGTGTAGTAGTAAGT 4900

ACGTACGTACCTGTGAATACCGTCAGCATTTACAGAGGCCATGGTTAATATGGCTTCTCCGCGTCTTCTACCCATCCTTACAGACTCTTCCTTATTGTC  
 TGCATGCATGGACACTTATGGCAGTCGTAATGTCTCCGGTACCAATTATACCGAAGAGGCGCAGGAAGATGGGTAGGAAGTCTGAGAAGGAATAAACG 5000

TCCCGCAGCCCTTTCCAGCTGTGCATCCCGCGCTAACCGATGTTGACTGCGTTCATTGAAACTTGCCGCGGCATACACACCAGCTTACTTCTCTCA  
 AGGGCGTCGGGAAAAGGTGCAACAGTAGGGCGGGATTGGCTACAACTGACGCAAGTAACTTTGAACGGCGGCGGTATGTGTGTCGAATGAAGAGAT 5100

CCTGCGCAAGCAACTTCATTTCTACTGACAAATAAATAGTAGTACATGCCCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA  
 GGACGCGTTCGTTGAAGTAAAGATGACTGTTTATTTAATCATCATGTACGGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTT 5173



## 5.14.5 *emer* (Oligonucleotide)

*emer* (cDNA)

EGR 3'	<i>emer</i> cDNA 4751-4737	AACGGGTTTAGTCGGACCGG
EGR 3' mod	<i>emer</i> cDNA *4750-4738	GACGGGTTTAGTCGGACCG
EGR 5' RACE	<i>emer</i> cDNA 1381-1355	CAACTCCGGCGAGGAGGCATCCAAATCG
EGR 5'3mod	<i>emer</i> cDNA *122-137	GTTAAGCTATCCCTTGCC
EGR 7A 3' mod	<i>emer</i> cDNA *4708-4691	GCCACCAAGTAATCGGGA
EGR 8A 3'	<i>emer</i> cDNA *5046-5029	GACATCGGTTAGGCGCGG
EGR CVM 2	<i>emer</i> cDNA 3824-3816	GCATTGCACCATCACCATG
EGR RC	<i>emer</i> cDNA 2058-2034	AGTTGCAGGGTTGACAGAGCTTCTG
EGR RCN	<i>emer</i> cDNA 2011-1988	TTCGAGCAGCGCTTGACACAAGTG
EGR south dw1	<i>emer</i> cDNA 3539-3558	CGGATTGGCTAAAATGTTGG
EGR south up	<i>emer</i> cDNA 3942-3923	GAGTTATCGCATACTCATCG
EGR Thio dw2	<i>emer</i> cDNA 3333-3353	ATGGTGTGATGTTTGTGGAG
EGR Thio dw3	<i>emer</i> cDNA 4056-4076	GCCTTTAGGTTCCCTGAAGAG
EGR Thio up1	<i>emer</i> cDNA 3288-3268	AATTCTTATGCTGCACCGAGG
EGR Thio up2	<i>emer</i> cDNA 3789-3769	AAATTCTGGCTGACTCAGCC
EGR Thio up3	<i>emer</i> cDNA 4911-4891	GGTACGTACGTTGAAGATGGA
EGR up P	<i>emer</i> cDNA 2164-2145	AAGTAGCAGAAAGCACATCC
EGR-5'	<i>emer</i> cDNA 60-81	ATGCTCCGGATTTGGACAAACG
EGR-5'2	<i>emer</i> cDNA 120-135	TTTAAGCTATCCCTTG
EGR-5'3	<i>emer</i> cDNA 120-140	TTTAAGCTATCCCTTGCCCCA
EGR-5'3 mod	<i>emer</i> cDNA 120-140	GTTAAGCTATCCCTTGCCCCA
EGR-5'4	<i>emer</i> cDNA 126-147	CTATCCCTTGCCCCAGAATACG
EGR-dw	<i>emer</i> cDNA 120-147	TTTAAGCTATCCCTTGCCCCAGAATACG
EGR-DW Topo	<i>emer</i> cDNA 2877-2897	AAAGCACCGGATATGAAGGAC
EGR-dw Triple	<i>emer</i> cDNA 394-415	CATTACGGATCATTCTGTGGACG
EGR-dw Triple 3	<i>emer</i> cDNA 735-754	GCAGTACGTGGTGGATTTCCTTG
EGR-dw Triple3	<i>emer</i> cDNA 735-754	GACGAGAAGGGGCACTGCTG
EGR-dw Triple5	<i>emer</i> cDNA 505-524	ATCTTCGTAGTCTTGCCGTG
EGR-dw Triple6	<i>emer</i> cDNA 676-697	ACGATACTGACTCGCCAATGCG
EGR-dw Triple7	<i>emer</i> cDNA 797-817	CAAGGAATCCACCACGTA CTG
EGR-dw Triple8	<i>emer</i> cDNA 503-524	GGATCTTCGTAGTCTTGCCGTG
EGR-dw Triple9	<i>emer</i> cDNA 511-533	GTAGTCTTGCCGTGATACAGGAG
EGR-dw-TOPO	<i>emer</i> cDNA 2867-2897	CACTAATACCAAAGCACCGGATATGAAGGAC
EGR-dw-TOPO2	<i>emer</i> cDNA 2946-2967	ATTGATGACTTGACTTTCGACG
EGR-dw10	<i>emer</i> cDNA 2867-2886	CACTAATACCAAAGCACCGG
EGR-dw100	<i>emer</i> cDNA 4210-4229	ACTCAAATGAGACGAGAATG
EGR-dw11	<i>emer</i> cDNA 2306-2325	TGCGGATCTTCAGGAATGCG
EGR-dw12	<i>emer</i> cDNA 2496-2518	CAGATGTTGGAGAGGCGGGAATG
EGR-dw13	<i>emer</i> cDNA 2402-2421	GATGTACCGGTCGGAGTGTG
EGR-dw14	<i>emer</i> cDNA 2132-2151	CCTCGGACTTGGGGGATGTG
EGR-dw15	<i>emer</i> cDNA 2189-2210	CAAGTACCAGTGCCTGGATATG

<i>emer</i> (cDNA)		
EGR-dw16	<i>emer</i> cDNA 1929-1952	TGCACTGCACCTGGGCCGGATCAG
EGR-dw17	<i>emer</i> cDNA 1713-1732	TTCGAAGCCAACGGTGTCTG
EGR-dw18	<i>emer</i> cDNA 1187-1206	CTTGATGACATCTGCGGCTG
EGR-dw19	<i>emer</i> cDNA 1525-1544	CTGCCTATTTGGAGGCGCTG
EGR-dw2	<i>emer</i> cDNA 3447-3466	GCCTACCTAGAGGAACGTGG
EGR-dw20	<i>emer</i> cDNA 914-933	GAGGAATGGCGACACCTGTG
EGR-dw21	<i>emer</i> cDNA 21-40	TTGAACTCTGCCAGTCCAGG
EGR-dw22	<i>emer</i> cDNA 1061-1082	CACGGTGTGCGTGATTGAATGT
EGR-dw23	<i>emer</i> cDNA 428-447	CGTTGAAAATGTCGGTGATG
EGR-dw24	<i>emer</i> cDNA 1899-1923	GCACGATGTCACGAAGAATGCGCGG
EGR-dw3	<i>emer</i> cDNA 3765-3785	GTGCGGCTGAGTCAGCCAGAA
EGR-dw4	<i>emer</i> cDNA 4224-4242	AGAATGCGACAAAGCGGGC
EGR-dw5	<i>emer</i> cDNA 2044-2062	GTCAACCCTGCAACTCCAA
EGR-dw6	<i>emer</i> cDNA 2965-2985	ACGATGCCAACAATCCCATCG
EGR-dw7	<i>emer</i> cDNA 4482-4502	GCACAAGTGGAGCGTGATGAT
EGR-dw8	<i>emer</i> cDNA 2017-2036	AGTACGCTGAGGAGAAGCAG
EGR-dw9	<i>emer</i> cDNA 2684-2703	CCTGGACGAGGAGCAGTACG
EGR-Ex up	<i>emer</i> cDNA 2747-2728	GCCTGATTTGAGCACGCG
EGR-Mo dw1	<i>emer</i> cDNA 700-720	GCAACACGACCTGTCATAGTG
EGR-Mo dw2	<i>emer</i> cDNA 757-777	GACCAGAGAAGAATCAGTGTC
EGR-Mo up1	<i>emer</i> cDNA 860-840	GGCATCATCACACTTTATCCG
EGR-Mo up2	<i>emer</i> cDNA 840-819	GTTCGAAAGGGTTGTCTAAACG
EGR-South-dw1	<i>emer</i> cDNA 3539-3558	CGGATTGGCTAAAATGTTGG
EGR-South-up1	<i>emer</i> cDNA 3942-3923	GAGTTATCGCATACTCATCG
EGR-T-dw1	<i>emer</i> cDNA 378-400	CGGATACCACTCATCTCATTACG
EGR-T-dw2	<i>emer</i> cDNA 1071-1088	GTGATTGAATGTGACTTC
EGR-T-up1	<i>emer</i> cDNA 524-507	CACGGCAAGACTACGAAG
EGR-T-up2	<i>emer</i> cDNA 710-689	GGTCGTGTTGCGACGCATTG
EGR-T-up3	<i>emer</i> cDNA 1260-1243	CCTTATTGATGTAGATAG
EGR-TOPO (9.6.00)	<i>emer</i> cDNA 2877-2897	AAAGCACCGGATATGAAGGAC
EGR-up	<i>emer</i> cDNA 343-321	GATACTTCTCGAATTGAATTCAG
EGR-up TOPO	<i>emer</i> cDNA 5029-5010	GGATGACAAGCTGGAAAAGG
EGR-up Triple3	<i>emer</i> cDNA 828-807	GACGAGAAGGGGCACTGCTG
EGR-up Triple1	<i>emer</i> cDNA 978-957	GACTCGTCGTCGGGTTACATG
EGR-up Triple3	<i>emer</i> cDNA 808-797	GCAGTACGTGGTGGATTCCCTG
EGR-up Triple6	<i>emer</i> cDNA 832-811	GGGTTGTCTAAACGGCAGTACG
EGR-up Triple7	<i>emer</i> cDNA 826-805	TCTAAACGGCAGTACGTGGGTGG
EGR-up10	<i>emer</i> cDNA 4500-4483	CATCACGCTCCACTTGTG
EGR-up11	<i>emer</i> cDNA 5111-5092	CTTGCGCAGGTGAGAGAAG
EGR-up12	<i>emer</i> cDNA 4837-4818	TCACCACCTGTGCTGATTGG
EGR-up13	<i>emer</i> cDNA 2887-2867	TCCGGTGCTTTGGTATTAGTG
EGR-up14	<i>emer</i> cDNA 2245-2226	GATGTCGCGTTGCCGAAGTG
EGR-up16	<i>emer</i> cDNA 3195-3176	CCAGCTGAGAGCTTGCAACG

*emer* (cDNA)

EGR-up17	<i>emer</i> cDNA 2540-2520	ACATTGCTCATGACATCGTAG
EGR-up18	<i>emer</i> cDNA 2321-2302	TTCCTGAAGATCCGCATTTG
EGR-up19	<i>emer</i> cDNA 2102-2083	GTCATCTGGAGGGAATTTGG
EGR-up2	<i>emer</i> cDNA 3819-3800	GCACCATCACCATGTAGGTG
EGR-up20	<i>emer</i> cDNA 5159-5137	TTTTAGGGGCATGTACTACTAAT
EGR-up21	<i>emer</i> cDNA 2332-2308	CAGGGAACGCATTCTGAAGATCCG
EGR-up22	<i>emer</i> cDNA 2126-2150	ACATCCCCCAAGTCCGAGGTAAATCG
EGR-up23	<i>emer</i> cDNA 1231-1212	AAGACACACTGGCTCATCCG
EGR-up24	<i>emer</i> cDNA 1577-1556	CTTCTCCAGAGCGTTGTATAG
EGR-up25	<i>emer</i> cDNA 4581-4562	CACCGTCCATAGACATCTCG
EGR-up26	<i>emer</i> cDNA 942-923	AGAAGCTCACACAGGTGTGCG
EGR-up27	<i>emer</i> cDNA 42-23	ACCCTGGACTGGCAGAGTTC
EGR-up28	<i>emer</i> cDNA 921-901	CATTCTCTTGATCGACACG
EGR-up29	<i>emer</i> cDNA 1116-1097	AACTGCCATTCCTGTTATG
EGR-up3	<i>emer</i> cDNA 3578-3560	GCTGTCCTCGTTGTTGGTG
EGR-up30	<i>emer</i> cDNA 447-424	CATCACCGACATTTCCAACG
EGR-up31	<i>emer</i> cDNA 295-275	TCCTCTAGTCGTTTTAAGTTG
EGR-up4	<i>emer</i> cDNA 3479-3459	ACGATGAATAATCCCACGTTCC
EGR-up5	<i>emer</i> cDNA 3468-3447	CCCACGTTCTCTAGGTAGGC
EGR-up6	<i>emer</i> cDNA 2981-2963	GGGATTGTTGGCATCGTCG
EGR-up7	<i>emer</i> cDNA 2747-2728	GGCCTGATTTGAGCACGCG
EGR-up8	<i>emer</i> cDNA 1966-1947	CATTGCGCTAGACACTGATC
EGR-up9	<i>emer</i> cDNA 1937-1917	TGCAGTGCACGACTCCGCGCA
ER asen1 (T7)	<i>emer</i> cDNA 3222-3200	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCGGAGATGCGAT- CAATGGTGTG
ER DWsen1	<i>emer</i> cDNA 2816-2846	CAATTACAAGGCCAAACGCAGTCGTATTAAG
ER sen1 (T7)	<i>emer</i> cDNA 2826-2846	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCAAACGCAGTCG- TATTAAG
ER UPasen	<i>emer</i> cDNA 3231-3203	TACTTCTAGCGGAGATGCGATCAATGGTG
ER UPsen	<i>emer</i> cDNA 2816-2845	CAATTACAAGGCCAAACGCAGTCGTATTAAG
Ex-EGR-dw	<i>emer</i> cDNA 1899-1918	GCACGATGTCACGAAGAATG
Ex-EGR-up	<i>emer</i> cDNA 2693-2675	CTCGTCCAGGCAGAGATTG

*emer* Oligonucleotide (Schnittstellen)

E-Bam H1	<i>emer</i> cDNA *2944-2964	GGGAGAGGATCCACATTGATGACTTGACTTTTCG
E-Eco R1	<i>emer</i> cDNA *4715-4694	TTGGAAGAATCCTTGATTATCCACCAAGTAATCG
EGR 3' Not	<i>emer</i> cDNA *4754-4737	AGAGATGCGGCCGCTTAAACGGGTTTAGTCGG
EGR 7A 3' Not	<i>emer</i> cDNA *4708-4691	GTTGTTGCGGCCGCGCCACCAAGTAATCGGGA
EGR 8A 3' Not	<i>emer</i> cDNA *5051-5029	GTTGTTGCGGCCGCGACATCGGTTAGGCGCGG
EGR A6 Hind3	<i>emer</i> cDNA *2812-2836	GTTCTCAAGCTTAATTACAAGGCCAAACGCAG
EGR A6 Not1 (stop)	<i>emer</i> cDNA *3330-3308	AACATCGCGGCCGCTTATTGCATTTCCGGGTCAAACAG
EGR BAM Neu	<i>emer</i> cDNA *2916-2935	AAGCAGGGATCCAAATATGGGCCGTTGGGA
EGR C-Bam up	<i>emer</i> cDNA *4754-4733	CGCGGATCCCGTTAAACGGGTTTAGTCGGACCG
EGR C-Eco dw	<i>emer</i> cDNA *2814-2839	CGGAATTCAATTACAAGGCCAAACGCAGTCG

*emer* Oligonucleotide (Schnittstellen)

EGR Eco Extra	<i>emer</i> cDNA *5111-5092	...GAATTCCTTGCGCAGGTGAGAGAAG
EGR Eco neu	<i>emer</i> cDNA *4789-4760	GGGTCAGAATTCGAAGGGAGTAGAGATACG
EGR Kpn dw	<i>emer</i> cDNA *61-81	GATCGGGGTACCTAATGCTCCGGATTTGGACAAACG
EGR N-Bam up	<i>emer</i> cDNA *2693-2674	CGCGGATCCCGTTACTCGTCCAGGCAGAGATTGG
EGR N-Nde1 dw	<i>emer</i> cDNA *120-140	GGAATTCCATATGTTTAAGCTATCCCTTGCCCCA
EGR Not1-up	<i>emer</i> cDNA *4751-4736	CCTCGAGCGGCCGCAACGGGTTTAGTCGGA
EGR T1-Kpn	<i>emer</i> cDNA *379-400	GGTACCAGGATACCACTCATCTCATTACG
EGR T1-Not	<i>emer</i> cDNA *522-507	GTGATGGCGGCCGCTTACAACGGCAAGACTACGAAG
EGR-5' Hind	<i>emer</i> cDNA *120-141	GCCAATAAGCTTTTTAAGCTATCCCTTGCCCCAG
EGR-A6-Hind3	<i>emer</i> cDNA *120-141	GCCAATAAGCTTTTTAAGCTATCCCTTGCCCCAG
EGR-DIP-dw1-Eco	<i>emer</i> cDNA *330-351	GTTCTGAATTCATTTCGAGAAGTATCCGGCTATG
EGR-DIP-dw2-Eco	<i>emer</i> cDNA *699-720	GCGCCAGAATTCGCAACACGACCTGTCATAGTG
EGR-DIP-dw3-Eco	<i>emer</i> cDNA *1887-1906	GCTATCGAATTCGCAGTGAAGTGTGCACGATG
EGR-DIP-dw4-Eco	<i>emer</i> cDNA *2817-2836 (Fehler im Primer)	GTTCTCGAATTCAATACAAGGCCAAACGCAG
EGR-DIP-dw5-Eco	<i>emer</i> cDNA *3927-3945	ATCGAGGAATTCGAGTATGCGATAACTCGTG
EGR-DIP-dw6-Eco	<i>emer</i> cDNA *4479-4997	GCGCCAGAATTCCTTGCACAAGTGGAGCGTG
EGR-DIP-dw7-Eco	<i>emer</i> cDNA *3465-3486	CTAGAGGAATTCGGGATTATTCATCGTGATTTGG
EGR-DIP-up1-Bam	<i>emer</i> cDNA *710-690	GGCACTGGATCCGGTCGTGTTGCGACGCATTGG
EGR-DIP-up2-Bam	<i>emer</i> cDNA *1013-995	ACAGATGGATCCCAGCTCGTACTTGAAGTCG
EGR-DIP-up3-Bam	<i>emer</i> cDNA *2453-2436	CGTTGCGGATCCCACATAGGTGTCGTCAGG
EGR-DIP-up4-Bam	<i>emer</i> cDNA *3668-3647	CACACCGGATCCCCAGACATCGGTTTTGTGAGAG
EGR-DIP-up5-Bam	<i>emer</i> cDNA *4133-4117	CACCGGGGATCCACTGAAATCTCCCATTG
EGR-DIP-up6-Bam	<i>emer</i> cDNA *4751-4737	TACGCAGGTACCAACGGGTTTAGTCGG
EGR-DIP-up7-Bam	<i>emer</i> cDNA *3536-3516	AGCCAAGGATCCATCGGTTATTTGCACCAGCTC
EGR-Ex up-Not1	<i>emer</i> cDNA *2758-2738	AATCCCAGCGGCCGCTTAGGCCTGATTTTCGAGCACGCG
EGR-S2-3' Not	<i>emer</i> cDNA *4751-4732	GATACGGCGGCCGCAACGGGTTTAGTCGGACCGG
EGR-S2-5' Kpn (hat nur 3 T)	<i>emer</i> cDNA *120-141	GCCAATGGTACCTTTAAGCTATCCCTTGCCCCAG
EGR-S2-5' Kpn-4T	<i>emer</i> cDNA *120-141	GCCAATGGTACCTTTAAGCTATCCCTTGCCCCAG
EGR-T2-Not	<i>emer</i> cDNA *711-691	GTGATGGCGGCCGCTTAGGTGCTGTTGCGACGCATTG
EM BamH1	<i>emer</i> cDNA *2921-2937	TATGGGCCGTTGGGAGAGGATCCACAGTG
EM EcoR1	<i>emer</i> cDNA *4735-4721	CCGGCAGGTTGGAAGAATTCTTGATTATCC
ER-EcoR1	<i>emer</i> cDNA *4740-4721	ACGGGTGAATTCGGACCGGCAGGTTGGAAG

*emer* Oligonucleotide (Mutation für alternative C-Termini)

EGR 6A mut up	<i>emer</i> cDNA 4680-4639	CATTGAAACCTCTCGACCGTTTTTTTGCCATCGGCACTTGCTC
EGR 6A mut dw	<i>emer</i> cDNA 4639-4680	GAGCAAGTGCCGATGGCAAAAAACGGTCGAGAGGTTTCAATG
EGR 7A mut up	<i>emer</i> cDNA 4680-4639	CATTGAAACCTCTCGACCGTTTTTTTGCCATCGGCACTTGCTC
EGR 7A mut dw	<i>emer</i> cDNA 4639-4680	GAGCAAGTGCCGATGGCAAAAAACGGTCGAGAGGTTTCAATG
EGR 8A mut up	<i>emer</i> cDNA 4680-4639	CATTGAAACCTCTCGACCGTTTTTTTGCCATCGGCACTTGCTC
EGR 8A mut dw	<i>emer</i> cDNA 4639-4680	GAGCAAGTGCCGATGGCAAAAAACGGTCGAGAGGTTT- CAATG

*emer* Oligonucleotide (Chimären)

EGR CHI dw *emer* cDNA 2817-2839 GCTGGGCGGCACTTTTCTCTACTGGAATTACAAGGCCAAACGCAGTCG  
 HsErbB3 cDNA 2073-2097

EGR CHI up *emer* cDNA 2747-2728 CAATCCTGCTATCACTGTCAAAGCCATGGCCTGATTTCGAGCACGCG  
 HsErbB3 cDNA 2055-2029

### 5.14.6 EmER - Sequenzanalysen

Die Ergebnisse der von A. Kroner [183] durchgeführten Sequenzanalysen der cDNA und des chromosomalen Locus von *emer* sind in den zwei folgenden Abbildungen wiedergegeben. Domänenstruktur und Homologiewerte (Abb. 123), Aminosäuresequenz, funktionelle Reste und Domänenstruktur (Abb. 124).

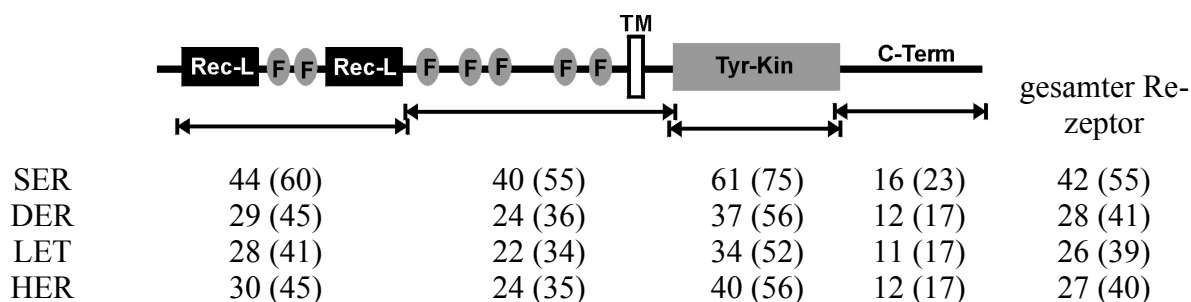


Abb. 123: Homologiewerte zwischen EmER und verschiedenen EGF-Rezeptor-Orthologen.

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der EmER-Domänenstruktur, mit den Rezeptor-L-Domänen (RecL), den cysteinreichen Furin-ähnlichen Repeats (F), der Transmembrandomäne (TM), der Tyrosin-Kinase-Domäne (Tyr-Kin) und dem C-Terminus (C-Term). Einzelne Domänenstrukturen sind mit einem schwarzen Doppelpfeil markiert. Der prozentuale Homologiewert dieser Domänen zu den verschiedenen EGF-Rezeptor-Orthologen ist darunter angegeben, wobei die ähnlichen Reste im Gegensatz zu den Identischen in Klammer stehen. Zusätzlich ist noch die Werte für den gesamten Rezeptor angegeben. Die Werte beziehen sich auf Ähnlichkeiten zwischen EmER und den EGF-Rezeptoren von *S. mansoni* (SER; [287]), *D. melanogaster* (DER; [194]), *C. elegans* (LET; [16]) und *H. sapiens* (HER; [319]).

A A A A A A A A A C G T G C A G T T T T G A A C T C T G C C A G T C C A G G T G A T G T G G T T T T T C T A G G A T G C T C C G G A T T T G G A C A A C G C T T T C A T C C C T T T A T T G T T	100
<b>↓ Intron 1 (31 bp): GTATA...TTTAG</b>	
<b>↓ Intron 2 (34 bp): GTAAT...TTTAG</b>	
T T C T G G G G C C A A T T T T G C A T T T A A G C T A T C C C T T G C C C C A G A A T A C G A G G A T A T A A A A T A T G T C G A A G C A G G A A T A T G A T T G C C G C A A C T C G A T G A A T	200
S G A N F A F K L S L A P E Y E D I K I C R S R N I D C R N S M N	47
<b>Intron 3 (33 bp): GTATA...CTTAG ↓</b>	
G C T A A A C C T T A C T T G C A T A C T A T A A A A G A C A G T A T T C T C A G T G C A C A C A T A T T A T A G G C A A T C T T G T T T T G T G C A A C T T A A A A C G A C T A G A G G A T G G T A	300
A K T L L A Y Y K R Q Y S Q C T H I I G N L V L C N L K R L E D G	80
G T G A T C C T G A T C T C C T T C C T G A A T T C A A T T C G A G A A G T A T C C G G C T A T G T T A T A T A G G T A A A T A A T G A G G T G A A A C G G A T A C C A C T C A T C T C A T T A G G	400
S D P D L S F L N S I R E V S G Y V Y I G N N E V K R I P L I S L R	114
G A T C A T T C G T G G A C G A G T A C C A T A T C A C G T T G G A A A T G T C G G T G A T G G A G C C C T A A T T G T G A C T C G T A A T G C C A A A A T T A C A C T C A T G G A T T A G A A G T T	500
I I R G R V P Y H V G N V G D G A L I V T R N A K N Y T H G L E V	147
T T G G A T C T C G T A G T C T T G C C G T G A T A C A G G A G C A C A A T A T A A T A G C A T G G G A C A A T C C A A T G C T A T G C C A C T T C C A A T A C A C C G T C G A C T G T C C A C A G C	600
L D L R S L A V I Q E H N I I A W D N P M L C H F Q Y T V D C P Q	180
T C T T C G T G G A T G T G A A G A A T C A G A G A C G A C T G A G T G T C T C T A A G G A G A A T C T C A T A T C T G C C A G T G G C T G C G A T T A C G A T A C T G A C T G C C A A T G C G T C G	700
L E V D V K N Q R R L S V S K E N L I S G S G C D Y D T D S P M R R	214
<b>Intron 4 (1916 bp/+): GTGAG...AAAAG ↓</b>	
C A A C A C G A C C T G T C A T A G T G C C T G C T C C G A A A T G A C G A G A A G G G C A C T G C T G G G G A C C A G A G A A A T C A G T G T C A A C T T C G T T C A A A A T G T A C C A A G	800
N T T C H S A C S E N D E K G H C W G P E K N Q C Q L R S K C T K	247
<b>Intron 5 (2411 bp/+): GTGAG...CGCAG ↓</b>	
G A A T C C A C C A C G T A C T G C C G T T T A G A C A A C C C T T T C G A A C G G A T A A A G T G T A T G A T G C C T G A T T G G C G G T T G C A A T G G T A G C A C C T C G A A T T G T G G G	900
E S T T Y C R L D N P F E R I K C D D A C I G G C N G S T S N C W	280
C G T G C G A C C A A G A G G A A T G G C G A C A C T G T G T G A G C T T C T G T C C C C A C G C C A C A T G T G A A C C C G A C G A C G A G T C G A C A G G A G T G A A T C C C G A C T T	1000
A C R S K R N G D T C V S F C P P R H H V N P T T S R Q E L N P D F	314
<b>Intron 6 (2481 bp/+): ↓ GTTGG...TTACG</b>	
C A A G T A C G A G C T G C A T G A C A T C T G T G A G A C A G T G T C C A G A G C C G T G T T G A A G A T G G A C A C G G T G T C G G T G A T T G A A T G T G A C T T C A A A A C A A C C A T A	1100
K Y E L H D I C V R Q C P E P L L K M D T V C V I E C D F K T T I	347
<b>Intron 7 (1193 bp/+): ↓ GTAAG...TATAG</b>	
C C A G T G A A T G G C A G T T G T G T T C C C T G T G C A A A A C C C A T G T C T A A T C A T T G T G A A C A G A A G A T A T T T T T G G T T C G C G A T T T C C C T T G A T G A C A T C T G	1200
P V N G S C V P C A K T P C A N H C E Q K D I F G S R F P L M T S	380
<b>Intron 8 (1118 bp/+): ↓ GTGAG...CTAAG</b>	
C G G T G C A A A G C G G A T G A G C C A G T G T G T C T T A T T C A G G C G C T A T C A C A T A A A G G T A A A T T A A A G C G A C C A G G C C T C C A A A T	1300
A A A K R M S Q C V F Y S G A I Y I N K D S F K V T L K R P G L Q I	414
T G A A G T C T C T G G A A T T G C A T A A T A T A C G C G A A A T T G T G G G C T A C A T T A C C T C G A T T G G A T G C C T C C T C G C G G A G T T G A G A A A T T T G A C A T T T T T G	1400
E D L W N L H N I R E I V G Y I Y L D L D A S S P E L R N L T F L	447
<b>Intron 9 (259 bp/+): ↓ GTAAT...TACAG</b>	
G A G A A C C T C T A C A A A G T T A C T A C T G A A T T T T C T G A T G G A G T A T G C A C A G T G A T T C A A C C T C T G G T G A T A T A T C A T T C A A A G T A T T T G G A G T T T T T G G G A C T A A	1500
E N L Y K V T T E F S D G V S L D Q P L V I Y H S K Y L E F L G L	480
A A A G T C T C G C T A T A T G G A C A T G A C T G C C T A T T T G A G G C G C T G C C A T C T T T G T G C T A T A C A A G C G C T C T G G A G A A G A T T C T C C T G T C G A A C T A A G G G	1600
K S L R Y M D M T A Y L E A L P S L C Y T S A L E K I L P V R T K G	514
<b>↓ Intron 10 (2756 bp): GTGAG...GCAAG</b>	
A G T C A A G G A T C C A G C C A C T T G C A T C C G G A A G C C A C G T G T C A C A G T G A T T C C C C G A A G C A G G T T G C T G G G G T C C T G G G C C C G C A A T G T G T G C C	1700
V K D P A T C I R E G H V C H S E C L P E A G C W G P G P A M C A	547
C A C T G C T G C A C C T T C G A A G C C A A C G G T G T C T G T C T C C G A T T G C T C T G A G G C A C C C G G T T C T A C C T C C C C C G A G C T C T G C T G T C T A C G C T C A C G T	1800
H C C T F E A N G V C V S D C S E A P G F Y L P P S S A V S T L T	580
C G A A A T T C G T T T G C G A C T T T T G C A C T T T C A A T G A A A C A A G T G G C A C A A A T G C A G G A G G A G G T T T A G C G G C T A C C G A C T G C A G T G A A G T G T G C	1900
S K F R C R T L P L S M K Q V A Q M Q E E E V L A A I R P A V K C A	614
<b>Intron 11 (5605 bp): GTGCG...TTTAG ↓</b>	
A C G A T G T C A C G A A G A A T G C G C G G A G T C G T G C A C T G C A C C T G G G C C G G A T G C T A G G C A A T T T C A A G C A T T T C A A G C A T T T G T G T C A A G	2000
R C H E E C A E S C T A P G P D Q C L G E C K H F K S G D T C V K	647
C G T G C T C G A A G G A G C A G T A C G C T G A G G A G A A G C A G A G C T G T C A C C C T G C A A C T C C A A G T G T T T A G C G T C T G A A G T C C A A A T T C C C T C C A G A T G	2100
R C S K E Q Y A E E K Q K L C Q P C N S K C L A S L K S K F P P D	680
<b>Intron 12 (3650 bp): GTGG...ATCAG ↓</b>	
A C A T C T C G G T G C T C T G G A C C G G C G A T T A C C T G G A C T T G G G G A T G T G C T T C T A C T T T T G T G A A A A A G C A A A G C C A C C T C C A A G T A C C A G T G	2200
D I S A C S G P G D Y L G L G G C A F C Y F V K K D K A T S K Y Q C	714
C C T G G A T A G A A T G T C C A C C A A A C A C T T C G G C A A C G C A C A T C T T T G A C G A C T C T G A A C T T G A A G A A A G A G A A T T C C C T T A G T C A G T G T G C G G G C A	2300
L D M K C P P K H F G N A T S L T H L N L K K E E F P L V S V R A	747
G C A A A T T C G G A T C T T C A G A A T G C G T T C C C T G C C A T C T G A A T G C G A G G T T T G T G C G G T C C A G A A A T C A C G T C T C C G T T T G T C G A A A A T T C G A A A T T	2400
A N A D L Q E C V P C H P E C E V C V G P G N H V S V C R K C R N	780
<b>Intron 13 (1551 bp): ↓ GTGAG...TTTAG</b>	
G G A T G T A C C G T C G G A G T G T G C A A T G C C T G T C C T C T G A C G A C A C C A T G A T G T G C C G A A T G C A A G C C A C A G A A C A C C T C T C A G A G A G A A A A C A G A T	2500
W M Y R S E C V N A C P P D D T Y V P N A T A T E H L S E R E K Q M	814
G T T G A G A G G C G G A A T G C T A C G A T G C A T G A G C A A T G T G T G A G G G T G A C G C C T A C G A C C G G A T T C T G C A C A A C T G T C G C T A T G C C A A A T C	2600
L E R R E C L R C H E Q C A G G C T A Y G P E F C N N C R Y A K I	847
<b>Intron 14 (3618 bp/+): ↓ GTTTG...AACAG</b>	
A T G A T T G A T G C A G G C G A A A G T T A T C T G C A A C T C A A C A T G C C C A C C A G A G C T C T A C A A A A T G G A A A C A C C A A T C T C G C T G G A C G A G G A G C A G T	2700
M I D V Q A N A K F I C N S T C P P E L Y K M E N T N L C L D E E Q	880
A C G A A A A A T G C G G G T G C A A A A T T G C G C G T G C T G A A A T C A G G C C C A T A G C G G T G G G A T T G T C C T C T T T C T C C A T C T T C T C T G T A C T	2800
Y E K M S G A K L A R A R N Q A L I A A G I V L L F L L I F S L V L	914

<b>Intron 15 (3322 bp):</b> GTGAG...TGCAG ↓	
TTCTGTTCTCTGCTTCAATTACAAGGCCAAACGCGAGTCGTATTAAAGGAAGCCTTAAAATCTACCTACACTAATACCAAAGCACCGGATATGAAGGACGCA	2900
<b>S V L C F</b> N Y K A K R S R I K E A L K S T Y T N T K A P D M K D A	<b>947</b>
AAATCAAGCAGGGAACCAATATGGGCGCTTGGGAGATGATCAACATTGATGACTTGACTTTTCGACGATGCCAACAAATCCCATCGGCAGAGGGGCATTTG	3000
K S S R E P N M G R W E M I N I D D L T F <b>D D A N N P I G R G A F</b>	<b>980</b>
GTGAGGTGTATCGAGGCAAGTGGCGAGTACCGAAGCGAGTGTGAATCAGTTCAATTGGGACCGGAACACTTCGCTGGATGTGGCTATCAAAGTATTG	3100
<b>G E V</b> Y R G K W R V P K R V L N Q F N W A R N T S L D V A I <b>K V I R</b>	<b>1014</b>
ATCAGCTGCGCCACAGCTCAAGGTGGTGTGCTGCGTCAAACTCGGTGCCTCTGGATTAGACGGCAATGTCAGCACCGTTGCAAGCTCTCAGCTGGGCGCC	3200
S A A P T A Q G G A A S N L G A S G L D G N V S T V A S S Q L G A	<b>1047</b>
<b>Intron 16 (1798 bp/+):</b> ↓ GTAAC...TGTAG	
AACACCATGATCGCATCTCCGCTAGAAGTAATCTCCAGGATATGCTTACGGAAGCCAAAGTAATGGCCTCGGTGCAGCATAAGAATTGTCTGCCCTCA	3300
N T I D R I S A R S N L Q D M L T <b>E</b> A K V M A S V Q H K N C L P L	<b>1080</b>
TTGGTGTCTGTTTACCCGGAAAATGCAATGCATGGTGTGATGTTTGGGAGGAGGCGAGTCTGGATCGTTACCTACGCCCTCCACAGGGACGACTTGAA	3400
I G V C L T R K M Q C M V S M F V E E G S L D R Y L R L H R D D L N	<b>1114</b>
<b>Intron 17 (1471 bp/+):</b> ↓ GTGAG...CGCAG	
TAGTTTACCTTGTCTTTCATGGGCGGAACAGATTGCTGACGGGATGGCCTACCTAGAGGAACGTTGGGATTATTCATCGTGATTGGCTGCAAGAACGCTG	3500
S F T L L S W A E Q I A D G M A Y L E E R G I I <b>H R D L A A R N V</b>	<b>1147</b>
CTTGTTCAAATCTCGGGAGCTGGTGCAATAACCGATTTCGGATTGGCTAAAATGTTGGACCAACAACGAGGACACGGTGTAGTTCGCACTGGACGCTG	3600
L V Q S R E L V Q I T <b>D F G</b> L A K M L D T N N E D S V V V R T G R	<b>1180</b>
<b>Intron 18 (83 bp/+):</b> ↓ GTAAT...TGCAG	
TTCCAATTCGTTGGTGGCTATTGAGACGCTTCAAGCTGGCATCTACTCTCACAAAACCGATGCTGGAGCTACGGTGTGACGCTGTGGGAGATTTTTCAC	3700
V P I R W L A I <b>E</b> T L Q A G I Y S H K T <b>D</b> V W S Y <b>G</b> V T L W E I F T	<b>1214</b>
ATTGGCAAACAACCCCTACGAAAATATAAGCACCTCGGAGATTAAAGATCATGTAATGAAGGAGTGGCGCTGAGTCAGCCAGAATTTGTACGCTTGAC	3800
F G K Q P Y E N I S T S E I K D H V M K G V R L S Q P E I C T L D	<b>1247</b>
<b>Intron 19 (87 bp/+):</b> ↓ GTAAG...TCTAG	
ACCTACATGGTGTGATGGTCAATGCTGGATGGAAGAACACGAATCCAGACCGACTTCTTAGAGCTGATGAAATGTTCCACAAGTACTGTCAAACGCCGG	3900
T Y M V M V Q C W M E E H E S <b>R</b> P T F L E L M K C F <b>H</b> K Y C Q T P	<b>1280</b>
<b>Intron 20 (181 bp):</b> ↓ GTAAT...TTTAG	
GCAGATACTTGTACATCGAGGGCGATGAGTATGCGATAACTCGTGCCTCTCCGTACACCCCTTACCAGGCTCCTTGGACCGAGATGAAGCCGCTGCCAG	4000
G R Y L Y I E G D E Y A I T R A S P Y T P S P A P W T E M K P L P S	<b>1314</b>
TAGTTTCCGGGCGTACCAGACGGCACTTTGGGGCCACCAATGGGACGGGGTGTGCCTTTAGGTTCCCTGAAGAGCACTTCTTCGATGATCATCAACAC	4100
S F R G V P D G T L G P P N G T G C A F R F P E E H F F D D H Q H	<b>1347</b>
CACCTTCTGGGAGAGACAATGGGAGAGGGCAGTGGCAACCCGGAGGCAGAATCTCTTCTCCGACAGAGTTGGCAACGATCATCATCATCGCCGAT	4200
H L L G E T M G E G S G N P E A E S L L P Q R V G N D H H H H R R	<b>1380</b>
TTTCTCCCACTCAAAATGAGACGAGAATGCGACAAGCGGGCGACAGGAGCGTGTCCGGCTGCTGGTGGTGGTGCATCGACAAAACACTTCGCTGGTCTC	4300
F F S H S N E T R M R Q S G R Q Y E R A P A A G G G A S T N T S V V S	<b>1414</b>
<b>Intron 21 (176 bp):</b> ↓ GTGCG...GTGAG	
GACGAATTTGGACTCGTGGCCAGCTGGAAGCGGGATGGGATTGAATGCCGCTTCCCTGTCTTAGAGCATAGTCGAAACAGCAACAACCAACCGAAATAC	4400
T N L D S W P A G S G M G L N A A F P V L E H S R N Q Q Q Q P K Y	<b>1447</b>
TACAACACCGCTTTTCTGGCCAGTGGCACTTACGGACCCCTTGTAGACCACCATCACCCAGCCAGCCACCACCCCTTGCACAAGTGGAGCGTGATG	4500
Y N T A F L A S G T Y G P L V R P P S P P P A P P P L A Q V E R D	<b>1480</b>
ATGACTTAGACACGATGGGTAGTGGGATTAAGACGCTGAGATTAACCTCTCCACTCTCGAGATGCTATGGACGGTGTGGAGGGAGCGGGTGGAGG	4600
D D L D T M G S G I K D A E I N Y L R A P A L E M S M D G V E G A G G G	<b>1514</b>
<b>Intron 22 (156 bp):</b> ↓ GTAGG...TGAAG	
GGAACAATCGTTGACGAGCAGAACTACCTGGAACCCAGAGCAAGTGGCCATGGCAAAAACGGTTCGAGAGGTTTCAATGCCGTTGGAATCCCGATTAC	4700
E Q S L Q P E D Y L E P R A S A D G K K R S R G F N A V G N P D Y	<b>1547</b>
TTGGTGGATAATCAAGAATACTTCCAACCTGCCGTCGACTAAACCCGTTTAAAAATGCGTATCTCTACTCCCTCCCCACCTGACCCCTTCCCTTCACA	4800
L V D N Q E Y F Q P A G P T K P V .	<b>1564</b>
TCTGGTGAATAATACCCCAATCAGCACAGGTGGTGAGAGATGGAAGAGCACATATCATTGTTTATACCCCTCCACACACATCCATCTTCA	4900
ACGTACCTACCTGTGAATACCGTCAAGTATTACAGAGGCCATGGTAAATATGGCTTCTCCGCGCTCTTCTACCCATCCTTCAGACTCTTCTTATTTGC	5000
TCCGCGAGCCCTTTCCAGCTTGCATCCCGCGCTAACCAGATGTTGACTGCGTTCATTGAAACTTCCGCGCCATACACACCAGCTTACTTCTCTCA	5100
CCTGCGCAAGCAACTTCAATTTCTACTGACAAATAAATTAGTAGTACATGCCCCAAAAAATAAAAAAAAAA	5173

Abb. 124: EmER - cDNA, abgeleitete Aminosäuresequenz und Domänenstruktur.

Gezeigt ist die gesamte cDNA-Sequenz (oben) von *emer* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des EmER-Proteins (unten, fett). In der cDNA-Sequenz sind das Start-ATG und das Stop-TAA unterstrichen. Ein Punkt am Ende der Aminosäuresequenz markiert das Stop-Codon. Die Positionen der Introns des genomischen Locus sind mit Pfeilen markiert. Für jedes Intron ist die Größe sowie die Sequenz des 5'-Donors und des 3'-Aktzeptors angegeben. Zusätzlich sind hinter der Größe der Introns die mit einem + markiert, deren Introngrenzen mit der des humanen EGF-Rezeptors übereinstimmt. Weiß auf dunkelgrauem Grund sind die N-terminale putative Signalsequenz (AS 1-20) und die hydrophobe Transmembranbrandomäne (AS 897-919). Die 2 Rezeptor-L-Domänen (AS 61-193 und 388-512) sind weiß auf schwarzem Grund markiert. Die 7 cysteinreichen furinähnlichen Repeats (AS 214-253, 261-299, 518-570, 610-655, 659-725, 752-798 und 817-868) im extrazellulären Teil des Rezeptors sind hellgrau unterlegt, die einzelnen Cystein-Reste dieser Domänen sind weiß auf schwarzem Grund markiert. Im intrazellulären Bereich ist die Tyrosin-Kinase-Domäne (AS 969-1273) dunkelgrau unterlegt, außerdem sind die AS-Reste, die zwischen Tyrosin-Kinasen hoch konserviert sind [142], weiß auf schwarzem Grund markiert.

## 5.15 EmERK-A/B/C

EmERK-A, EmERK-B und EmERK-C unterscheiden sich im C-Terminus ab AS 320 (cDNA: bp 1028). An dieser Stelle befindet sich in der chromosomalen DNA-Sequenz das differentiell gespleißte Intron 9 (chr DNA bp 5462), das einen Spleißdonor (GT) und drei verschiedene Spleißakzeptorstellen (AG) aufweist. Wird das vollständige Intron 9 von 808 bp herausgespleißt, entsteht *emerik-A*, wird dagegen ein verkürztes Intron 9 herausgespleißt, entsteht *emerik-B* wenn 303 bp herausgespleißt werden und *emerik-C* wenn 590 bp herausgespleißt werden.

### 5.15.1 EmERK: Material und Methoden

Sämtliche molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden finden sich in den Kapiteln 5.1 - 5.13. Die verwendeten Organismen und deren Kultivierung ist in den Kapiteln 5.6 - 5.12 beschrieben. Für Computeranalysen wurden die Programme und Methoden aus Kapitel 5.1 verwendet.

#### Klonierung der *emerik* cDNA und des chromosomalen Locus:

Die *emerik* cDNA wurde über eine degenerative PCR aus einer Plasmid-cDNA-Bank (hergestellt von K. Huber [158]) isoliert. Aus Aminosäuresequenzen mit den Motiven EHQTYCQ und WY-RAPEI, die in ERK-Faktoren hoch konserviert sind, wurden codierende Sequenzen abgeleitet (Abb. 57) und darüber die degenerierten Primer ERK-N1 (5'-GAGCAYCARCANTAYTG YCA-3', R = Purin, Y = Pyrimidin, K = G + T, N = alle Nucleotide, *emerik-A* cDNA: 239-259, EmERK-A Proteinsequenz: EHQTYCQ) und ERK-C2 (5'-ATTTCYGGNGCNCGR TACCA-3', *emerik-A* cDNA: 655-635, EmERK Proteinsequenz: WYRAPEI) bestimmt. Mittels PCR (30 Zyklen: 94°C – 2', 53°C – 2', 72°C – 2') konnte ein Fragment von 411 bp amplifiziert werden, das nach einer TopoTA-Klonierung und Sequenzierung hohe Homologien zu schon bekannten ERK-codierenden cDNAs aufwies. Mit dem aus dieser Sequenz abgeleiteten Primer Erk-dw2 (5'-GTTGAGTCGC-GAGCACACCTG-3', *emerik-A* cDNA: 421-441) und dem Vektorspezifischen Primer Ig4-3 (5'-TTGGAGACTTGACCAAACCTCTG-3') sowie Erk-up (5'-GTACGTTGACAATATGTTTGG-3', *emerik-A* cDNA: 264-244) und dem vektorspezifischen Primer Ig4-5 (5'-GATGCCTCCTAC-CCTTATGATG-3') wurden dann aus einer plasmidbasierten *E. multilocularis*-cDNA (s.o.) über eine 3' und 5'-RACE der fehlende 3'- und 5'-Terminus amplifiziert (94°C-1', 58°C-1', 72°C-2'), in TOPO-TA kloniert und sequenziert. Die vollständigen Leseraster für *emerik-A* und *emerik-B* wurden anschließend mit dem 5'- spezifischen Primer Erk-5'-dw (5'-ATGAGTGGTGATATTTCT-GATCCA-3', *emerik-A* cDNA: 71-94) und dem für *emerik-A* 3'-spezifischen Primer Erk-3' (5'-ACCTGCATCTATAGGCTCAG-3', *emerik-A* cDNA: 1153-1134) sowie mit dem für *emerik-B* 3'-spezifischen Primer Erk-3'-stop-up (5'-TCATACGACAATGCTGAAATC-3', *emerik-B* cDNA: 1049-1028) amplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und das Plasmid anschließend sequenziert. Das vollständige Leseraster für *emerik-C* konnte während einer 3'-RACE aus einer Plasmid-cDNA-Bank (hergestellt von K. Huber [158]) isoliert werden.

Der chromosomale Locus von *emerik-A*, *emerik-B* und *emerik-C* ist identisch und wurde in 5 überlappenden Fragmenten über PCR aus chromosomaler *E. multilocularis*-DNA amplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und abschließend sequenziert. Die 5 Fragmente wurden mit den folgenden Primerkombinationen amplifiziert. **F1:** Erk-5'-cDNA (5'-GTTAACATTGTCATTCCCTTGG-3', *emerik-A* cDNA: 5-26) × Erk-int-up1 (5'-GTACGTTGACAATATGTTTGG-3', *emerik-A* cDNA: 264-244), **F2:** Erk-5'-mod (5'-GTGAGTGGTGATATTTCTGATCCA-3', *emerik-A* cDNA: \*71-94) × Erk-up1 (5'-GCGAGTGGCCACGTACTCAGTC-3', *emerik-A* cDNA: 634-613), **F3:** Erk-int-dw2 (5'-GGCTCGCACGAATTGCCG-3', *emerik-A* cDNA: 567-584) × Erk-int-up3 (5'-GTGTT ACT-TATGGAGTTGATG-3', *emerik-A* cDNA: 834-814), **F4:** Erk-int-dw3 (5'-GATGATTCTTGA GGTCTCGG-3', *emerik-A* cDNA: 775-795) × Erk-up2 (5'-GGGTCTGCAAATGGGAAGAG-3', *emerik-A* cDNA: 912-893), **F5:** erk-dw6 (5'-GAACGTACCTGGAGCAGTTG-3', *emerik-A* cDNA:



843-862) × Erk-3'-aussen+g (5'-GTTGAAGATAGCGTTTGAATTTCG-3', *emer*k-A cDNA: \*1200-1179).

### Echinokokkenspezifischer Nachweis

Für den Nachweis, dass *emer*k-A/B/C ein Echinokokkenfaktor ist, wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (vergl. 5.10.1) und der Leber eines uninfizierten Gerbils (*M. unguiculatus*) mit dem DNeasy Kit (Qiagen) chromosomale DNA isoliert. Mit jeweils 1 µl (1:100 verdünnt) dieser DNAs als Template wurden PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") durchgeführt, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Echinokokkenspezifischen Primer für *emer*k-A/B/C waren Erk-dw2 (5'-GTTGAGTCGCGAGCACACCTG-3', *emer*k-A cDNA: 421-441) und Erk-up1 (5'-GCGAGTGGCCACGTACTIONCAGTC-3', *emer*k-A cDNA: 634-613) und ergaben ein Produkt von ~ 620 bp. Für die Gerbil-spezifische PCR wurden die Primer Tub12up (5'-CCCCAAGTGTATGATACTIONGG-3') und Tub12ST (5'-CTGGGCAGTC-CGGCAACCA-3') eingesetzt, die im Gen für β-Tubulin [46] von *M. unguiculatus* binden und ein Produkt von 1.1 kbp ergaben.

### RT-PCR: Expression in Zyste und Protoscolex

Um die Expression von *emer*k-A/B/C während einer Infektion des Zwischenwirts (*M. unguiculatus*) und in den verschiedenen Larvenstadien zu untersuchen, wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) die Gesamt-RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (vergl. 5.10.1), *in vivo* kultiviertem Gesamtlarvenmaterial (vergl. 5.9.4), *in vivo* kultivierten Protoscolices (vergl. 5.9.6) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten (vergl. 5.9.6) Protoscolices isoliert und mit dem SMART II cDNA Synthesis Kit (BD-Biosciences) in cDNA umgeschrieben. Jeweils 1 µl dieser cDNA wurden dann in der folgenden PCR (30 Zyklen: 94°C – 30", 57°C – 30", 72°C – 30") eingesetzt. Der gemeinsame Nachweis (Größe: ~220 bp) von *emer*k-A, *emer*k-B und *emer*k-C erfolgte über eine Amplifikation mit den Primern Erk-dw2 (5'-GTTGAGTCGCGAGCACACCTG-3', *emer*k-A cDNA: 421-441) und Erk-up1 (5'-GCGAGTGGCCACGTACTIONCAGTC-3', *emer*k-A cDNA: 634-613), die im N-terminalen Bereich der *emer*k-cDNA binden.

Der Nachweis der verschiedenen Spleißformen *emer*k-A/B/C erfolgte über zwei PCRs mit Primern die im C-terminalen Bereich der *emer*k-cDNA binden. Die verwendeten cDNAs wurden wie oben beschrieben aus Gesamt-RNAs der verschiedenen Entwicklungsstadien hergestellt. Mit der Primerkombination ERK-dw6 (5'-GAACGTACCTGGAGCAGTTG-3', *emer*k-A cDNA: 843-862) und ERK-3'-mod (5'-GCCTGCATCTATAGGCTCAG-3', *emer*k-A cDNA: \*1153-1134) konnten alle drei Varianten (*erk-A*: 290 bp, *erk-B*: 781 bp, *erk-C*: 503 bp) amplifiziert werden (30 Zyklen: 94°C – 30", 57°C – 30", 72°C – 40"). Mit der Primerkombination ERK-dw6 (5'-GAACGTACCTGGAGCAGTTG-3', *emer*k-A cDNA: 843-862) und ERK-3'-C-spezifisch (5'-GTATTTTACACAATACAAGCATAG-3', *emer*k-C cDNA: 1128-1093) konnten Fragmente für die B-Spleißform (497 bp) und die C-Spleißform (210 bp) amplifiziert werden.

Alle PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### EmERK – Kinaseassay

Für den Kinaseassay (vergl. C) wurde natives EmERK (vergl. A) und rekombinant exprimiertes EmERK-A (vergl. B), das in Echinokokken-Lysat aktiviert wurde, eingesetzt.

**A)** Das native EmERK wurde mit einem ERK-spezifischen Antikörper (Anti-Erk1/2(MAPK), Stressgen) und einem Phospho-ERK-spezifischen Antikörper (Anti-Erk1&2[pTpY<sup>185/187</sup>], Biosource) aus dem Überstand von Echinokokken-Lysat-A (für die Immunpräzipitation) immunpräzipitiert (vergl. 5.5.9). Für das Echinokokken-Lysat-A wurden *in vitro* kultivierte Metacestodenvesikel von der Hydatidenflüssigkeit befreit und bei 3000 g pelletiert. 500 µl des Pellets wurden in 5 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Nonidet, 0.1% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS, 1mM Na-ortho-Vanadat

und Protease Inhibitor Cocktail von Roche) resuspendiert und unter Verwendung des Fast Prep Purification Systems mit Lysing Matrix B (beides Qbiogene) lysiert (vergl. 5.5.4) und anschließend 10 min bei 15.000 rpm zentrifugiert.

**B)** Für die rekombinante Expression wurde die codierende Sequenz von *emerK-A* über PCR mit den Primern Erk-5' mod (5'-GTGAGTGGTGATATTTCTGATCCA-3', *emerK-A* cDNA: \*71-94) × Erk-3' (5'-ACCTGCATCTATAGGCTCAG-3', *emerK-A* cDNA: 1153-1134) amplifiziert, in die Vektoren pBAD sowie pBAD/THIO-TOPO (beide Invitrogen) kloniert und anschließend sequenziert. Das pBAD/THIO-Expressionsplasmid, in dem *emerK-A* N-terminal mit einem Thioredoxin und C-terminal mit einem V5-Antikörperepitop und einem 6×His-Tag fusioniert ist, erhielt den Namen pThio-ErkA, das pBAD-Expressionsplasmid, in dem *emerK-A* nur C-terminal mit einem V5-Antikörperepitop und einem 6×His-Tag fusioniert ist, erhielt den Namen pBad-ErkA. Die Induktion der Fusionsproteine erfolgte wie unter (vergl. 5.6.5) beschrieben in *E.coli*-TOP10 Zellen für 3 Stunden unter Zugabe von 0.2% Arabinose. Anschließend wurden die Fusionsproteine nativ aufgereinigt (vergleiche 5.5.6). Aus dem Überstand wurde pThio-ErkA mit dem anti-Thio-Antikörper (Invitrogen) und pBad-ErkA mit dem anti-V5-Antikörper (Invitrogen) immunpräzipitiert (Vergl Kapitel 5.5.9). Jeweils ein Teil dieser Immunpräzipitate wurde 1 Stunde in Echinokokken-Lysat-B aktiviert. Für das Echinokokken-Lysat-B wurden *in vitro* kultivierte Metacystodenesvesikel von der Hydatidenflüssigkeit befreit und bei 3000 g pelletiert. 500 µl des Pellets wurden in 900 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 0,1% SDS, 1mM Na-Ortho-Vanadat und Protease-Inhibitor-Cocktail von Roche) resuspendiert und unter Verwendung des Fast Prep Purification Systems mit Lysing Matrix B (beides Qbiogene) lysiert (vergl. 5.5.4) und anschließend 10 min bei 15.000 rpm zentrifugiert.

**C)** Für den Kinaseassay wurden je Ansatz zu 45 µl Map-Kinasepuffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 100 µM ATP, 0.5 mg/ml MBP (Biomol)) jeweils 30 µl der 2 nativen EmERK-Immunpräzipitate oder jeweils 30 µl der 4 rekombinant exprimierten EmERK-Proteine (aktiviert und nicht aktiviert) zugegeben. Die Reaktionsansätze wurden nach der Zugabe von jeweils 4µCi γ-[<sup>32</sup>P]-ATP 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 2×Stop-Mix gestoppt. Jeweils 20 µl wurden in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und für 5 Tage auf einen Röntgenfilm gelegt.

### Southern-Blot

Für den Southern-Blot wurde chromosomale *E. multilocularis*-DNA aus *in vivo* gewachsenem Parasitengewebe (DNA-Isolation: 5.1.4, Parasitenmaterial: 5.9.3) verwendet. Jeweils 20 µg der chromosomalen DNA wurden für jeden Restriktionsverdau (HindIII, KpnI, NsiI, PstI, SphI, XmnI) eingesetzt (Restriktionsverdau: 5.4.14). Die Auftrennung der DNA-Fragmente, der Transfer auf die Nylon-Membran, die Herstellung und Aufbereitung der Sonden, die Hybridisierung und die verschiedenen Waschschrte wurden wie unter 5.4.17 beschrieben durchgeführt. Die Sonde für die Hybridisierung wurde über PCR (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 1') aus chromosomaler Echinokokken-DNA mit den Primern Erk-5'-dw (5'-ATGAGTGGTGATATTTCTGATCCA-3', *emerK-A* cDNA: 71-94) und Erk-up1 (5'-GCGAGTGGCCACGTA<sup>CT</sup>CAGTC-3', *emerK-A* cDNA: 634-613) amplifiziert.

### Antikörper, Western-Blots, Immunhistochemie

Für die Erkennung von EmERK in Echinokokken-Material wurden der polyklonale Kaninchen-αERK1/2 -Antikörper (KAP-MA001, Stressgen) verwendet, der gegen das C-terminale Peptid (PFTFDMELDDLPKERLKELIFQETARFQPGAPEAP, unterstrichen sind die mit EmERK-A identischen AS) des menschlichen ERK1 gerichtet ist. Die doppelte Phosphorylierung von EmERK-A kann mit dem polyclonalen anti-phospho-ERK1/2 (pTpY185/187) -Antikörper von Biosource nachgewiesen werden, der gegen das phosphorylierte TXY-Motiv von ER-Kinasen gerichtet ist. Für Western-Blots wurden Lysate von rekombinant hergestelltem EmERK, Lysate von axenisch kultivierten oder Co-kultivierten Metacystodenesvesikeln und Protoscolices in einem

12.5% PAA-gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mit den Erstantikörpern (1 µg/ml) und dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper  $\alpha$ -Kaninchen IgG (Jackson Immuno Research) wurde dann EmERK detektiert.

Die Immunhistochemie wurde von Dennis Tappe durchgeführt. Aus mit *E. multilocularis* infizierten Rennmäusen (*M. unguiculatus*) wurden die mit Echinokokken-Gewebe durchzogenen Lebern entfernt, in Einfriermedium (TissueTec; Sakura) gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Mit einem Kryotom wurden 5 µm starke Gefrierschnitte hergestellt, auf silikonisierte Objektträger, in Aceton für 10 min bei -20°C fixiert und dann an der Luft getrocknet. Die trockenen Proben wurden in PBS rehydriert und die endogenen Peroxidasen dann durch eine 20 minütige Inkubation in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in Methanol) inaktiviert. Nach einmaligem Waschen in PBS für 5 min wurden die Proben 1 Stunde bei RT in PBS mit 5% Ziegen Serum geblockt (Blockierungspuffer). Nach einem weiteren 5 minütigen Waschschrift in PBS wurden auf jeden Objektträger 200 µl des ersten Antikörpers ( $\alpha$ -P-ERK1/2, 1:500 in Blockierungspuffer) gegeben und alles bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 mal für je 5 min mit PBS gewaschen, die Proben dann mit dem zweiten Antikörper (Maus- $\alpha$ Kaninchen, Peroxidase konjugiert; Dianova) 1:200 in Blockierungspuffer für 30 min bei RT inkubiert, nach 3 weiteren 5 minütigen Waschschriften in PBS mit Diaminobenzidin-Reagenz (Serva) entwickelt und dann mit Hematoxilin gegengefärbt.

### 5.15.2 *emer*k-A (cDNA)

*emer*k-A cDNA Sequenz (1209 bp), Protein (361 AS, 42.2 kDa, ch -5,3)

Codierende Sequenz 1083 bp, Start ATG bei bp 71, Stop TGA bei bp 1153

S – T Kinase Domäne bp 134 – 1000 (AS 22 – 310)

fett markiert: *emer*k-A spezifischer C-Terminus

Introns: I1 nach bp 176 (37 bp), I2 nach bp 307 (34 bp), I3 nach bp 363 (28 bp), I4 nach bp 467 (31 bp), I5 nach bp 553 (424 bp), I6 nach bp 758 (579 bp), I7 nach bp 838 (2446 bp), I8 nach bp 917 (859 bp), I9 (*emer*k-A spezifisch, differentiell gespleißt, Spleißakzeptor AG: *emer*k chr DNA 6268) nach bp 1027 (808 bp), I10 nach bp 1143 (454 bp)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
CGCTGTTAACATTGTCATTC	CCTTGGACTAAGTAATCTTA	ATAAAGCTTGGCCATTCTAAT	TCAACCAATAATGAGTGGTG	ATATTCTGATCCATATACA							100
ATCAAGGGACAGGTGTTCCGA	CATTGGTCCCGTTTTACGA	ATCTTAATTACATTGGTGAA	GGCGCTTATGGAATGGTTAT	TTCTGCATTTGATCATCAGC							200
GCAATGAGAGGGTTGCCATT	AAGAGAATCACACCATTGA	GCACCAAACATATTGTCAAC	GTACCTATCGGGAGATTCTGA	ATCCTTAGTCGTTTAGACCA							300
CGAGAACATTATCCACTGT	ACGATGTTTTTACAACGTCA	AATTTTGAGGATATGAAGGA	AGTTTACATTGTGAAAAAT	ACATGGAACACTGATCTTTAC							400
AAGTTTTTAAAGTACAGCA	GTTGAGTCGGCAGCACACCT	GTTACTTCCTTTACCAAATG	CTTCGAGGCTTGAAATATAT	ACATTCCCGCAACGTTTTGC							500
ACCGTGATTTGAAGCCAAAGT	AATATACTTTTGAATCGAAT	GTGTGATTTGAGGATATGTG	ATTTTGGGCTCGCACGAAT	GCCGATCCCCAATGCGATCA							600
GGCTGGATTGCTGACTGAGT	ACGTGGCCACTCGCTGGTAC	CGTGCGCCAGAAATATGCT	CACATCGAAAGTCTACACCA	AAGCCATCGACCTCTGGTCC							700
ATCGGTTGCATCCTAGCCGA	GATGTATAGCAACCOCGTTT	TTTTTCCGGGGAACATTAT	ATTGACCAGTTGAAGATGAT	TCTTGAGGTTCTCGGTTCCG							800
CTCATCAAGAGGACATCAAC	TCCATAAGTAAACACAAAGGC	TAGAACGTACCTGGAGCAGT	TGCCAAAACGGAAAAAATA	CCCTGGCAGCAACTCTTCCC							900
ATTTGCAGACCCAAAGGGGT	TGGATCTGCTTGATCGTTTA	CTTTGTTCGCTCCCTCGCG	TCGAATAACGGTGAAGAAG	CACTTGCCCATCCTTACCTG							1000
GCACAATACTACGATCCATC	TGACGAGCCGACTTGCCCCC	<b>ATCCGTTTG</b> CACACGAAGCA	GACGATCTTCCAAGGAGCG	TCTTAAGGTTCTTGTTTGGG							1100
AAGAAATTCAGCATCTGAAG	GGGGATGAGCAGGCTGAGCC	TATAGATGCAGGTTGAAGT	GATCCCATGAAGTGTATCG	AATTCAAACGCTATCTTCAA							1200
TGATGAACG											

### 5.15.3 *emer*-B (cDNA)

*emer*-B cDNA Sequenz (1147 bp), Protein (325 AS, 38.1 kDa, ch -0,78)

Codierende Sequenz 978 bp, Start ATG bei bp 71, Stop TGA bei bp 1046

S – T Kinase Domäne bp 134 – 1000 (AS 22 – 310)

fett markiert: *emer*-B spezifischer C-Terminus

Introns: I1 nach bp 176 (37 bp), I2 nach bp 307 (34 bp), I3 nach bp 363 (28 bp), I4 nach bp 467 (31 bp), I5 nach bp 553 (424 bp), I6 nach bp 758 (579 bp), I7 nach bp 838 (2446 bp), I8 nach bp 917 (859 bp), I9 (*emer*-B spezifisch, differentiell gespleißt, Spleißakzeptor AG: *emer* chr DNA 5773) nach bp 1027 (313 bp)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
CGCTGTTAACATTGTCATTC	CCTTGGACTAAGTAATCTTA	ATAAACTTGGCCATTCTAAT	TCAACCAATAATGAGTGGTG	ATATTTCTGATCCATATACA	100						
ATCAAGGGACAGGTGTTCCGA	CATTGGTCCCGGTTTTACGA	ATCTTAATTACATTGGTGAA	GGCGCTTATGGAAATGGTTAT	TTCTGCATTTGATCATCAGC	200						
GCAATGAGAGGGTGGCCATT	AAGAGAATCACACCATTTGA	GCACCAAACATATTGTCAAC	GTACCTATCGGGAGATTTCGA	ATCCTTAGTCGTTTAGACCA	300						
CGAGAACATTATCCACTGT	ACGATGTTTTTACAACGTCA	AATTTTGAGGATATGAAGGA	AGTTTACATTGTGAAAAAAT	ACATGGAACTGATCTTTAC	400						
AAGTTTTTAAAGTACAGCA	GTTGAGTCGCGAGCACACCT	GTTACTTCCTTTACCAAATG	CTTCGAGGCTTGAATATAT	ACATTCCCGCAACGTTTTGC	500						
ACCGTGATTTGAAGCCAAGT	AATATACTTTTGAATCGAAT	GTGTGATTTGAGGATATGTG	ATTTTGGGCTCGCACGAATT	GCCGATCCCAATGCGATCA	600						
GGCTGGATTGCTGACTGAGT	ACGTGGCCACTCGCTGGTAC	CGTGGCCAGAAAATTATGCT	CACATCGAAAGTCTACACCA	AAGCCATCGACCTCTGGTCC	700						
ATCGGTTGCATCCTAGCCGA	GATGTATAGCAACCGCGTTC	TTTTTCCGGGAAACATTAT	ATTGACCAGTTGAAGATGAT	TCTTGAGGTTCTCGGTTCCG	800						
CTCATCAAGAGGACATCAAC	TCCATAAGTAACACAAAGGC	TAGAACGTACCTGGAGCAGT	TGCCAAAACGGAAAAAATA	CCCTGGCAGCAACTCTTCCC	900						
ATTTGCAGACCCAAAGGGT	TGGATCTGCTTGATCGTTTA	CTTTGTTTCGCTCCCTCGCG	TCGAATAACGGTGAAGAAG	CACTTGCCCATCCTTACCTG	1000						
GCACAATACTACGATCCATC	TGACGAGTCTACCCCTAAGG	TGCTATGAGAGATGCCAAC	GCCGACAATTGTTGTACTTT	CATTATAATACGTTCTTAAA	1100						
CCTTACAAAAATAACTGCAG	CAAGTGTAAACCATTTTCTGT	GAACCTTG									

### 5.15.4 *emer*-C (cDNA)

*emer*-C cDNA Sequenz (1135 bp), Protein (325 AS, 38.1 kDa)

Codierende Sequenz 978 bp, Start ATG bei bp 71, Stop TAG bei bp 1046

S – T Kinase Domäne bp 134 – 1000 (AS 22 – 310)

fett markiert: *emer*-C spezifischer C-Terminus

Introns: I1 nach bp 176 (37 bp), I2 nach bp 307 (34 bp), I3 nach bp 363 (28 bp), I4 nach bp 467 (31 bp), I5 nach bp 553 (424 bp), I6 nach bp 758 (579 bp), I7 nach bp 838 (2446 bp), I8 nach bp 917 (859 bp), I9 (*emer*-C spezifisch, differentiell gespleißt, Spleißakzeptor AG: *emer* chr DNA 6051) nach bp 1027 (590 bp)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
CGCTGTTAACATTGTCATTC	CCTTGGACTAAGTAATCTTA	ATAAACTTGGCCATTCTAAT	TCAACCAATAATGAGTGGTG	ATATTTCTGATCCATATACA	100						
ATCAAGGGACAGGTGTTCCGA	CATTGGTCCCGGTTTTACGA	ATCTTAATTACATTGGTGAA	GGCGCTTATGGAAATGGTTAT	TTCTGCATTTGATCATCAGC	200						
GCAATGAGAGGGTGGCCATT	AAGAGAATCACACCATTTGA	GCACCAAACATATTGTCAAC	GTACCTATCGGGAGATTTCGA	ATCCTTAGTCGTTTAGACCA	300						
CGAGAACATTATCCACTGT	ACGATGTTTTTACAACGTCA	AATTTTGAGGATATGAAGGA	AGTTTACATTGTGAAAAAAT	ACATGGAACTGATCTTTAC	400						
AAGTTTTTAAAGTACAGCA	GTTGAGTCGCGAGCACACCT	GTTACTTCCTTTACCAAATG	CTTCGAGGCTTGAATATAT	ACATTCCCGCAACGTTTTGC	500						
ACCGTGATTTGAAGCCAAGT	AATATACTTTTGAATCGAAT	GTGTGATTTGAGGATATGTG	ATTTTGGGCTCGCACGAATT	GCCGATCCCAATGCGATCA	600						
GGCTGGATTGCTGACTGAGT	ACGTGGCCACTCGCTGGTAC	CGTGGCCAGAAAATTATGCT	CACATCGAAAGTCTACACCA	AAGCCATCGACCTCTGGTCC	700						
ATCGGTTGCATCCTAGCCGA	GATGTATAGCAACCGCGTTC	TTTTTCCGGGAAACATTAT	ATTGACCAGTTGAAGATGAT	TCTTGAGGTTCTCGGTTCCG	800						
CTCATCAAGAGGACATCAAC	TCCATAAGTAACACAAAGGC	TAGAACGTACCTGGAGCAGT	TGCCAAAACGGAAAAAATA	CCCTGGCAGCAACTCTTCCC	900						
ATTTGCAGACCCAAAGGGT	TGGATCTGCTTGATCGTTTA	CTTTGTTTCGCTCCCTCGCG	TCGAATAACGGTGAAGAAG	CACTTGCCCATCCTTACCTG	1000						
GCACAATACTACGATCCATC	TGACGAGTCTACCCCTAAGG	GAGTATAGCTTTTCAGCAA	TTGATTACTTTTCCCGCCC	ACGGTGTCCGCGTTGACTA	1100						
TGCTTGATTGTGTAATAA	CAATCTTTGCTGTG										

### 5.15.5 EmERK-A/B/C (Proteinsequenzen)

Unterschiedliche C – Termini sind fett markiert.

#### EmERK-A:

361 AS, 42.2 kDa, ch -5,3, pl 6.02

```

      10      20      30      40      50
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
MSGDISDPYT IKGQVFDIGP RFTNLNYIGE GAYGMVISAF DHQRNERVAI
KRITPFEHQT YCQRTYREIR ILSRLDHENI IPLYDVFTTS NFEDMKEVYI 100
VEKYMETDLY KFLKVQQLSR EHTCYFLYQM LRGLKYIHSA NVLHRDLKPS
NILLNRMCDL RICDFGLARI ADPQCDQAGL LTEYVATRKY RAPEIMLTSK 200
VYTKAIDLWS IGCILAEMYS NRVLFPKHY IDQLKMILEV LGSPHQEDIN
SISNTKARTY LEQLPKRKKI PWQQLFPFAD PKGLDLLDRL LCFAPSRIT 300
VEEALAHPYL AQYYDPSDEP TCPHPAHEA DDLPKERLKV LVWEEIQHLK
GDEQAEPIDA G 400
  
```

#### EmERK-B:

325 AS, 38.01 kDa, ch -0,78, pl 6.81

```

      10      20      30      40      50
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
MSGDISDPYT IKGQVFDIGP RFTNLNYIGE GAYGMVISAF DHQRNERVAI
KRITPFEHQT YCQRTYREIR ILSRLDHENI IPLYDVFTTS NFEDMKEVYI 100
VEKYMETDLY KFLKVQQLSR EHTCYFLYQM LRGLKYIHSA NVLHRDLKPS
NILLNRMCDL RICDFGLARI ADPQCDQAGL LTEYVATRKY RAPEIMLTSK 200
VYTKAIDLWS IGCILAEMYS NRVLFPKHY IDQLKMILEV LGSPHQEDIN
SISNTKARTY LEQLPKRKKI PWQQLFPFAD PKGLDLLDRL LCFAPSRIT 300
VEEALAHPYL AQYYDPSDED FSIVV
  
```

#### EmERK-C:

325 AS, 37.98 kDa, ch + 0.22, pl 7.06

```

      10      20      30      40      50
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
MSGDISDPYT IKGQVFDIGP RFTNLNYIGE GAYGMVISAF DHQRNERVAI
KRITPFEHQT YCQRTYREIR ILSRLDHENI IPLYDVFTTS NFEDMKEVYI 100
VEKYMETDLY KFLKVQQLSR EHTCYFLYQM LRGLKYIHSA NVLHRDLKPS
NILLNRMCDL RICDFGLARI ADPQCDQAGL LTEYVATRKY RAPEIMLTSK 200
VYTKAIDLWS IGCILAEMYS NRVLFPKHY IDQLKMILEV LGSPHQEDIN
SISNTKARTY LEQLPKRKKI PWQQLFPFAD PKGLDLLDRL LCFAPSRIT 300
VEEALAHPYL AQYYDPSDES TPLGV
  
```

### 5.15.6 *emer*k-A/B/C (chromosomaler Locus)

Chromosomaler Locus: 6996 bp

Start ATG: bp 67, Stop TGA (*emer*k-A): 6850, Stop TGA (*emer*k-B): 5793, Stop TAG (*emer*k-C): 6071

Exons sind fett hervorgehoben: E1 (176 bp, 1 - 176), E2 (127 bp, 214 - 340), E3 (56 bp, 375 - 430), E4 (104 bp, 459 - 562), E5 (86 bp, 594 - 679), E6 (205 bp, 1104 - 1308), E7 (80 bp, 1888 - 1967), E8 (79 bp, 4414 - 4492), E9 (110 bp, 5352 - 5461), E10 (*emer*k-A spez., 116 bp, 6270 - 6385), E11 (*emer*k-A spez., 156 bp, 6840 - 6996), E10 (*emer*k-B spez., 611 bp, ab 5775 - 6385) nur die codierende Sequenz ist fett und unterstrichen hervorgehoben, E10 (*emer*k-C spez., 333 bp, ab 6053 - 6385) nur die codierende Sequenz ist fett und grau unterlegt hervorgehoben.



5.15.7 *emer*-A (Map)

CGCTGTTAACATTGTCATTCCCTTGGACTAAGTAACTCTTAATAAACTTGGCCATTTCTAATTAACCAATAATGAGTGGTGATATTTCTGATCCATATACA  
 100  
 GCGACAATTGTAACAGTAAAGGGAACCTGATTCATTAGAAATTTGAACCGGTAAGATTAAGTTGGTATTACTCACCCTATAAAGACTAGGTATATGT

M S G D I S D P Y T  
10

ATCAAGGACAGGTGTTTCGACATTGGTCCGCGTTTTACGAATCTTAATACATTGGTGAAGCGCTTATGGAATGGTATTCTGCAATTTGATCATCAGC  
 200  
 TAGTTCCTGTCCACAAGCTGTAACCCAGGCGAAAATGCTTAGAATTAATGTAACCACTTCCGGAATACCTTACCAATAAAGACGTAACCTAGTAGTCG

I K G Q V F D I G P R F T N L N Y I G E G A Y G M V I S A F D H Q  
43

GCAATGAGAGGGTTGCCATTAAGAGAATCACACCATTTGAGCACCACAAACATATTTGTCAACGTACCTATCGGGAGATTGGAATCCTTAGTCGTTTTAGACCA  
 300  
 CGTTACTCTCCCAACGGTAATTCTCTTAGTGTGGTAACTCGTGGTTTGTATAACAGTTCATGGATAGCCCTTAAGCTTAGGAATCAGCAAACTGTGT

R N E R V A I K R I T P F E H Q T Y C Q R T Y R E I R I L S R L D H  
77

CGAGAACATTATCCACTGTACGATGTTTTTACAACGTCAAATTTTGGAGATATGAAGGAAGTTTACATTGTGGAAAAATACATGGAACCTGATCTTTAC  
 400  
 GCTCTTGTAATAAGGTGACATGCTACAAAAATGTTGCAGTTTAAACTCTTACTTCTTCAAATGTAACACCTTTTTATGTACTTTGACTAGAAATG

E N I I P L Y D V F T T S N F E D M K E V Y I V E K Y M E T D L Y  
110

AAGTTTTTAAAGTACAGCAGTTGAGTCGCGAGCACACCTGTTACTTCCCTTTACCAAAATGCTTCGAGGCTTGAAATATATACATTTCCGCGAACGGTTTTGC  
 500  
 TTCAAAATTTTTCATGTCGTCACCTCAGCGTCGTGTGGACAATGAAGGAAATGGTTTACGAAGCTCCGAACCTTTATATATGTAAGCGCTTGCAAAACG

K F L K V Q Q L S R E H T C Y F L Y Q M L R G L K Y I H S A N V L  
143

ACCGTGATTTGAGCCAAAGTAAATATACTTTTTGAATCGAATGTGTGATTTGAGGATATGTGATTTTGGGCTCGCACGAATGCGCATCCCCAATGCGATCA  
 600  
 TGGCACTAAAATTCGGTTTATTATGAAAATAGCTTACACACTAACTCCTATACACTAAAACCCGAGCGTCTTAACGGCTAGGGTTACGCTAGT

H R D L K P S N I L L N R M C D L R I C D F G L A R I A D P Q C D Q  
177

GGCTGGATTGCTGACTGAGTACGTGGCCACTCGCTGGTACCCTGCGCCAGAAAATTATGTCTACATCGAAAGTCTACACCAAGCCATCGACCTCTGGTCC  
 700  
 CCGACCTAACGACTGACTCATGCCCGTGGAGCACATGGCACGCGGTCTTAATACAGTGTAGCTTTCAGATGTTGGTTCGGTAGCTGGAGACCAGG

A G L L T E Y V A T R W Y R A P E I M L T S K V Y T K A I D L W S  
210

ATCGGTTGCATCTAGCCGAGATGATAGCAACCCGCTTCTTTTTCCGGGGAACATTATATTGACCAGTTGAAGATGATTCTTGGAGTTCTCGGTTCCG  
 800  
 TAGCCAACGTAGGATCGGCTCTACATATCGTTGGCGCAAGAAAAGGCCCTTTGTAATATACTGGTCAACTTCTACTAAGAATCCAAAGCAAGCG

I G C I L A E M Y S N R V L F P G K H Y I D Q L K M I L E V L G S  
243

CTCATCAAGAGGACATCAACTCCATAAGTAACACAAAGGCTAGAACGTACCTGGAGCAGTTGCCAAAACGGAATAAATACCCTGGCAGCAACTCTTCCC  
 900  
 GAGTAGTCTCCTGTAGTTGAGGTATTCATTGTGTTCGGATCTTGCATGGACCTCGTCAACGGTTTGCCTTTTTTTATGGGACCGTCTGAGAAGGG

P H Q E D I N S I S N T K A R T Y L E Q L P K R K K I P W Q Q L F P  
277

ATTTGCAGACCCAAAGGGGTTGGATCTGCTTGATCGTTTACTTTGTTCGCTCCCTCGCGTGAATAACGGTGGAGAAGCACTTGCCCATCTTACCTG  
 1000  
 TAAACGTCTGGGTTTCCCACCTAGACGAAGTAAAGCAAAGCGAGGAGCGCAGCTTATTGCCACCTTCTTCGTGAACGGTGGAGTAAAGGAC

F A D P K G L D L L D R L L C F A P S R R I T V E E A L A H P Y L  
310

GCACAATACTACGATCCATCTGACGAGCCGACTTGCSSCCATCCGTTTGCACACGAAGCAGACGATCTTCCAAAGGAGCGTCTTAAAGTCTTGTGTTGGG  
 1100  
 CGTGTATGATGCTAGGTAGACTGCTCGGCTGAACGGGGTAGGCAAACGTGTGCTTCCGCTGCTAGAAAGTTTCTCGCAGAAATCCAAAGCAAAACCC

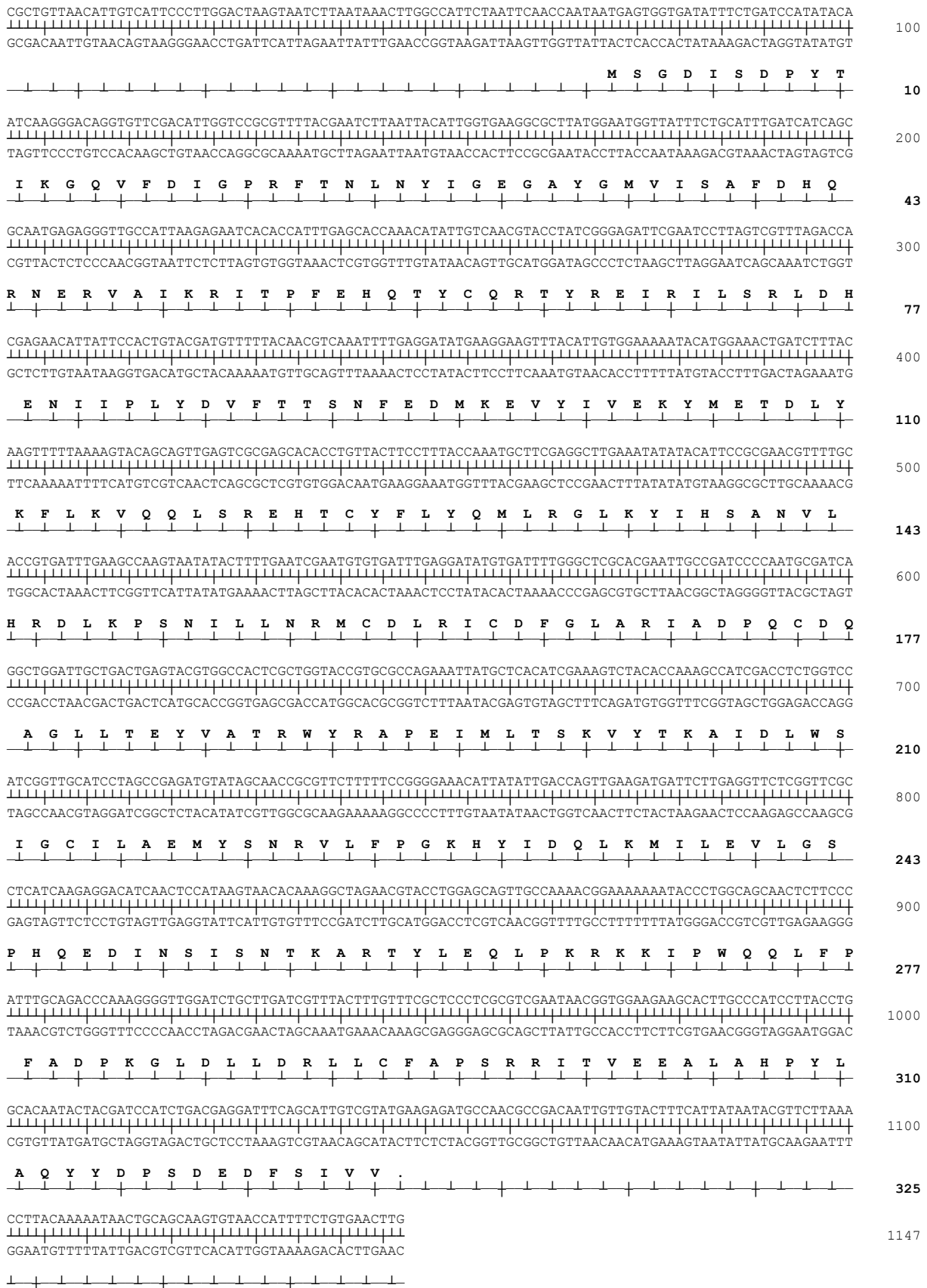
A Q Y Y D P S D E P T C P H P F A H E A D D L P K E R L K V L V W  
343

AAGAAATTCAGCATCTGAAGGGGATGAGCAGGCTGAGCCTATAGATGAGGTTGAAAGTATCCCATGAAGTGAATGAATTCAAACGCTATCTTCAA  
 1200  
 TTCTTTAAGTCGTAGACTTCCCCCTACTCGTCCGACTCGGATATCTACGTCGAACCTTCTACTAGGGTACTTCACATTAGCTTAAAGTTGCGATAGAAGTT

E E I Q H L K G D E Q A E P I D A G .  
361

TGATGAACG  
 1209  
 ACTACTTGC

### 5.15.8 *emer-B* (Map)





### 5.15.9 *emer*-C (Map)

CGCTGTAAACATTGTCATTCSCCTTGGACTAAGTAATCTTAATAAACTTGGCCATTCTAATTCACCAATAATGAGTGGTGATATTTCTGATCCATATACA	100
GCGACAATTGTAACAGTAAGGGAACCTGATTCATTAGAATTATTTGAACCGGTAAGATTAAGTTGGTTATTACTCACCCTATAAAGACTAGGTATATGT	
	M S G D I S D P Y T
ATCAAGGGACAGGTGTTTCGACATTGGTCCGCGTTTACGAATCTTAATTACATTGGTGAAGCGCCTTATGGAATGGTATTTCTGCATTTGATCATCAGC	200
TAGTTCCCTGTCCACAAGCTGTAACAGGCGCAAATGCTTAGAATTAATGTAACCACCTCCGCGAATACCTTACCAATAAAGACGTAAACTAGTAGTCG	
I K G Q V F D I G P R F T N L N Y I G E G A Y G M V I S A F D H Q	43
GCAATGAGAGGGTTGCCATTAAGAGAATCACACCATTTGAGCACCAACATATTTGTCAACGTACCTATCGGGAGATTTCGAATCCTTAGTCGTTTAGACCA	300
CGTTACTCTCCCAACGGTAACTCTCTTAGTGTGGTAAACTCGTGGTTTGTATAACAGTTGCATGGATAGCCCTTAAGCTTAGGAATCAGCAAATCTGGT	
R N E R V A I K R I T P F E H Q T Y C Q R T Y R E I R I L S R L D H	77
CGAGAACATTATTCACCTGTACGATGTTTTTACAACGTCAAATTTTGAGGATATGAAGGAAGTTTACATTGTGGAAAAATACATGGAAACTGATCTTTAC	400
GCTCTTGTAATAAGGTGACATGCTACAAAAATGTTGCAGTTTAAAACFCCTATACTTCCTTCAAATGTAACACCTTTTATGACCTTTGACTAGAAATG	
E N I I P L Y D V F T T S N F E D M K E V Y I V E K Y M E T D L Y	110
AAGTTTTTAAAAGTACAGCAGTTGAGTCGCGAGCACACCTGTTACTTCCTTTACCAAATGCTTCGAGGCTTGAAATATATACATTCGCGAACGTTTTGC	500
TTCAAATAATTTTATGTCGCAACTCAGCGCTCGTGTGGACAATGAAGGAAATGGTTTACGAAGCTCCGAACCTTATATATGTAAGGCGCTTGCAAACG	
K F L K V Q Q L S R E H T C Y F L Y Q M L R G L K Y I H S A N V L	143
ACCGTGATTTGAAGCCAAGTAATATACTTTTGAATCGAATGTGTGATTTGAGGATATGTGATTTTGGGCTCGCACGAATTCGCGATCCCAATGCGATCA	600
TGGCACTAACTTCGGTTCATTATATGAAAACCTAGCTTACACACTAACTCCTATACACTAAAACCCGAGCGTGCTTAACGGCTAGGGTTACGCTAGT	
H R D L K P S N I L L N R M C D L R I C D F G L A R I A D P Q C D Q	177
GGCTGGATTGCTGACTGAGTACGTGGCCACTCGCTGGTACCGTGCGCCAGAAAATTATGCTCACATCGAAAAGTCTACACCAAAGCCATCGACCTCTGGTCC	700
CCGACCTAACGACTGACTCATGCACCGGTGAGCGACCATGGCACGCGGTCTTAAATACGAGTGTAGCTTTCAGATGTGGTTTCGGTAGCTGGAGACCAGG	
A G L L T E Y V A T R W Y R A P E I M L T S K V Y T K A I D L W S	210
ATCGGTTGCATCCTAGCCGAGATGTATAGCAACCGCGTCTTTTTTCCGGGAAACATATATTGACCAGTTGAAGATGATTCTTGAGGTTCTCGGTTCCG	800
TAGCCAACGTAGGATCGGCTCTACATATCGTTGGCGCAAGAAAAAGGCCCTTTGTAATATAACTGGTCAACTTCTACTAAGAACTCCAAGAGCCAAGCG	
I G C I L A E M Y S N R V L F P G K H Y I D Q L K M I L E V L G S	243
CTCATCAAGAGGACATCAACTCCATAAGTAACACAAAGGCTAGAACGTACCTGGAGCAGTTGCCAAAAACGAAAAAAATACCTGGCAGCAACTCTTCCC	900
GAGTAGTTCTCCTGTAGTTGAGGTATTTCATTTGTTCCGATCTTGCATGGACCTCGTCAACGGTTTTGCCTTTTTTATGGGACCGTCTTGAGAAGGG	
P H Q E D I N S I S N T K A R T Y L E Q L P K R K K I P W Q Q L F P	277
ATTTGCAGACCCAAAGGGGTTGGATCTGCTTGTATCGTTTACTTTTGTTCGCTCCCTCGCGTGAATAACGGTGGAGAAGCACTTGCCCATCCTTACCTG	1000
TAAACGCTCGGGTTTCCCAACCTAGACGAAGTACAAATGAAACAAAGCGAGGAGCGCAGCTTATTGCCACCTTCTTCGTGAACGGGTAGGAATGGAC	
F A D P K G L D L L D R L L C F A P S R R I T V E E A L A H P Y L	310
GCACAATACTACGATCCATCTGACGAGTCTACCCCTAAGGGAGTATAGCTTTTTCAGCAAATGATTACTTTTCCCGCCACGGTGTCCGCCGTTGACTA	1100
CGTGTATGATGCTAGGTAGACTGCTCAGATGGGATTCCTCATATCGAAAAGTGGTTAACTAATGAAAAGGGGCGGGTCCACAGCGGCAACTGAT	
A Q Y Y D P S D E S T P L G V .	325
TGCTTGATTTGTGTAATAACAATCTTTGCTGTG	1135
ACGAACATAACACATTTTATGTTTAGAAACGACAC	

### 5.15.10 *emer*-A/B/C (Oligonucleotide)

#### *emer*-A/B/C (Oligonucleotide)

Erk 3'	<i>emer</i> -A cDNA 1153-1134	ACCTGCATCTATAGGCTCAG
Erk 3' außen	<i>emer</i> -B cDNA *1081-1062	GAAAGTACAACAATTGTCGG
Erk 3' aussen+g	<i>emer</i> -A cDNA *1200-1179	GTTGAAGATAGCGTTTGAATTCG
Erk 3' stop	<i>emer</i> -A cDNA 1156-1134	TCAACCTGCATCTATAGGCTCAG
Erk 3' up 3B mod	<i>emer</i> -B cDNA *1045-1024	GACGACAATGCTGAAATCCTCG
Erk 3'B mod	<i>emer</i> -B cDNA *1045-1024	GACGACAATGCTGAAATCCTCG
Erk 3'B stop up	<i>emer</i> -B cDNA 1049-1028	TCATACGACAATGCTGAAATC
Erk 3'mod	<i>emer</i> -A cDNA *1153-1134	GCCTGCATCTATAGGCTCAG
Erk 5' cDNA	<i>emer</i> -A cDNA 5-26	GTTAACATTGTCATTCCCTTGG
Erk 5' dw	<i>emer</i> -A cDNA 71-94	ATGAGTGGTGATATTTCTGATCCA
Erk 5' mod	<i>emer</i> -A cDNA *71-94	GTGAGTGGTGATATTTCTGATCCA
Erk F5 3' außen	<i>emer</i> -B cDNA 1137-1118	GAAAATGGTTACACTTGCTG
Erk-3-up 3B	<i>emer</i> -B cDNA 1045-1034	TACGACAATGCTGAAATCCTCG
ERK-3'-up	<i>emer</i> -B cDNA 1045-1034	TACGACAATGCTGAAATCCTCG
Erk-3'C spezifisch	<i>emer</i> -C cDNA 1121-1098	GTATTTTACACAATACAAGCATAG
ERK-dw	<i>emer</i> -A cDNA 71-94	ATGAGTGGTGATATTTCTGATCCA
Erk-dw1	<i>emer</i> -A cDNA 257-280	CAACGTACCTATCGGGAGATTCGA
Erk-dw2	<i>emer</i> -A cDNA 421-441	GTTGAGTCGCGAGCACACCTG
Erk-dw3	<i>emer</i> -A cDNA 828-847	GTAACACAAAGGCTAGAACG
Erk-dw6	<i>emer</i> -A cDNA 843-862	GAACGTACCTGGAGCAGTTG
Erk-dw7 mod	<i>emer</i> -A cDNA *1002-1022	GACAATACTACGATCCATCTG
Erk-int dw1	<i>emer</i> -A cDNA 199-216	GCGCAATGAGAGGGTTGC
Erk-int dw2	<i>emer</i> -A cDNA 567-584	GGCTCGCACGAATTGCCG
Erk-int dw3	<i>emer</i> -A cDNA 775-795	GATGATTCTTGAGGTTCTCGG
Erk-int dw4	<i>emer</i> -A cDNA 1045-1064	GTTTGCACACGAAGCAGACG
Erk-int up1	<i>emer</i> -A cDNA 264-244	GTACGTTGACAATATGTTTGG
Erk-int up2	<i>emer</i> -A cDNA 1082-1063	GACGCTCCTTTGGAAGATCG
Erk-int up3	<i>emer</i> -A cDNA 834-814	GTGTTACTTATGGAGTTGATG
Erk-seq up1	<i>emer</i> -A cDNA 969-951	GTTATTCGACGCGAGGGAG
ERK-up	<i>emer</i> -A cDNA 264-244	GTACGTTGACAATATGTTTGG
Erk-up1	<i>emer</i> -A cDNA 634-613	GCGAGTGGCCACGTACTION
Erk-up10 +5'g	<i>emer</i> -A cDNA *1087-1070	GCCTTAAGACGCTCCTTTGG
Erk-up2	<i>emer</i> -A cDNA 912-893	GGGTCTGCAAATGGGAAGAG

#### *emer*-A/B/C Oligonucleotide (Schnittstellen)

Erk 3'B Bam	<i>emer</i> -B cDNA *1048-1024	GTTGGCGGATCCTCATAACGACAATGCTGAAATCCTCG
Erk 3B Bam up2	<i>emer</i> -B cDNA *1048-1024	GTTGGCGGATCCTCATAACGACAATGCTGAAATCCTCG
Erk 5' Bam-Hum	<i>emer</i> -A cDNA *71-94	GTAGTAGGATCCAAAAAATGAGTGGTGATATTTCTGATC- CA
Erk 5' Eco SK	<i>emer</i> -A cDNA *71-94	GATTCAGAATTCAATGAGTGGTGATATTTCTGATCCA
Erk Bam up	<i>emer</i> -A cDNA *1156-1139	GTGGGAGGATCCTCAACCTGCATCTATAGG
Erk Bam up1	<i>emer</i> -A cDNA *1156-1134	GTGGGAGGATCCTCAACCTGCATCTATAGGCTCAG

*emer*-A/B/C Oligonucleotide (Schnittstellen)

Erk Eco dw	<i>emer</i> -A cDNA *71-88	GTTCAAGAATTCATGAGTGGTGATATTTCT
Erk Eco dw2	<i>emer</i> -A cDNA *71-94	GTTCAAGAATTCATGAGTGGTGATATTTCTGATCCA
Erk-3'A Eco SK B	<i>emer</i> -B cDNA *1048-1024	GTTGGCGAATTCTCATACGACAATGCTGAAATCCTCG
Erk-3'B Eco SK A	<i>emer</i> -A cDNA *1156-1134	GTGGGAGAATTCTCAACCTGCATCTATAGGCTCAG

*emer*-A/B/C Oligonucleotide (chromosomaler Locus)

Erk chr locus dw	<i>emer</i> chrDNA 2517-2534	CATGATGAGAATGAGAAG
Erk chr locus up	<i>emer</i> chrDNA 5322-5303	ATCTTAGCCAATAGATACCG
Erk dw8 (im Intron)	<i>emer</i> chrDNA 5720-5740	GTAATAGACTGCTTAACTTGT
Erk F5 seq dw 1	<i>emer</i> chrDNA 2448-2466	GAAGGCGGTGCTAATTGTG
Erk F5 seq up1	<i>emer</i> chrDNA 5403-5385	GTTATTCGACGCGAGGGAG
Erk In 6 dw	<i>emer</i> chrDNA 4294-4313	ATTGCATGAGATGGTCTAGG
Erk In 6 up	<i>emer</i> chrDNA 3907-3891	ATCGAACAGTATTTTCAG

*emer*-A/B/C degenerierte Oligonucleotide

MAP-C1	<i>emer</i> -A cDNA 655-635 Prot. WYRAPEI	GAAGGCTTGARRTCXCKRTG
MAP-C2	<i>emer</i> -A cDNA 655-635 Prot. WYRAPEI	AGGATACAXCCXACXGACCA
MAP-C3	<i>emer</i> -A cDNA nicht vorhanden Prot. KMLTFNP (cDNA 940)	AGGATRCAXCCXACRCTCCA
MAP-N1	<i>emer</i> -A cDNA 155-175 Prot. GEGAYGM	ATCGGTGARGGXGCXTAYGG
MAP-N2	<i>emer</i> -A cDNA 548-568 Prot. LKICDFG	AGGGATCTXAARCCXAGYAA
MAP-N3	<i>emer</i> -A cDNA 239-259 Prot. EHQTYCQ	AGGGATCTRAARCCXTCXAA

## 5.16 EmMkK–A/B

### 5.16.1 EmMkK: Material und Methoden

Sämtliche molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden finden sich in den Kapiteln 5.1 - 5.13. Die verwendeten Organismen und deren Kultivierung ist in den Kapiteln 5.6 - 5.12 beschrieben. Für Computeranalysen wurden die Programme und Methoden aus Kapitel 5.1 verwendet.

#### Klonierung der *emmkk* cDNA und des chromosomalen Locus:

Die *emmkk*-cDNA wurde während eines Sequenzierungsprojektes aus einer Plasmid-cDNA-Bank (hergestellt von K. Huber [158]) isoliert und sequenziert. Das vollständige Leseraseter erhält man mit der Primerkombination MKK-5'-ATG (5'-ATGTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG-3', *emmkk* cDNA: 50-73) und MKK-3' (5'-TTGGTGATCAAGAATGGAAGAG-3', *emmkk* cDNA: 1077-1056).

Der chromosomale Locus von *emmkk* wurde, in drei überlappenden Fragmenten über PCR aus chromosomaler *E. multilocularis*-DNA amplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und abschließend sequenziert. Die drei Fragmente wurden mit den folgenden Primerkombinationen amplifiziert. **F1:** Mkk-dw5 (5'-GTAATATCGAGTTCTGGCTGTG-3', *emmkk* cDNA: 15-36) × Mkk-up3 (5'-GAGTCATCCATCAGTTCCATG-3', *emmkk* cDNA: 467-447), **F2:** Mkk-dw4 (5'-GCATTCTTAACGACTGGAATG-3', *emmkk* cDNA: 347-367) × Mkk-up4 (5'-GTCAATGAGGATGTTGGAG-3', *emmkk* cDNA: 627-609), **F3:** Mkk-dw2 (5'-CCTGCGAAAGGATCTTGTG-3', *emmkk* cDNA: 577-595) × Mkk-3'mod (5'-GTGGTGATCAAGAATGGAAGAG-3', *emmkk* cDNA: \*1077-1056).

#### Southernblot

Für den Southern-Blot wurde chromosomale *E. multilocularis*-DNA aus *in vivo* gewachsenem Parasitengewebe (DNA-Isolation: 5.1.4, Parasitenmaterial: 5.9.3) verwendet. Jeweils 20 µg der chromosomalen DNA wurden für jeden Restriktionsverdau (BamHI, BglII, EcoRI, Hind III, PstI, Pvu II, XmnI) eingesetzt (Restriktionsverdau: 5.4.14). Die Auftrennung der DNA-Fragmente, der Transfer auf die Nylon-Membran, die Herstellung und Aufbereitung der Sonden, die Hybridisierung und die verschiedenen Waschschriffe wurden wie unter 5.4.17 beschrieben durchgeführt. Die Sonden für die Hybridisierung wurden über PCR (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 1') aus chromosomaler Echinokokken-DNA mit den Primern Mkk-5 (5'-GTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG-3', *emmkk* cDNA: 52-73) × Mkk-I1(4)up (5'-GCCATCGTATAATTGTGCG-3', *emmkk* chrDNA: 698-680) für den N-Terminus und den Primern Mkk-I3(1) dw (5'-GTTGGTGCGTGTATTGGTGTTAG-3', *emmkk* chrDNA: 6825-6846) × Mkk-I4(2)up (5'-GTAAGAAGCATGACAATTAGTAGG-3', *emmkk* chrDNA: 7467-7444) für das Exon 4, das einen Teil der EmMkk-Kinasedomäne codiert, amplifiziert.

#### Echinokokkenspezifischer Nachweis

Für den Nachweis das *emmkk* ein Echinokokkenfaktor ist, wurde aus *in vitro* kultivierten Metacystodensvesikeln (vergl. 5.10.1) und der Leber eines uninfizierten Gerbils (*M. unguiculatus*) mit dem DNeasy Kit (Qiagen) chromosomale DNA isoliert. Mit jeweils 1 µl (1:100 verdünnt) dieser DNAs als Template wurden PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") durchgeführt, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Echinokokken-spezifischen Primer für *emmkk* waren Mkk-5'mod (5'-GTGTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG-3', *emmkk* cDNA: \*50-73) × MkkI1(4)-up (5'-GCCATCGTATAATTGTGCG-3', *emmkk* chrDNA: 698-680), die ein PCR-Produkt von ~ 700 bp ergaben. Für die Gerbil-spezifische PCR wurden die Primer Tub12up (5'-CCCCAAGTGTATGATACTGG-3') und Tub12ST (5'-CTGGGCAGTGCGG-

CAACCA-3') eingesetzt, die im Gen für  $\beta$ -Tubulin [46] von *M. unguiculatus* binden und ein Produkt von ~ 1.1 kbp ergaben.

### RT-PCR: Expression in Zyste und Protoscolex

Um die Expression von *emmkk-A/B* während einer Infektion des Zwischenwirts (*M. unguiculatus*) und in den verschiedenen Larvenstadien zu untersuchen, wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) die Gesamt-RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (vergl. 5.10.1), *in vivo* kultiviertem Gesamtlarvenmaterial (vergl. 5.9.4), *in vivo* kultivierten Protoscolices (vergl. 5.9.6) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten (vergl. 5.9.6) Protoscolices isoliert und mit dem SMART II cDNA Synthesis Kit (BD-Biosciences) in cDNA umgeschrieben. Jeweils 1  $\mu$ l dieser cDNAs wurde dann für die PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 1') eingesetzt. Der gemeinsame Nachweis (Größe: ~ 470 bp) von *emmkk-A* und *emmkk-B* erfolgte über eine Amplifikation mit den Primern Mkk-5' mod (5'-GTGTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG-3', *emmkk* cDNA: \*50-73) und Mkk-up3 (5'-GAGTCATCCATCAGTTCCATG-3', *emmkk* cDNA: 467-447). Der Nachweis der beiden Spleißformen erfolgte mit der Primerkombination Mkk-dw4 (5'-GCATTCTTAAC-GACTGGAATG-3', *emmkk* cDNA: 347-367) und Mkk-3'mod (5'-GTGGTGATCAAGAATG-GAAGAG-3', *emmkk* cDNA: \*1077-1056) die für *emmkk-A* ein Produkt von ~ 500 bp und für *emmkk-B* eines von ~ 270 bp ergaben. Die PCR-Produkte wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### 5.16.2 *emmkk-B* (cDNA)

*emmkk-B* cDNA Sequenz 1091 bp), Protein (264 AS, 29.8 kDa, ch -1.24, pl 6.61)

Codierende Sequenz 1014 bp, Start ATG bei bp 64, Stop TGA bei bp 853

S – T Kinase Domäne bp 224 – 829 (AS 53 – 260)

Introns: I1 nach bp 227 (2705 bp), I2 nach bp 475 (2525 bp), I3\* (*emmkk-B* spezifisch, bestehend aus I3, E4 und I4) nach bp 631 (4861 bp)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100														
GTTTGC	TTGTTG	TGTAATA	TCGAGT	TCTGGC	TGTGCCTC	CGCATT	TATTTT	CCTCACTC	TGGATG	TCAGCCG	TTCGTAG	GCCATT	TGCGC	TGAATCTTG	100									
GCGAA	ACTCGT	CGCATT	CCT	GGTGT	TATATT	GCCGGT	TGA	AATTGG	ACCTAG	CACTCAGC	TCAGCA	ATCGT	ACTGAT	GTC	ATTATTA	ACGGTC	GAAAAGT	200						
CACA	ATAGAT	GCAAG	A	GATT	TGGAGG	TGAA	AAGA	AATTA	GGTCG	AGGAGA	AATATG	CGCG	GGTCCA	TCCG	ATGT	TACCACG	CACC	GAGCA	AGTGT	GAATTT	300			
GCGG	TAAAG	AGACT	GCCATT	TGAAG	TAGAG	ACCT	CGGATC	GCTC	ACG	ATTCT	TAAAC	GAC	TGGA	ATGT	GAG	CATG	CGCAC	CAG	CAC	CTGCC	TACG	CCG	400	
TCCT	CTCCT	ACGG	CGCC	TT	TCCGT	CGCT	GCGA	TTTG	GGTGG	T	CACTG	ATGG	ATG	ACT	CCCT	AGATA	AAATTT	CTC	AAA	AGG	TTAC	G	500	
AGGA	AAAA	AAT	TCC	GG	A	ATCTT	C	TAG	C	TAC	TTG	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	600
GTC	AAG	CC	TCCA	AC	AT	CCT	CATT	G	AC	CG	CG	CG	CG	CG	C	C	C	C	C	C	C	C	C	700
TT	CG	A	CA	T	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	800
AC	GG	A	T	G	C	AT	G	C	AT	T	T	C	AT	G	C	AT	T	T	C	AT	G	C	AT	900
TT	CT	CC	CC	CT	TT	CT	CT	C	T	C	C	AT	T	C	C	AT	T	C	C	AT	T	C	C	1000
TTT	CT	CT	TCC	TG	TCC	GAAG	TCA	AAA	AC	CT	AC	CT	TGT	CAG	T	T	A	A	A	A	A	A	A	1100

### 5.16.3 EmMKK-B (Proteinsequenz)

264 AS, 29.8 kDa, ch -1.24, pl 6.61

	10	20	30	40	50	
MSAV	RRPLPL	NLGET	RRIPG	VILP	VEIGPS	TQLSN
RDLE	VKEELG	RGEY	ARVHRM	YHAP	SKCEFA	VKRLP
NVSM	RSTTCP	YAVLS	YGALS	VGCE	FWVME	LMDDS
PENL	LAYVAF	CVVTA	LEYLR	KDLV	TMHRDV	KPSNI
PNV	PESVPYS	QDFR	DIVSQC	LVKE	ESARAN	YLRL
LMAQ	FVSSIL	DHQ				
						100
						200
						300

### 5.16.4 *emmkk-A* (cDNA)

*emmkk-A* cDNA Sequenz (1316 bp), Protein (339 AS, 38.0 kDa, ch -1.96, pl 6.54)

Codierende Sequenz 1014 bp, Start ATG bei bp 64, Stop TGA bei bp 1078

S – T Kinase Domäne bp 224 - 994 (AS 53 - 315)

Introns: I1 nach bp 227 (2705 bp), I2 nach bp 475 (2525 bp), I3 nach bp 631 (1011 bp), I4 nach bp 856 (3626 bp)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
GTTTGC	TTGT	GTTG	TGTA	ATA	TCGAGT	TCTGG	CTGTG	CCCTC	CGCATT	TATTTT	CCTCACTC	100	
GCGAA	ACTCG	TCCG	CATTC	CT	GGTGT	TATAT	TGCC	GGTGA	AATTGG	ACCTAG	CACCTCAGC	200	
CACA	ATAG	ATGCA	AGAG	ATT	TGGAGG	TGAA	GAAGA	ATTA	GGTCG	AGGAGA	ATATGCGCG	300	
GCGGT	AAAG	AGACT	GCCATT		TGAAGT	AGAG	ACCTCG	GATC	GCTCAC	GCATTT	CTTAACGCAC	400	
TCCT	CTCT	ACGG	CGCC	CTT	TCCGTC	GGCTG	CGAG	TTTG	GGTGGT	CATGGA	ACTGATGG	500	
AGGA	AAAA	ATAAT	CCCG	GAGA	ATCTTC	TAGCT	ACGTT	GCT	TTTTGT	GTAGT	CACCTGCCT	600	
GTCA	AGCC	CTCA	ACAT	CTCT	CATTG	ACCG	CGCC	GGGC	AGC	TAAAGG	TTTTCG	ACTACGGC	700
CGGG	CACCT	GTCG	TATAT	G	GCGCC	GAGCG	TATG	ATCC	CAGTC	GAGCG	CCGGTGGT	G	800
GCTT	CTTGA	ACTGG	CTACT	G	GTAAC	ACCC	CTAC	GAAAGC	TTCGT	CAATC	AGTTGA	ACT	900
GAAT	CGGT	GCC	TACT	CGCA	AGACT	TTG	AGAC	ATTTGT	G	CGAGT	GCTAGT	GAAAGG	1000
CCTT	CCTT	CGC	AGTGT	CTGC	GTGGA	ACG	GATGC	ACCC	CT	CATGG	CCCAAT	TTGTCTCT	1100
CCCT	CAAGG	CAC	CACTT		GTCT	CTT	CTCC	CTTT	CT	CTCT	CCCC	ATTTCT	1200
CCTT	AGCG	CTTT	TTAAAA		TACCTT	TCCT	GTCT	CTCTG		GTCCG	AAGTCA	AAACCTAC	1300
AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA									

### 5.16.5 EmMKK-A (Proteinsequenz)

339 AS, 38.0 kDa, ch -1.96, pl 6.54

	10	20	30	40	50			
MSAVRR	RPLPL	NLGETR	RIPG	VILPVE	IGPS	TQLSNRTDVI	INGQKVTIDA	
RDLEV	KEELG	RGEYAR	VHRM	YHAPSK	CEFA	VKRLPFEVET	SDRSRILNDW	100
NVSMRT	STTCP	YAVLSY	GALS	VGCEFW	VVME	LMDDSLDKFL	QKVYAQGKII	
PENLLAY	VAF	CVVTALE	YLR	KDLVTM	MHRDV	KPSNILIDRA	GHVKVCDYGV	200
SGELKNS	MAQ	SNTGT	CRYMA	PERIDP	SRSA	GGGFRIQADV	WSLGLTLLEL	
ATGKHP	YESF	VNQFEL	LKHV	VHEAPP	NVPE	SVPYSQDFRD	IVSQCLVKEE	300
SARANYL	RLL	DSPFLR	SVCV	ERDAPL	MAQF	VSSILDHQ		

### 5.16.6 *emmkk-A/B* (chromosomaler Locus)

Chromosomaler Locus: 11135 bp

Start ATG: bp 50, Stop TGA: 10931

Exons sind fett hervorgehoben: E1 (227 bp, 1 - 227), E2 (248 bp, 2933 - 3180), E3 (156 bp, 5706 - 5861), E4 unterstrichen markiert, wird bei *emmkk-B* gemeinsam mit I3 und I4 herausgespleißt (225 bp, 6873 - 7097), E 5 (411 bp, 10724 - 11135)

Introns: I1 (2705 bp, 228 - 2932), I2 (2525 bp, 3181 - 5705), I3 *emmkk-A* spezifisch (1011 bp, 5862 - 6872), I4 *emmkk-A* spezifisch (3626 bp, 7098 - 10723)

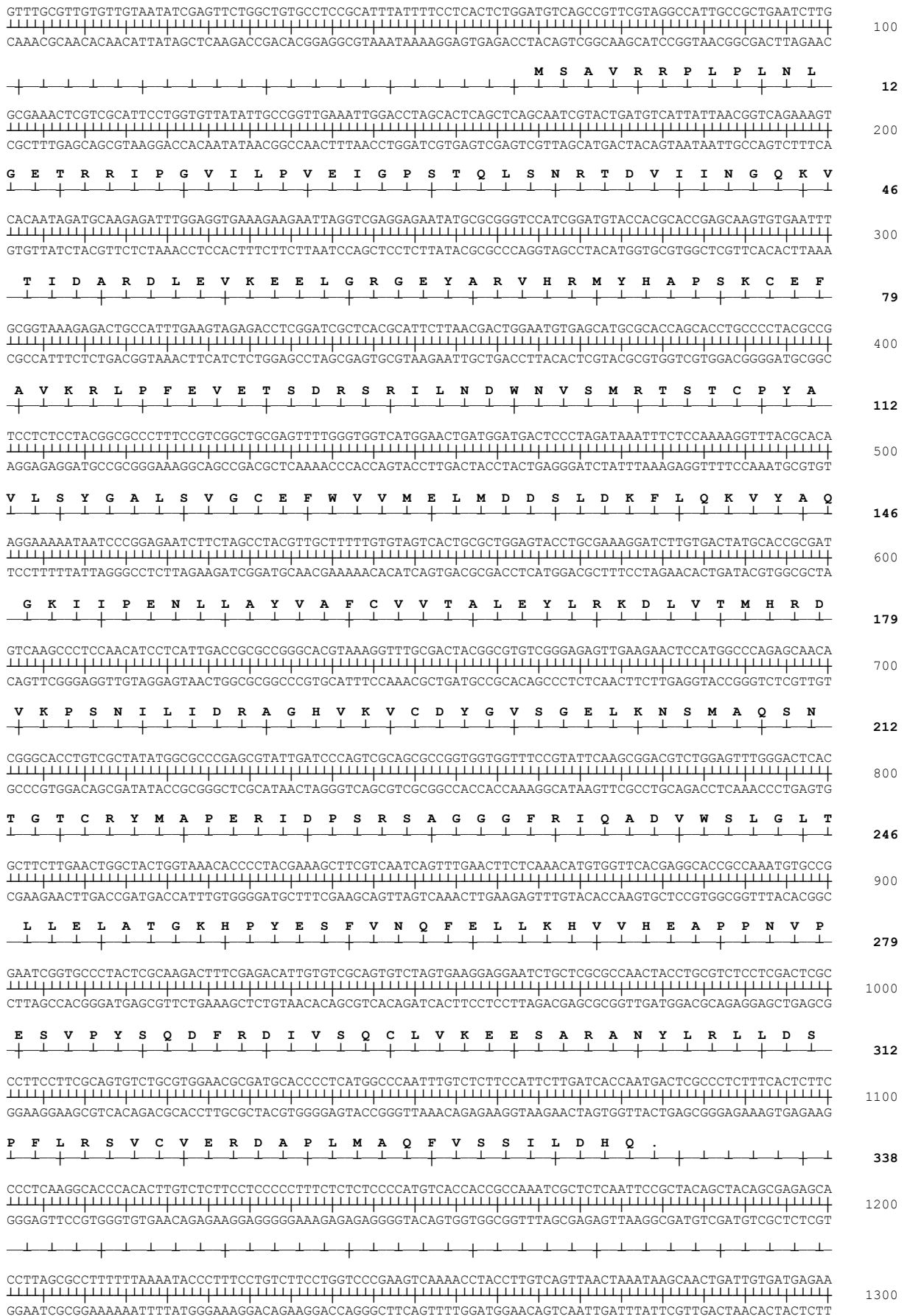
bei *emmkk-B* werden I3 und I4 gemeinsam mit E4 herausgespleißt = I3\* (4861 bp, 5862 - 10723)

Table with 10 columns and 90 rows. Columns 1-9 contain DNA sequences with bold and underlined regions. Column 10 contains a numerical index from 100 to 900. A scale at the top marks positions 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
TTCAAGTTTGCTCCCATTTA	ATGGTGCAAAAATAAATCCA	AACTCACAGATGGACGCTTA	AAGGTTACACAAATTGTAGG	TCTCTCTTGGAGAGTAACAG	9100					
CCCATGCATTCCCAGAGCTG	CAAAGAATCCTTTTTTACT	CCACCTTTCCTTCCATGCC	TTCCATGAGATGCTTCTAA	AGGTTTTATGAAACAGCTAA	9200					
AGTAGATTGCCTTGTGAATC	GGTCTGGTACCTGAAACAC	TTCAAGCCTATATCAAATTC	CCATATTTTCGTTGCAAAA	TGGAACGATATTTATGCTCT	9300					
TCTGGAAGTAACTTGTATT	ATCTGTCTATGTTTGTGCTA	TGACTGCGTGACTGCTCGTT	GTCTATGTGGTGCCTGTGA	ATGGACGCTACGACAATCG	9400					
CCCAGACTAAGTAGAAGTGA	CACTTTTACTATGACCTTTC	CTACAAGTGCATTCCTGTAA	CTATGGCGTCACTCTTGGTC	ACTATAAAGCAAAAGAGCCA	9500					
TAGATCTGGATCTAGTATGT	TTGACGACTGTAGCATGTTG	TGCGCTGACAACATGAATTA	GCATGACATACTTCTACTGT	TATTCTCTGTGGTAGCTGAC	9600					
TGCTCTAAAACCTCTCAATAG	TGGAATTCATAAATTTGAATT	TTCTTAGTGCTAAGATTTGT	AAAGGAGATTCATGTCTTCG	AGCCCGGGAAGATTGAAAGG	9700					
TCCGTCTGGCAGCGTACATC	CCTTAATTCCCGAATTC AAC	CGCATTTGGTGCATCTCATAA	ATTTTAAAGAGTCCAGGTAG	CGCCTCCTATTTACGGGATG	9800					
TTACATGGAGCTGTGCACTA	TTTTGCACGATTATTCCTGT	AAAGATTGTCTAAAATGTAAA	ATCAACGATAACAAGTACAT	AATCATAAAGTAATACCCGA	9900					
AGGCTATGGCATAGCTACAT	CCGTGTCATCTCCTTTTTTC	CCATTTTAACTGGCTAGC	CGCCTATTGAAACAATTTT	AACCTAAAACACGGAAAGT	10000					
TTAAATTTCTAAATCGTGC	CGATACTTGGCCGTTTTTTT	TTTCTTAGGTTTAACTCCT	CTCGGACCATTACTGATCAT	TTTTAGAACC AAAAATTCGC	10100					
AATACTTGTCAAACCTTCGAC	GTGATTTTGTGCTCCTTCC	ATAGTGAGTTGTTGCAGGCC	CAGTCACCCGAAACATTGGT	CTTCAATCTCGGCGTTATCC	10200					
TTGCTTTTGAATGAGCTCCC	TTTAGGGCGTGAGGAAGAGC	TGCGAGACGTGTCAGAGATC	CCAATCACCGAATCACGAGA	CTGCTACAGTCTGTGCCAG	10300					
AATCCTAGTTTGGGGCGTCA	TTTTGCTTTTTTACGATATC	ATCCACTGCACTGAAGTTTA	TGCGGTGTACTTGTATTCCA	GGGGTAGTCTTGATTCCAT	10400					
GCTTATGTTCTGCGCATCAT	AATTTTCTCCAGAAAACGTT	TTTGTACAAATTAGAAAATT	TTTCCAGTATCATATTTACC	TGTACTCGGACAACGAATGA	10500					
GTTGGTGGTTTTAGTAACAC	TGACAAGCTAATAGTCTTCA	ACGTGGAGTTGAGTTACGG	CAGATTGGAAGGACCACGAA	TGCAAAGTCTGTTATGAAAC	10600					
GTAACAATGTAAACTTGTTT	TCACAACCTCTGACGCATCTT	CAAGTGCTGCATCATACCTC	ATTTTTATATGGGAAGTGTG	TGAAGACTTCGGTGAATGAA	10700					
GGTAATGGGTAATATGATTG	TAGGTGGTTTACGAGGCACC	<b>GCCAAATGTCCGGAAATCGG</b>	<b>TGCCCTACTCGCAAGACTTT</b>	<b>CGAGACATTGTGTGCGAGTG</b>	10800					
<b>TCTAGTGAAGGAGGAATCTG</b>	<b>CTCGCGCAACTACTCGGT</b>	<b>CTCCTCGACTCGCCCTCCT</b>	<b>TGCGAGTGTCTGCGTGGAAC</b>	<b>GGGATGCACCCCTCATGGCC</b>	10900					
<b>CAATTTGCTCTTCCATTCT</b>	<b>TGATCACCAATGACTCGCC</b>	<b>TCTTTCACTCTTCCCCTCAA</b>	<b>GGCACCCACACTTGTCTCTT</b>	<b>CCTCCCCCTTCTCTCTCCC</b>	11000					
<b>CATGTCAACCACCCAAATC</b>	<b>GCTCTCAATTCGGCTACAGC</b>	<b>TACAGCGAGAGCACCTTAGC</b>	<b>GCCTTTTTTAAATAACCTTT</b>	<b>TCCTGTCTTCTCTGGTCCCGA</b>	11100					
<b>AGTCAAAACCTACCTTGTCFA</b>	<b>GTTAACTAATAAAGC</b>				11135					



### 5.16.7 emmk-A (Map)



5.16.8 *emmkk-B* (Map)

100	GTTTGCCTTGTGTTGTAATATCGAGTTCGGCTGTGCCTCCGCATTTATTTTCCTCACTCTGGATGTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTGCCGCTGAATCTTG CAAACGCACACACAACATTATAGTCTCAAGACCACACGGAGCCGTAATAAAGGAGTGAGACCTACAGTCCGCAAGCATCCGGTAACGGCGACTTAGAAC
112	M S A V R R P L P L N L
200	GCGAAACTCGTCCGATTCTGGTGTATATTGCGGGTTGAAATTGGACCTAGCACTCAGCTCAGCAATCGTACTGATGTCATTATTAACGGTCAGAAAGT CGCTTTCAGCAGCGTAAGGACCACAATATAACGGCCAATTAACTCGGATCGTGAGTCGAGTCGTTAGCATGACTACAGTAATAATTGCCAGTCTTCA
46	G E T R R I P G V I L P V E I G P S T Q L S N R T D V I I N G Q K V
300	CACAATAGATGCAAGAGATTGGAGGTGAAAGAAGAATTAGGTCGAGGAGAATATGCGCGGGTCCATCGGATGTACCACGCACCGAGCAAGTGTGAATTT GTGTATCTACGTTCTCTAACTCCACTTCTTCTTAATCCAGTCTCTTATACGGCCAGGTAGCCTACATGGTGGTGGCTCGTTCACACTTAA
79	T I D A R D L E V K E E L G R G E Y A R V H R M Y H A P S K C E F
400	GCGGTAAGAGACTGCCATTTGAAGTAGAGACCTCGGATCGCTCACGCATTTCTTAACGACTGGAATGTGAGCATGCGCACCAGCCTGCCCTACGCCG CGCCATTTCTCTGACGGTAACTTCATCTCTGGAGCCTAGCGAGTGCGTAAGAATTGCTGACCTTACACTCGTACGCGTGGTGGTGGACGGGGATCGGC
112	A V K R L P F E V E T S D R S R I L N D W N V S M R T S T C P Y A
500	TCCTCTCTACGGCGCCCTTTCCGTCGGCTGCGAGTTTGGGTGGTATGGAACGTGATGGATGACTCCCTAGATAAATTTCTCCAAAAGGTTTACGCACA AGGAGAGGATGCCGCGGAAAGGAGCCGACGCTCAAAACCCACCACTACCTTACTACTGAGGATCTATTAAAGAGGTTTCCAAATGCGTGT
146	V L S Y G A L S V G C E F W V V M E L M D D S L D K F L Q K V Y A Q
600	AGGAAAAATAATCCCGGAGAATCTTCTAGCTACGTTGCTTTTGTGTAGTCACTGCGCTGGAGTACCTGCGAAAAGGATCTTGTGACTATGCACCCGAT TCCTTTTTATAGGCCCTCTTAGAAGATCGGATGCAACGAAAAACACATCAGTGACCGGACCTCATGGACGCTTTCCTAGAACACTGATACGTGGCGCTA
179	G K I I P E N L L A Y V A F C V V T A L E Y L R K D L V T M H R D
700	GTCAAGCCCTCCAACATCTCATTGACCGCGCCGGCCAGTAAAGGTGGTTCACAGGACCGCCAAATGTGCCGGAATCGGTGCCCTACTCGCAAGACT CAGTTCGGGAGGTTGTAGGAGTAACTGGCGCGCCCGTGCATTTCCACCAAGTGTCCGTGGCGGTTTACACGGCCTTAGCCACGGGATGAGCGTTCTGA
212	V K P S N I L I D R A G H V K V V H E A P P N V P E S V P Y S Q D
800	TTCGAGACATTTGTGTCGAGTGTCTAGTGAAGGAGGAATCTGCTCGCGCCAACCTACCTGCGTCTCCTCGACTCGCCCTTCCCTTCGAGTGTCTGCGTGGG AAGCTCTGTAACACAGCGTACAGATCACTTCCCTCCTTAGACGAGCGGTTGATGGACGCAGAGGAGCTGAGCGGGAAGGAAGCGTACAGACGCACCT
246	F R D I V S Q C L V K E E S A R A N Y L R L L D S P F L R S V C V E
900	ACGGATGCACCCCTCATGGCCAAATTTGCTCTTCCATTCTTGATCACCAATGACTCGCCCTTTTCACTCTTCCCTCAAGGCACCCACACTTGCTC TGCCTACGTGGGAGTACCGGTTAAACAGAGAAGTAAGAAGTAGTGGTTACTGAGCGGAGAAAGTGAGAAGGGAGTTCCGTGGTGTGAACAGAG
263	R D A P L M A Q F V S S I L D H Q .
1000	TTCTTCCCCCTTCTCTCCCATGTCAACCCGCAATCGCTCTCAATTCGCTACAGCTACAGCGAGAGCACCTTAGCGCCTTTTTTAAATACCC AAGGAGGGGAAAGAGAGAGGGGTACAGTGGTGGCGGTTAGCGAGAGTAAGCGGATGTCGATGTCGCTCTCGTGAATCGCGGAAAAATTTTATGGG
1091	TTTCTGTCTTCTGGTCCCAGTCAAACCTACCTTGTCAAGTAACTAAATAAGCAACTGATTGTGATGAGAAAAA AAAGGACAGAAGGACCGGCTCAGTTTGGATGGAACAGTCAATTGATTTATTCGTGACTAACACTACTCTTTTTTTTTTTTTTTT

## 5.16.9 *emmkk-A/B* (Oligonucleotide)

### *emmkk-A/B* Oligonucleotide (cDNA)

Mkk 3' mod	<i>emmkk</i> cDNA *1077-1056	GTGGTGATCAAGAATGGAAGAG
Mkk CT	<i>emmkk</i> cDNA 1249-1230	CTTCGGGACCAGGAAGACAG
Mkk-3'- Stop	<i>emmkk</i> cDNA 1080-1056	TCATTGGTGATCAAGAATGGAAGAG
Mkk-3'	<i>emmkk</i> cDNA 1077-1056	TTGGTGATCAAGAATGGAAGAG
Mkk-5	<i>emmkk</i> cDNA 52-73	GTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG
Mkk-5'-ATG	<i>emmkk</i> cDNA 50-73	ATGTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG
Mkk-5'- mod	<i>emmkk</i> cDNA *50-73	GTGTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG
Mkk-dw1	<i>emmkk</i> cDNA 465-485	CTCCCTAGATAAATTTCTCCA
Mkk-dw2	<i>emmkk</i> cDNA 577-595	CCTGCGAAAGGATCTTGTG
Mkk-dw3	<i>emmkk</i> cDNA 801-820	GCTTCTGAACTGGCTACTG
Mkk-dw4	<i>emmkk</i> cDNA 347-367	GCATTCTTAACGACTGGAATG
Mkk-dw5	<i>emmkk</i> cDNA 15-36	GTAATATCGAGTTCTGGCTGTG
Mkk-dw6	<i>emmkk</i> cDNA 947-967	GTCTAGTGAAGGAGGAATCTG
Mkk-NT	<i>emmkk</i> cDNA 17-37	AATATCGAGTTCTGGCTGTGC
Mkk-up X	<i>emmkk</i> cDNA 1079-1068	CATTGGTGATCAAGAATGGAAG
Mkk-up1	<i>emmkk</i> cDNA 777-758	CGCTTGAATACGGAAACCAC
Mkk-up2	<i>emmkk</i> cDNA 708-691	GGTGCCCGTGTGCTCTG
Mkk-up3	<i>emmkk</i> cDNA 467-447	GAGTCATCCATCAGTTCCATG
Mkk-up4	<i>emmkk</i> cDNA 627-609	GTCAATGAGGATGTTGGAG
Mkk-up5	<i>emmkk</i> cDNA 1282-1261	GCTTATTTAGTTAACTGACAAG
Mkk2 3' mod	<i>emmkk</i> cDNA *935-917	GACACTGCGACACAATGTC
Mkk(k) – dw1 (Mkk B spezifisch)	<i>emmkk</i> cDNA <u>619-631</u> und 857-860	<u>CGGGCACGTAAAGGTGG</u>

### *Emmkk-A/B* Oligonucleotide (Schnittstellen)

Mkk 3 Eco SK	<i>emmkk</i> cDNA *1066-1044	GGCGAGGAATTCTCATTGGTGATCAAGAATGGAAG
Mkk 3' Bam-Hum	<i>emmkk</i> cDNA *1066-1044	GTAGTAGGATCCTCATTGGTGATCAAGAATGGAAG
Mkk 5 Eco SK	<i>emmkk</i> cDNA *50-73	GTCCCTCGAATTCGATGTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG
Mkk 5' Bam-Hum	<i>emmkk</i> cDNA *50-73	GTAGTAGGATCCAAAAAATGTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG
Mkk up BamH1	<i>emmkk</i> cDNA *1191-1175	TTAAAAGGATCCTAAGGTGCTCTCGCTGT
Mkk1-dw-EcoR1	<i>emmkk</i> cDNA *64-82	TCCTCAGAATTCATGTCAGCCGTTTCGTAGG
Mkk1-up-PstI	<i>emmkk</i> cDNA *1206-1187	TTAAAAGTGCAGCTAAGGTGCTCTCGCTGTAG
Mkk-3' Eco SK	<i>emmkk</i> cDNA *1080-1058	GGCGAGGAATTCTCATTGGTGATCAAGAATGGAAG
Mkk-5' Eco SK	<i>emmkk</i> cDNA *64-87	GTCCCTCGAATTCGATGTCAGCCGTTTCGTAGGCCATTG

### *Emmkk-A/B* Oligonucleotide (chrDNA)

Mkk I1 (4) up	<i>emmkk</i> chrDNA 698-680	GCCATCGTATAATTGTGCG
Mkk I3 (1) dw	<i>emmkk</i> chrDNA 6825-6846	GTTGGTGCGTGTATTGGTGTTAG
Mkk I4 (2) up	<i>emmkk</i> chrDNA 7467-7444	GTAAGAAGCATGACAATTAGTAGG
Mkk-chr 3-up	<i>emmkk</i> chrDNA 9357-9338	GAGCAGTCACGCAGTCATAG

*Emmkk-A/B* Oligonucleotide (chrDNA)

Mkk-chr 4-dw	<i>emmkk</i> chrDNA 8271-8292	GTAACCTTAGAAAATACATGTG
Mkk-DR-up1	<i>emmkk</i> chrDNA 10485-10465	GTACAGGTAAATATGATACTG
Mkk-DR-up2	<i>emmkk</i> chrDNA 9922-9904	GGATGTAGCTATGCCATAG
Mkk-DR3-dw	<i>emmkk</i> chrDNA 7631-7652	ATTGTGATAGTTTTTCGCATATG
Mkk-EX 1-dw	<i>emmkk</i> chrDNA 6824-6842	GGTTGGTGCGTGTATTGGTG
Mkk-EX 1-up	<i>emmkk</i> chrDNA 7249-7230	GACAAGGAGCACCACACTG
Mkk-I4-dw1	<i>emmkk</i> chrDNA 475-494	GTCTTCATCATTGACAGTGG
Mkk-I4-dw2	<i>emmkk</i> chrDNA 1107-1127	ACTATTTAACTGCTGAGTTGG
Mkk-I4-up1	<i>emmkk</i> chrDNA 2587-2568	GTATTGACTCAGACAGCCAG
Mkk-I4-up2	<i>emmkk</i> chrDNA 1946-1926	CAACCTAAATGTCCATGACTG
Mkk-In3-dw1	<i>emmkk</i> chrDNA 3589-3605	GAGAGAAGATTAAATTG
Mkk-In3-up1	<i>emmkk</i> chrDNA 5294-5276	GAATAAGTGAAGAAGAACG
Mkk-Inter3-dw2	<i>emmkk</i> chrDNA 3589-3611	GAGAGAAGATTAAATTGGATGCG
Mkk-Inter3-up2	<i>emmkk</i> chrDNA 4742-4719	ATTCTTATAACATTAATTTGAAGG

## 5.17 EmRaf

### 5.17.1 EmRaf: Material und Methoden

Sämtliche molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden finden sich in den Kapiteln 5.1 - 5.13. Die verwendeten Organismen und deren Kultivierung ist in den Kapiteln 5.6 - 5.12 beschrieben. Für Computeranalysen wurden die Programme und Methoden aus Kapitel 5.1 verwendet.

#### Klonierung der *emraf*-cDNA und des chromosomalen Locus:

Die *emraf* cDNA wurde über eine degenerative PCR aus einer Plasmid-cDNA-Bank (hergestellt von K. Huber [158]) isoliert. Aus Aminosäuresequenzen mit den Motiven VTQWCEG und WMAPEVI, die in Serin/Threonin-Kinasen hoch konserviert sind, wurden codierende Sequenzen abgeleitet und darüber die degenerierten Primer Raf-CEG (5'-GTCACNCARTGGTGYGARGG-3', R = Purin, Y = Pyrimidin, K = G + T, N = alle Nucleotide, *emraf* cDNA: 1692-1701, EmRaf Proteinsequenz: ITQWCEG) und Raf-WMA (5'-ATAACYTCNGGNGCCATCCA-3', *emraf* cDNA: 1973-1953, EmRaf Proteinsequenz: WMAPEVM) bestimmt. Mittels PCR (30 Zyklen: 94°C – 2', 53°C – 2', 72°C – 2') konnte ein Fragment von etwa 300 bp amplifiziert werden, das nach TopoTA-Klonierung und Sequenzierung hohe Homologien zu schon bekannten Serin/Threonin-Kinasedomäne-codierenden cDNAs aufwies. Mit dem aus dieser Sequenz abgeleiteten Primer Raf-dw1 (5'-GCTCTAGTCTCTACAAACAC-3', *emraf* cDNA: 1711-1730) und dem Primer Ig4-3 (5'-TTGGAGACTTGACCAAACCTCTG-3') und nachfolgend für die Nested-PCR mit den Primern Raf-dw2 (5'-GTGCACGAACGTCCTTCG-3', *emraf* cDNA: 1737-1755) und Ig4-3-nest (5'-CTGGCGAAGAAGTCCAAAG-3') wurde dann aus einer plasmidbasierten *E. multilocularis*-cDNA (hergestellt von K. Huber [158]) über eine 3'-RACE das fehlende 3'-Ende der cDNA amplifiziert, in TOPO-TA kloniert und sequenziert. Ein großer Teil der cDNA wurde über eine PCR mit dem Primer Raf-up1 (5'-CATCCAAAAGATAGAGCCAG-3', *emraf* cDNA: 1958-1939) und dem vektorspezifischen Primer Ig4-5 (5'-GATGCCTCCTACCCTTATGATG-3') hergestellt. Die nachfolgende Nested-PCR wurde dann mit dem Primer Raf-up-nest (5'-GCGAACCGCCCTTCCACG-3', *emraf* cDNA: 1929-1912) sowie dem vektorspezifischen Primer Ig4-5-nest (5'-CTCCCGAATTCCGGCAGAG-3', VEKTOR) amplifiziert, in TOPO-TA kloniert und sequenziert. Das 5'-Ende wurde mit dem aus dieser Sequenz abgeleiteten Primer Raf-up3-nest (5'-GGGATTGATGTGATG-GCAG-3', *emraf* cDNA: 1220-1202) über eine 5'-RACE aus einer SMART-cDNA isoliert. Das vollständige Leseraster von *emraf* konnte anschließend mit der Primerkombination Raf-5'-dw2 (5'-ATGGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATC-3', *emraf* cDNA: 99-126) und Raf-3' (5'-TTGGACCTTAACAGTCAC-3', *emraf* cDNA: 2438-2421) über PCR aus *E. multilocularis*-cDNA amplifiziert werden.

Der chromosomale Locus von *emraf* wurde, in 7 überlappenden Fragmenten über PCR aus chromosomaler *E. multilocularis*-DNA amplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und abschließend sequenziert. Die 7 Fragmente wurden mit den folgenden Primerkombinationen amplifiziert, **F1:** Raf-5'cDNA2 (5'-GTCTTAGCATGTAGATTAACTG-3', *emraf* cDNA: 4-26) × Raf-up7 (5'-CCAGAGCTACTCCAGCTG-3', *emraf* cDNA: 672-655), **F2:** Raf-dw7 (5'-GACGATACGT-CAGGTGTTAG-3', *emraf* cDNA: 545-569) × (5'-GGAATAAGGTTGGAGAAAGAGG-3', *emraf* cDNA: 1252-1231), **F3:** Raf-dw5 (5'-CGTGAGCGCTCCTCCTCTAG-3', *emraf* cDNA: 1173-1192) × Raf-up5 (5'-GCCAGTAGCCCTTGAAAACCG-3', *emraf* cDNA: 1539-1519), **F4:** Raf-dw11 (5'-GCCTTGACTCCAGTGACAAG-3', *emraf* cDNA: 1438-1457) × Raf-up13 (5'-GCCCT-GAGTGGTTTGACGAG-3', *emraf* cDNA: 1799-1780), **F5:** Raf-dw13 (5'-GCTCGTCAAAC-CACTCAGG-3', *emraf* cDNA: 1779-1797) × Raf-up-nest (5'-GCGAACCGCCCTTCCACG-3', *emraf* cDNA: 1929-1912), **F6:** Raf-dw-nest-3.7.01 (5'-GAACGGATTGTGAAGATTGG-3', *emraf* cDNA: 1866-1885) × Raf-up12 (5'-GCGAATCGCCGACATGTCG-3', *emraf* cDNA: 2144-

2126) und F7: Raf-dw8 (5'-CTCTTTCTCGTCGGTAAAGG-3', *emraf* cDNA: 2094-2113) × Raf-3'cDNA-up2 (5'-GCATTGTTTTGACGCTTCACG-3', *emraf* cDNA: 2516-2496)

### Stadienspezifische Expression: RT-PCR

Um die Expression von *emraf* während einer Infektion des Zwischenwirts (*M. unguiculatus*) und in den verschiedenen Larvenstadien zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA (vergl. 5.3.1) aus *in vitro* und *in vivo* kultiviertem Echinokokken-Larvenmaterial (vergl. 5.9.3 + 5.10.1) isoliert und mit dem Omniscript RT-Kit (Qiagen) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (vergl. 5.3.5). Jeweils 2 µl dieser cDNAs wurden dann mit den Primern Raf-dw1 (5'-GCTCTAGTCTCTACAAACAC-3', *emraf* cDNA: 1711-1730) und Raf-3' (5'-TTGGACCTTAACAGTCAC-3', *emraf* cDNA: 2438-2421) in einer PCR amplifiziert (30 Zyklen: 94°C – 30", 57°C – 30", 72°C – 30", Größe: ~730 bp), in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### Echinokokkenspezifischer Nachweis

Für den Nachweis das *emraf* ein Echinokokkenfaktor ist, wurde aus *in vitro* kultivierten Metacystodensvesikeln (5.10.1) und der Leber eines uninfizierten Gerbils (*M. unguiculatus*) mit dem DNeasy Kit (Qiagen) chromosomale DNA isoliert. Mit jeweils 1 µl (1:100 verdünnt) dieser DNAs als Template wurden PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") durchgeführt, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Echinokokken-spezifischen Primer für *emraf* waren für den N-Terminus Raf-5'-dw2 (5'-ATGGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATC-3', *emraf* cDNA: 99-126) × Raf-up7 (5'-CCAGAGCTACTCCAGCTG-3', *emraf* cDNA: 672-655), die ein PCR-Produkt von ~ 650 bp ergaben sowie für den C-Terminus Raf-dw14 (5'-GCGAAGAAAATTCTTCACCG-3', *emraf* cDNA: 1815-1834) × Raf-17(4)up (5'-GTTCATTACTCTGCTTCTCG-3', *emraf* chrDNA: 8888-8868) mit einem PCR-Produkt von ~400 bp. Für die Gerbil-spezifische PCR wurden die Primer Tub12up (5'-CCCCAAGTGTATGATACTGG-3') und Tub12ST (5'-CTGGGCAGTGCGGCAACCA-3') eingesetzt, die im Gen für β-Tubulin [46] von *M. unguiculatus* binden und ein Produkt von ~1.1 kbp ergaben.

### Southernblot

Für den Southern-Blot wurde chromosomale *E. multilocularis*-DNA aus *in vivo* gewachsenem Parasitengewebe (DNA-Isolation: 5.1.4, Parasitenmaterial: 5.9.3) verwendet. Jeweils 20 µg der chromosomalen DNA wurden für jeden Restriktionsverdau (BglII, EcoRI, NsiI, PstI) eingesetzt (Restriktionsverdau: 5.4.14). Die Auftrennung der DNA-Fragmente, der Transfer auf die Nylon-Membran, die Herstellung und Aufbereitung der Sonden, die Hybridisierung und die verschiedenen Waschschriffe wurden wie unter 5.4.17 beschrieben durchgeführt. Die Sonden für die Hybridisierung wurden über PCR aus chromosomaler Echinokokken-DNA mit den Primern Raf-5'mod (5'-GTGGATCGACAAAGCTTTGACG-3', *emraf* cDNA: \*100-120) × Raf-up16 (5'-CTAACACCTGACGTATCG-3', *emraf* cDNA: 569-547) für den N-Terminus, der die Ras-bindungs-Domäne enthält, und den Primern Raf-dw14 (5'-GCGAAGAAAATTCTTCACCG-3', *emraf* cDNA: 1815-1834) × Raf-up4 (5'-GGAATAAGGTTGGAGAAAGAGG-3', *emraf* cDNA: 1252-1231) für den C-Terminus, in dem die EmRaf-Kinase-Domäne liegt, amplifiziert.

### Yeast-Two-Hybrid (Y2H)

Für die Y2H-Versuche, die einen Rückschluss auf eine Interaktion von Proteinen untereinander unter *in vivo* Bedingungen zulassen, wurde das Gal4-basierte MATCHMAKER-System (Clontech) verwendet. Untersucht wurde dabei eine mögliche Y2H-Interaktion von EmRaf mit den kleinen GTP-bindenden Proteinen EmRal, EmRas, EmRap1 und EmRap2, den zwei Spleißformen von EmMkk und einem Em1433-2 (Konstruktion der Klone, vergl. 5.13.5). In allen Fällen wurde eine EmRaf-AD Fusion gegen BD-Fusionen der anderen Proteine getestet. Für die translationelle Fusion von EmRaf und der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) wurde das *emraf*-Leseraster mit den Primern Raf-NdeI-mod (5'-GTGTGCCATATGATGGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATC-3', *emraf* cDNA: \*99-126) und Raf-up-BamHI (5'-TACTCAGGATCCTCATTGGACCTTAACAGT-

CAC-3', *emraf* cDNA: \*2441-2424) aus *E. multilocularis*-cDNA PCR-amplifiziert und über die Schnittstellen NdeI und BamHI, die auch auf den verwendeten Primern liegen, in den Vektor pGADT7 kloniert. Dieser Vektor, der die Aktivierungsdomäne enthält wurde dann gemeinsam mit den jeweiligen BD-Fusionen (vergl. 5.13.5), die die Bindungsdomänen (BD) enthalten, in Hefen transformiert. Die genaue Versuchsbeschreibung findet sich in Kapitel 5.7.13.

### 5.17.2 *emraf* (cDNA)

*emraf* cDNA Sequenz (2530 bp), Protein (781 AS, 87 kDa, ch +5,26)

Codierende Sequenz 2340 bp, Start ATG bei bp 99, Stop TGA bei bp 2439

RBD Ras-Bindungs-Domäne): bp 486 – 701 (AS 129 – 201)

C1 (Phorbol-Ester Diacylglycerol + einige Ras-GTP) : bp 732 – 860 (AS 211-254)

STYKC (Proteinkinase-Domäne) : bp 1482 – 2240 AS 461 – 714)

Introns: I1 nach bp 167 (77 bp), I2 nach bp 910 (1337 bp), I3 nach bp 1271 (482 bp), I4 nach bp 1436 (1364 bp), I5 nach bp 1627 (725 bp), I6 nach bp 1804 (2589 bp), I7 nach bp 1958 (2231 bp), I8 nach bp 2225 (1184 bp)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
CTTGTCTTAGCATGTAGATT	TAAGTGCAGCTCTCAAACAG	TCTGAAGTAGTTCCAAGTGG	AAATTGTTGATGTATCCCTC	TTCTTTTGTGCTGAATGAT	100						
GGATCGACAAAGCTTTGACG	TAAATCTTAGCGCTATGGAG	AAAAACTGTGGTATGCTAAA	AACAAAGATTGCTAACTTCC	GCCTCATAAGCGACGCTTTTG	200						
CAAGACAAGACGTACCAACT	GTTGAATATCATTTCGTAAAA	AGGAGGATTTTTTCGGCATA	TTACCCCGTGAATATGATGA	GGTCTCCAGTGACATTAAC	300						
CCGTCCAAGCGGTTATCGAA	ATGTACTCCACCGAGTTAGA	AGAGCTTGAGGCTGTAATTG	ACGAATGTAAGCGGGAGAAC	AGTGCGGCAGGCGCTTCTAG	400						
AGGTAAAGCGGCCCGCAC	AACCCAATAATGGCGATTCT	ACTACCTAAGTCCACCACA	ACGTCGGCTGCCAATTCAGA	AGTGCCAGCTGAGGGCACAC	500						
CTTCCGGATAACCAAGTTTAC	CGTGGTTGAGGTGCGTCCAG	GACAGACGATACGTCAGGTG	TTAGAGAAGAAGCTTTCCCA	TCGATGCTATTGCACTGAGG	600						
ATCTCTCTGTCTACAGCGTC	GGCTCAGGGAATCTTGTGTT	GTGGGACGACGATGCAGCTG	GAGTAGCTCTGGTCTCAGGG	GACCTAGTTGTGGAGTTTAA	700						
CGATGAGCAGACCCATCGGC	GTCCAAAGCATGAGTTTCAG	CGCAGAAGGTTCTTTGAGAC	TCAAACTCTGCAGCATCTGCC	AGAAGTTTGTCTTCTTTGGA	800						
ATTACTTGCAAAATTTGCGG	CTTGGCGTTTCATCAGAGGT	GCGTTTCGCGGTTGGAGAAG	CACCACTTGCAACCTACTGA	AGAGGATAATTTTCATTGAAA	900						
TTCAGCGACTCCTAAAGTGT	AGCGGCCAGCGCAGTTCCAA	TTGGCTGGCAGTTTCAGAACG	GCTCGAGCGGTGCAATTTCC	ACCACAGGATCGACAACACC	1000						
CACAACTGCGCAGGTATGTG	TCTACGAGCGGCCACGGCC	GCAGCGCGGTTGGTGGTGC	GGTCTGCTGCGCGGCAGCAG	AGCAGCGAGGAAGCGGATGG	1100						
GAGGCGGATCGCGGTGTCCG	TGATGCAGTCACGGCTAGAA	TGCCATCGGCCCATCTACTT	ACTGCTGTTACCCGTGAGCG	CTCCTCCTTAGCCCCAATG	1200						
TCTGCCATCACATCAATCCC	CAACAGCTACCCCTTTCTC	CAACCTTATTCCTGGGCTG	GTTCGGTTAAGTCCCACGAC	TGTAACCGCCTTCCAATCC	1300						
CTCCAATGCTGCCGTCCGGTG	GTGGTGACTCAAGTGAATTC	AAGAACCCTTGTCCATCCAA	TCTGGAGACGGAAGATCGTT	TAAAAATCGGCGACAGACGGG	1400						
GGTGATGGAACCGCCTCTAC	ACCCCGCAACGCCAGCGCC	TTGACTCCAGTGACAAGTGG	GAGATTCGCGCAGAGGAGAT	CCAGAGGGTCCACGCATCG	1500						
GATCGGGCTCTTTTGGCAGC	GTTTTCAAGGGCTACTGGCA	CGGGGATGTGCCATCAAGG	AGCTCAATGTTGTGATCCT	ACTGCAACCCAGTTAAAGGC	1600						
GTTCAAGAATGAGGTTAATG	TTCTCAGAAAAACAAGTCAT	GCCAACATTTCTCTTTCAT	GGGTGTCGTCTCGAAGCCCG	GACTAGCCATCATCACGCAG	1700						
TGGTTCGAGGGCTCTAGTCT	CTACAAACACATTCATGTGC	ACGAACGTCACCTTCGATGTG	GAGGAGATGGTCGATGTTGC	TCGTCAAACCACTCAGGGCA	1800						
TGGATTACCTACCGCGAAG	AAAATTTCTCACCCGTGACCT	CAAATCCAGCAACATATTTT	TGCACGAACCGATTGTGAAG	ATTGGTGATTTTGGCCTGGC	1900						
CACAATGAAAACGTGGAAGG	GCGGTTTCGCGTCAGCCCTACT	GGCTCTATCTTTTGGATGGC	GCCGGAGGTGATGCGCATGG	AGGGTGAGACACCATACACA	2000						
AATCTCTCGGACGCTACGC	CTTCCGGAATTGTATTGTATG	AGTAACTACTGGCCAACTG	CCCTTCCGTGGGCACAACAG	CCGTGAACAAATCTCTTTTC	2100						
TCGTTCGGTAAAGGCATCCTC	CGACCCGACATGTCGGCTAT	TCGCTCCGACGTGCCACCG	AGTTGCGCCGTGTAGTCAATC	GAGTCTCGAGTTTTTCGCG	2200						
CGATGCTCGACCAATTTTT	CTCAGTTGCACCAACGCTCG	GACGGTCTTACCGCCGACT	GCGAAAACCTCCACGCTGCT	CCTCGGAACCGAATTTGCGT	2300						
AAGTACTGG GTCGCTGCGG	TGTAGGAGAGGACTGCGCCG	GTCAACTGCCGCCACCACCA	CGCGCGCAACCGCTTCCACC	CCCACCCCTTCTCTCCTA	2400						
CTTCTCCCTCATCGAAGAT	GTGACTGTTAAGGTCCAATG	AAGGTAATGAGTATGAATCC	ACTAAACTGTTATTTCAATC	AAGTGTGTTGCTGTTTCGTA	2500						
AGCGTCAAAAACATGCAATT	TTTACAGTTCAAAAAATAA	AAAAAA			2530						







### 5.17.5 emraf (MAP)

CTTGTCTTAGCATGTAGATTTAACTGCGCGTCTCAAACAGTCTGAAGTAGTTCCAAGTGGAAATTTGTTGATGTATCCCTCTTCTTTTTGTGCTGAATGAT 100  
 GAACAGAATCGTACATCTAAATGACGCGCAGAGTTTGTGAGACTTTCATCAAGGTTACCTTTAACAACATACATAGGGAGAAGAAAAACGACTTACTA  
 |-----M-----  
 |-----1-----  
 GGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATCTTAGCGCTATGGAGAAAAACTGTGGTATGCTAAAAACAAAGATTGCTAACTTCCGCTCATAAGCGACGTTTTG 200  
 CCTAGCTGTTTCGAACTGCAATTAGAATCGCGATACCTCTTTTGGACACCATACGATTTTGTCTAACGATTGAAGCGGAGTATTGCTGCAAAAC  
 D R Q S F D V N L S A M E K N C G M L K T K I A N F R L I S D V L 34  
 CAAGACAAGACGTACCAACTGTTGAATATCATTTCGTAATAAAGGAGGATTTTTTCGGCATATTCACCCGTGAATATGATGAGGTCTCCAGTGACATTAAC 300  
 GTTCTGTTCTGCATGGTTGACAACCTTATAGTAAGCATTTTTCTCTCTAAAAAGCGGTATAAGTGGGCACTTATACTACTCCAGAGGTCAGTGAATTGA  
 Q D K T Y Q L L N I I R K K E D F F G I F T R E Y D E V S S D I N 67  
 CCGTCCAAGCGGTTATCGAAATGTACTCCACCGAGTTAGAAGAGCTTGAGGCTGTAATTGACGAATGTAAGCGGGAGAACAGTGCAGGCGGCTTCTAG 400  
 GGCAGGTCGCAATAGCTTTACATGAGGTGGCTCAATCTTCTCGAATCCGACATTAAGTCTTACATTCGCCCTCTTGTACGCGCGTCCGCGAAGATC  
 S V Q A V I E M Y S T E L E E L E A V I D E C K R E N S A A G A S R 101  
 AGGTAAAAGCGGCCCGCACCAACCAATAATGGCGATTCTACTACCCCTAAGTCCACCACAACGTCGGCTGCCAATTCAGAAGTGCCAGCTGAGGGCACAC 500  
 TCCATTTTCGCGGCGGTGGTTGGGTTATTACCGCTAAGATGATGGGATTCAGGTGGTGTTCAGCCGACGGTTAAGTCTTACGGTTCGACTCCCGTGTG  
 G K S G P H Q P N N G D S T T L S P P Q R R L P I Q K C Q L R A H 134  
 CTTCCGGATAACCAGTTACCGTGGTTGAGGTGCGTCCAGGACAGACGATACGTCAGGTGTTAGAGAAGAAGCTTTCCCATCGATGCTATTGCAGTGGAG 600  
 GAAGGCCTATTGGTCAAGTGCACCAACTCCACGAGGTCCTGTCTGCTATGCAGTCCACAATCTCTTCTCGAAAGGTAGCTACGATAACGTGACTCC  
 L P D N Q F T V V E V R P G Q T I R Q V L E K K L S H R C Y C T E 167  
 ATCTCTGTCTACAGCGTCCGGCTCAGGGAATCTTGTGTTGTGGGACGACGATGCAGCTGGAGTAGCTCTGGTCTCAGGGGACCTAGTTGTGGAGTTTAA 700  
 TAGAGAGACAGATGTCGCGCCGAGTCCCTTAGAACACAACCCCTGTCTACGTCGACCTCATCGAGACCAGAGTCCCCTGGATCAACACCTCAAATT  
 D L S V Y S V G S G N L V L W D D D A A G V A L V S G D L V V E F N 201  
 CGATGAGCAGACCCATCGCGCTCCAAAGCATGAGTTTCAGCGCAGAAGGTTCTTTGAGACTCAAATCTGCAGCATCTGCCAGAAGTTTGTCTCTTTGGA 800  
 GCTACTCGTCTGGGTAGCCGAGGTTTCGTAAGTTCGCGTCTTCCAAGAACTCTGAGTTTAGACGTCGTAGACGGTCTTCAAACAGAAGAACCT  
 D E Q T H R R P K H E F Q R R R F F E T Q I C S I C Q K F V F F G 234  
 ATTACTTGCAAAATTTGCGGCTTGGCGTTTCATCAGAGGTGCGTTTCGCGGTTGAGAGAAGCACCCTTGAACCTACTGAAGAGGATAATTTCAATTGAAA 900  
 TAATGAACGTTTAAACGCCGAACCGCAAAGTAGTCTCCACGCAAAGCGCAACCTCTTCGTTGGTGAACGTTGGATGACTTCTCTATTAAGTAACCTT  
 I T C K I C G L A F H Q R C V S R L E K H H L Q P T E E D N F I E 267  
 TTCAGCGACTCCTAAAGTGTAGCGGCCAGCGAGTTCCAATTTGGCTGGCAGTTTCAAGCGGTCGAGCGGTCGAATTTCCACCACAGGATCGACAACACC 1000  
 AAGTCCGCTGAGGATTTACATCGCCGTCGCGTCAAGGTTAACCGACCGTCAAGTCTTCCGAGCTCGCCACGTTAAAGGTGGTGTCTTAGCTGTTGTGG  
 I Q R L L K C S G Q R S S N W L A V Q N G S S G A I S T T G S T T P 301  
 CACAACGCGCAGGTATGTGCTACGAGGCGGCCACGGCGGCAGCGCGGTTGGTGGCTGCGGCTGCTGCGGCGGCAGCAGAGCAGCGAGGAAGCGGATGG 1100  
 GTGTTGACGCGTCCATAACAGATGCTCCGCGGTGCCCGCTCGCCGCCACCACCGACGCGCAGCAGCGCCGCTCGTCTCGTCTGCTCTCGCTTCCGCTACC  
 T T A Q V C V Y E A A T A A A A V V A A A A A A A E Q R G S G W 334  
 GAGGCGGATCGCGGTTCCGTGATGCGTACGCGTACAGGTTAGCAATGCCATCGGCCCATCTACTTACTGCTGTACCCTGAGCGCTCTCTCTAGCCCCAATG 1200  
 CTCCGCTTAGCCACAGGCACTACGTCAGTCCGATCTTACGGTAGCCGGTGTAGTGAATGACGACAATGGGCACTCGCGAGGAGGAGATCGGGGTTAC  
 E A D R G V R D A V T A R M P S A H L L T A V T R E R S S S S P N 367

TCTGCCATCACATCAATCCCAACAGCTACCCCTCTTTCTCCAACCTTATTCCTGGGCTGGTTCGGTTAAGTCCCACGACTGTAACCAGCCTTCCAATCC  
 1300  
 AGACGGTAGTGTAGTTAGGGGTTGTCGATGGGAGAAAGAGGTTGAATAAGGGACCCGACCAAGCCAATTCAGGGTGCAGATTGGTCGGAAGGTTAGG  
 V C H H I N P Q Q L P S F S N L I P W A G S V K S H D C N Q P S N P  
 401  
 CTCCAATGCTGCCGTCGGTGGTGGTACTCAAGTGAATTCAGAACCTTGTTCATCCAATCTGGAGACGGAAGATCGTTTAAAATCGGGCAGACAGCGGG  
 1400  
 GAGGTTACGACGGCAGCCACCACCCTGAGTTCACCTTAAGTCTTTGGAACAAGGTAGGTTAGACCTCTGCCTTCTAGCAAATTTTAGCCGCTGTCTGCC  
 S N A A V G G G D S S E F K N L V P S N L E T E D R L K S A T D G  
 434  
 GGTGATGGAACCGCTCTACACCCCGGCAACGCCAGCGCCTTACTCCAGTGACAAGTGGGAGATTCCCGCAGAGGAGATCCAGAGGGGTCCACGCATCG  
 1500  
 CCACTACCTTGGCGGAGATGTGGGGCCGTTGCGGTTCGCGGAACCTGAGGTCACTGTTTACCCCTCTAAGGGCGTCTCTCTAGGTCTCCCAGGTGCGTAGC  
 G D G T A S T P R Q R Q R L D S S D K W E I P A E E I Q R G P R I  
 467  
 GATCGGGCTCTTTTGGCACGGTTTTCAAGGGCTACTGGCACGGGATGTTGCCATCAAGGAGCTCAATGTTGTGATCCTACTGCAACCCAGTTAAAGGC  
 1600  
 CTAGCCCAGAAAACCGTGCCAAAAGTCCCGATGACCGTGCCCTACAACGGTAGTTCCTCGAGTTACAACAAC TAGGATGACGTTGGGTCAATTTCCG  
 G S G S F G T V F K G Y W H G D V A I K E L N V V D P T A T Q L K A  
 501  
 GTTCAAGAATGAGGTTAATGTTCTCAGAAAAACAAGTCATGCCAACATCTCTCTTTCATGGGTGCTGCTCGAAGCCGCGACTAGCCATCATCACGCAG  
 1700  
 CAAGTCTTACTCCAATTACAAGAGTCTTTTGTTCAGTACGGTTGTAAGAGGAGAAGTACCACAGCAGAGCTTCGGCGCTGATCGGTAGTAGTGCCTC  
 F K N E V N V L R K T S H A N I L L F M G V V S K P R L A I I T Q  
 534  
 TGGTGCAGGGCTCTAGTCTCTACAAACACATTCATGTGCACGAACGTCACCTTCGATGTTGGAGGAGATGGTCGATGTTGCTCGTCAAACCCTCAGGGCA  
 1800  
 ACCACGCTCCCGAGATCAGAGATGTTGTGTAAGTACACGTGCTTGCAGTGAAGCTACACCTCCTTACCAGCTACAACGAGCAGTTTGGTGAGTCCCGT  
 W C E G S S L Y K H I H V H E R H F D V E E M V D V A R Q T T Q G  
 567  
 TGGATTACCTACACGCGAAGAAAATCTTACCCGTGACCTCAAATCCAGCAACATATTTCTGCACGAACGGATTGTGAAGATTGGTGATTTTGGCCTGGC  
 1900  
 ACCTAATGGATGTGCGCTCTTTTAAAGAAGTGGCACTGGAGTTTAGTTCGTTGTATAAAGAGCTGCTTGCCTAAACTTCTAACCCTAAAACCGGACCG  
 M D Y L H A K K I L H R D L K S S N I F L H E R I V K I G D F G L A  
 601  
 CACAATGAAAACGTTGAAGGGCGGTTTCGCGTACGCTACTGGCTCTATCTTTTGGATGGCGCGGAGGTGATGCGCATGGAGGGTGGAGACCCATACACA  
 2000  
 GTGTTACTTTTGCACCTTCCCGCAAGCGCAGTGGATGACCGAGATAGAAAACCTACCGCGGCCTCCACTACGCGTACCTCCCCTCTGTGGTATGTT  
 T M K T W K G G S R Q P T G S I F W M A P E V M R M E G E T P Y T  
 634  
 AATCTCTCGGACGCTACGCTTCGGAATTGTATTGTATGAGCTAATCACTGGCCAACCTGCCCTTCCGTGGGCACAACAGCCGTGAACAAATCCTCTTTT  
 2100  
 TTAGAGAGCCTGCAGATGCGGAAGCCTTAAACATAACATACTCGATTAGTGACCGGTTGACGGGAAGGCACCCGTTGTTGCGGCACTGTTTAGGAGAAAG  
 N L S D V Y A F G I V L Y E L I T G Q L P F R G H N S R E Q I L F  
 667  
 TCGTGGTAAAGGCATCCTCCGACCCGACATGTGCGCTATTGCTCCGACGTGCCACCGAGTTGCGCCGTGTAGTCATCGAGTCTGCGAGTTTTTCGG  
 2200  
 AGCAGCCATTTCCGTAGGAGCTGGGCTGTACAGCCGATAAGCGAGGCTGCACGGGTGGCTCAACCGGCACATCAGTAGCTCAGGACGCTCAAAAGCC  
 L V G K G I L R P D M S A I R S D V P T E L R R V V I E S C E F S R  
 701  
 CGATGCTCGACCAATTTTCTCAGTTGCACCAACGCTGGACGGTCTTACCGCCGACTGCGAAAACCTCCACGCTGCTCCTCGGAACCGAACTTGGCT  
 2300  
 GCTACGAGCTGGTTTAAAAGAGTCAACGTGGTTGCAGACCTGCCAGAGATGGCGGCTGACGCTTTTGAAGGTGCGACGAGGAGCCTTGGCTTGAACGCA  
 D A R P N F S Q L H Q R L D G L Y R R L R K L P R C S S E P N L R  
 734  
 AAGTACTGGGTCGCTGCGGTGTTAGGAGAGGACTGCGCGGTTCAACTGCGGCCACCACCACCGCGCAACCGCTTCCACCCCCACCCCTTCTCTCTTA  
 2400  
 TTCATGACCCAGCGACGCCACATCCTCTCTGACGCGGCCAGTTGACGGCGGTTGGTGGCGGCTGCGGAAGGTGGGGTGGGGGAAGAGGAGGAT  
 K Y W G R C G V G E D C A G Q L P P P P P Q P L P P P P S P P  
 767  
 CTTCTCCCTCATCGAAGATGTACTGTTAAGTCCAATGAAGGTAATGAGTATGAATCCATAAACTGTTATTTCAATCAAGTGTTTGCTGTTCTGTTG  
 2500  
 GAAGAGGGGAGTAGCTTCTACTGACAATTCAGGTTACTTCCATTACTCATACTTAGGTGATTGACAATAAAGTTAGTTACAAAACAGACAAGCACT  
 T S P L I E D V T V K V Q .  
 780

### 5.17.6 *emraf* (Oligonucleotide)

*emraf* Oligonucleotide (cDNA)

Raf 3'	<i>emraf</i> cDNA 2438-2421	TTGGACCTTAACAGTCAC
Raf 3' cDNA up	<i>emraf</i> cDNA 2497-2476	CGAACAGACAAACACTTGATTG
Raf 3' cDNA up2	<i>emraf</i> cDNA 2516-2496	GCATTGTTTTGACGCTTCACG
Raf 3' mod	<i>emraf</i> cDNA *2438-2414	GTGGACCTTAACAGTCACATCTTCG
Raf 3' stop	<i>emraf</i> cDNA 2441-2421	TCATTGGACCTTAACAGTCAC
Raf 5' cDNA	<i>emraf</i> cDNA 40-60	GTCTGAAGTAGTTCCAAGTGG
Raf 5' cDNA2	<i>emraf</i> cDNA 4-26	GTCTTAGCATGTAGATTTAACTG
Raf 5' dw	<i>emraf</i> cDNA 99-120	ATGGATCGACAAAGCTTTGACG
Raf 5' dw2	<i>emraf</i> cDNA 99-126	ATGGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATC
Raf 5' mod	<i>emraf</i> cDNA *100-120	GTGGATCGACAAAGCTTTGACG
Raf-dw	<i>emraf</i> cDNA 99-120	ATGGATCGTCAAAGCTTTGACG
Raf-dw-nest (3.7.01)	<i>emraf</i> cDNA 1866-1885	GAACGGATTGTGAAGATTGG
Raf-dw-nest (9.11.00)	<i>emraf</i> cDNA 2420-2441	TGTGCACGAACGTAACCTCG
Raf-dw1	<i>emraf</i> cDNA 1711-1730	GCTCTAGTCTCTACAAACAC
Raf-dw10	<i>emraf</i> cDNA 973-983	CAATTTCCACCACAGGATCG
Raf-dw11	<i>emraf</i> cDNA 1438-1457	GCCTTGACTCCAGTGACAAG
Raf-dw12	<i>emraf</i> cDNA 2228-2245	GCACCAACGTCTGGACGG
Raf-dw13	<i>emraf</i> cDNA 1779-1797	GCTCGTCAAACCACTCAGG
Raf-dw14	<i>emraf</i> cDNA 1815-1834	GCGAAGAAAATTCTTCACCG
Raf-dw15	<i>emraf</i> cDNA 1346-1365	CCTTGTTCCATCCAATCTGG
Raf-dw2	<i>emraf</i> cDNA 1737-1755	GTGCACGAACGTCACTTCG
Raf-dw3	<i>emraf</i> cDNA 1566-1584	AATGTTGTTGATCCTACTG
Raf-dw4	<i>emraf</i> cDNA 1237-1255	TCTCCAACCTTATCCCTG
Raf-dw5	<i>emraf</i> cDNA 1173-1192	CGTGAGCGCTCCTCCTCTAG
Raf-dw7	<i>emraf</i> cDNA 545-569	GACGATACGTCAGGTGTTAG
Raf-dw8	<i>emraf</i> cDNA 2094-2113	CTCTTTCTCGTCGGTAAAGG
Raf-dw9	<i>emraf</i> cDNA 903-922	CAGCGACTCCTAAAGTGTAG
Raf-T7 dw	<i>emraf</i> cDNA *99-120	TAATACGACTCACTATAGGGCGAATGGATCGTCAAAGCTTT- GACG
Raf-T7 up	<i>emraf</i> cDNA *304-284	TAATACGACTCACTATAGGGCGAACGGAGTTAATGTCATTGGAG
Raf-up	<i>emraf</i> cDNA 304-284	ACGGAGTTAATGTCATTGGAG
Raf-up-nest	<i>emraf</i> cDNA 1929-1912	GCGAACCGCCCTTCCACG
Raf-up1	<i>emraf</i> cDNA 1958-1939	CATCCAAAAGATAGAGCCAG
Raf-up10	<i>emraf</i> cDNA 954-937	GAAGTCCAGCCAATTGG
Raf-up11	<i>emraf</i> cDNA 1130-1112	GACTGCATCACGGACACCG
Raf-up12	<i>emraf</i> cDNA 2144-2126	GCGAATCGCCGACATGTCTG
Raf-up13	<i>emraf</i> cDNA 1799-1780	GCCCTGAGTGGTTTGACGAG
Raf-up14	<i>emraf</i> cDNA 1827-1808	GAATTTTCTTCGCGTGTAGG
Raf-up15	<i>emraf</i> cDNA 2290-2274	GGTTCGAGGAGCAGCG
Raf-up16	<i>emraf</i> cDNA 569-547	CTAACACCTGACGTATCG
Raf-up2	<i>emraf</i> cDNA 1173-1155	GGGTAACAGCAGTAAGTAG

*emraf* Oligonucleotide (cDNA)

Raf-up2-nest	<i>emraf</i> cDNA 1152-1132	GGGCCGATGGCATTCTAGCCC
Raf-up3	<i>emraf</i> cDNA 1293-1275	AAGGCTGGTTACAGTCGTG
Raf-up3 TD	<i>emraf</i> cDNA 1304-1275	GGAGGGATTGGAAGGCTGGTTACAGTCGTG
Raf-up3-nest	<i>emraf</i> cDNA 1220-1202	GGGATTGATGTGATGGCAG
Raf-up4	<i>emraf</i> cDNA 1252-1231	GGAATAAGGTTGGAGAAAGAGG
Raf-up5	<i>emraf</i> cDNA 1539-1519	GCCAGTAGCCCTTGAAAACCG
Raf-up6	<i>emraf</i> cDNA 302-284	GGAGTTAATGTCATTGGAG
Raf-up7	<i>emraf</i> cDNA 672-655	CCAGAGCTACTCCAGCTG
Raf-up9	<i>emraf</i> cDNA 286-267	GAGACCTCATCATATTCACG
TD Raf up	<i>emraf</i> cDNA 1949-1927	GATAGAGCCAGTAGGCTGACGCG

*emraf* Oligonucleotide (Schnittstellen)

Raf 3' up BAM H (Raf up-BAMM)	<i>emraf</i> cDNA *2441-2424	TACTCAGGATCCTCATTGGACCTTAACAGTCAC
Raf 5' Bam Kozak	<i>emraf</i> cDNA *99-126	GTTGTTGGATCCGCCCATGGATCGACAAAGCTTT- GACGTTAATC
Raf 5' Nde1	<i>emraf</i> cDNA *99-120	TTGTGCCATATGATGGATCGACAAAGCTTTGACG
Raf 5' Nde1 MOD	<i>emraf</i> cDNA *99-126	GTGTGCCATATGATGGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATC
Raf SK-3'-Bam	<i>emraf</i> cDNA *2438-2414	GGCTACGGATCCTTGGACCTTAACAGTCACATCTTCG
Raf-3-B	<i>emraf</i> cDNA *2441-2414	GTCATTGGATCCCTCATTGGACCTTAACAGTCACATCTTCG
Raf-3' Stu	<i>emraf</i> cDNA *2438-2414	GTCATTAGGCCTTCATTGGACCTTAACAGTCACATCTTCG
Raf-3' Stu-mod	<i>emraf</i> cDNA *2438-2414	GTCATTAGGCCTTCATTGGACCTTAACAGTCACATCTTCG
Raf-3'-Eco-SK	<i>emraf</i> cDNA *2438-2414	GTACCTGAATTCTCATTGGACCTTAACAGTCACATCTTCG
Raf-5-B	<i>emraf</i> cDNA *99-126	GTCATTGGATCCCATGGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATC
Raf-5' Stu	<i>emraf</i> cDNA *99-126	GTCATTAGGCCTATGGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATC
Raf-5' Stu-mod	<i>emraf</i> cDNA *99-126	GTCATTAGGCCTCATGGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATC
Raf-5'-Bam-Hum	<i>emraf</i> cDNA *99-126	GTAGTAGGATCCAAAAAATGGATCGACAAAGCTTT- GACGTTAATC
Raf-5'-Eco-SK	<i>emraf</i> cDNA *99-126	GTTGTGGAATTCGATGGATCGACAAAGCTTTGACGTTAATC
Raf-dw Nde1	<i>emraf</i> cDNA *1173-1192	ACTGCTCATATGCGTGAGCGCTCCTCCTCTAG

*emraf* Oligonucleotide (chromosomaler Locus)

Raf I2 (8) up	<i>emraf</i> chrDNA 1270-1252	GTCCTATCTTTCCTTGACG
Raf I7 (4) up	<i>emraf</i> chrDNA 8888-8868	GTTACATTACTCTGCTTCTCG
Raf intr dw1	<i>emraf</i> chrDNA 7185-7166	GAATTAGTGCTGAACGTGTG
Raf intr up1	<i>emraf</i> chrDNA 7018-7039	GACTAATGTATCGCTTCGAGTG
Raf intr up1 nest	<i>emraf</i> chrDNA 7090-7108	GCAAGACTGACACGCTATG
Raf inter dw1 nest	<i>emraf</i> chrDNA 7152-7134	GCTTGCCAGACATCAAGAG
Raf inter dw1 TD	<i>emraf</i> chrDNA 7185-7154	GAATTAGTGATGAACGTGTGTTTAAACCACACG
Raf inter up1	<i>emraf</i> chrDNA 7018-7039	GACTAATGTATCGCTTCGAGTG
Raf intr up 1 nest	<i>emraf</i> chrDNA 7090-7108	GCAAGACTGACACGCTATG
Raf intr up1 TD	<i>emraf</i> chrDNA 7020-7047	GACTAATGTATCGCTTCGAGTGACCTTCAAAG
Raf intr.3dw2	<i>emraf</i> chrDNA 11285-11305	GTCATCTCTGTATTCTTAGAG
Raf intr.4dw1	<i>emraf</i> chrDNA 8874-8893	GCAGAGTAATGTAACAAAGG

*emraf* Oligonucleotide (chromosomaler Locus)

Raf intr.4up1	<i>emraf</i> chrDNA 10331-10313	GTACCATCACAATGCAATG
Raf intr.6up1	<i>emraf</i> chrDNA 4152-4131	GATTAACAGTCGAATTCATTAG
Raf-I2-dw1	<i>emraf</i> chrDNA 6087-6107	GCTCTTGCATTTAGTTCTAGG
Raf-I2-dw2	<i>emraf</i> chrDNA 6564-6586	TTTATAGCCAGTGTAATAATTGTG
Raf-I2-up1	<i>emraf</i> chrDNA 7955-7937	GCAAGAATGATGCTACGAG
Raf-I2-up2	<i>emraf</i> chrDNA 7342-7324	CCTCACATGTCCTATGCAC
Raf-I3-dw2	<i>emraf</i> chrDNA 11285-11305	GTCATCTCTGTATTCTTAGAG
Raf-I3-dw2	<i>emraf</i> chrDNA 4152-4131	GATTAACAGTCGAATTCATTAG
Raf-I3-dw3	<i>emraf</i> chrDNA 11863-11881	GAGCATCTATGCTGATTGG
Raf-I3-up1	<i>emraf</i> chrDNA 11609-11590	GCACTATATTGATAAGAGCG
Raf-I3-up2	<i>emraf</i> chrDNA 10959-10939	GAAGAACAAACGCATAGAGTG
Raf-I4-dw1	<i>emraf</i> chrDNA 8874-8893	GCAGAGTAATGTAACAAAGG
Raf-I4-dw2	<i>emraf</i> chrDNA 9524-9543	GACTTTCATCGTACAATCGC
Raf-I4-dw3	<i>emraf</i> chrDNA 10104-10124	GTTTCATAGGCTTGATATACG
Raf-I4-up1	<i>emraf</i> chrDNA 10331-10313	GTACCATCACAATGCAATG
Raf-I4-up2	<i>emraf</i> chrDNA 9732-9713	GATGATAGAAACCATGATGG
Raf-I4-up3	<i>emraf</i> chrDNA 9119-9099	CAACAAATGAAGCGACAATGG
Raf-I6-dw1	<i>emraf</i> chrDNA 3737-3755	GGCATTCTGAGATTAGTGG
Raf-I6-dw2	<i>emraf</i> chrDNA 4283-4302	GTAAAGGTAATGCCTCTGTC
Raf-I6-up1	<i>emraf</i> chrDNA 4152-4132	GATTAACAGTCGAATTCATTA
Raf-I6-up2	<i>emraf</i> chrDNA 3494-3475	GACGACATTTGCCTCAAGTG
Raf-I6-up3	<i>emraf</i> chrDNA 2849-2829	ATATTTGACCTGGAAAGTGC
Raf-I6-upX	<i>emraf</i> chrDNA 3342-3324	GACACACATACTGAAAGCG
Raf-I8-dw1	<i>emraf</i> chrDNA 990-1008	TCATCTTGCTTCCGCCTAG
Raf-I8-dw2	<i>emraf</i> chrDNA 1650-1669	ACTACTTGATACTGATCTTG
Raf-I8-up1	<i>emraf</i> chrDNA 1719-1699	AATATGTTACAGTTAGATGAC
Raf-I8-up2	<i>emraf</i> chrDNA 1074-1055	CGAATTCAAGTAATTTGCGG

*emraf* degenerierte Oligonucleotide

Raf-CEG	<i>emraf</i> cDNA 1692-1701 Prot. I/VTQWCEG	GTCACXCARTGGTGYGARGG
Raf-WMA	<i>emraf</i> cDNA 1973-1953 Prot. WMAPEVI	ATAACYTCXGGXGCCATCCA

## 5.18 EmRal

### 5.18.1 EmRal: Material und Methoden

Sämtliche molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden finden sich in den Kapiteln 5.1 - 5.13. Die verwendeten Organismen und deren Kultivierung ist in den Kapiteln 5.6 - 5.12 beschrieben. Für Computeranalysen wurden die Programme und Methoden aus Kapitel 5.1 verwendet.

#### Klonierung der *emral* cDNA und des chromosomalen Locus:

Über ein Spliced Leader Differential Display [47] wurde mit der Primerkombination SLAT (5'-CCTTACCTTGCAGTTTTGTATGAT-3') × LNK-GA (5'-CCTCTCACCGCAGATCGA-3') unter anderem ein ~300 bp großes *emral* 5'-Fragment amplifiziert. Dieses Fragment wurde aus dem Acrylamidgel mit den gleichen Primern reamplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und anschließend sequenziert. Mit dem aus der Sequenz abgeleiteten *emral*-spezifischen Primer Ral-dw (5'-CTCTCACGCTCTACTTCATG-3', *emral* cDNA: 112-129) und dem poly(A)-spezifischen Primer CD3 wurde dann auf *E. multilocularis*-Spliced-Leader-cDNA eine 3'-RACE durchgeführt. Die vollständige cDNA-Sequenz wurde anschließend mit dem 3'-spezifischen Primer Ral-Cup2 (5'-CACTTTTCT TATCCAGTCGG-3', *emral* cDNA: 917 – 898) und dem 5'-Spliced-Leader spezifischen Primer SL-5PR über eine RT-PCR amplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und das Plasmid anschließend sequenziert. Das vollständige Leseraster von *emral* erhält man mit der Primerkombination Ral-5' (5'-ATGACTCAACAGCAACAACAG-3', *emral* cDNA: 37-57) × Ral-3' (5'-CAA AATCTTGCATCTCTTC-3', *emral* cDNA: 636-619).

Der chromosomale Locus von *emral* wurde, in drei überlappenden Fragmenten über PCR aus chromosomaler *E. multilocularis*-DNA amplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und abschließend sequenziert. Die drei Fragmente wurden mit den folgenden Primerkombinationen amplifiziert. **F1:** Ral-5' (5'-ATGACTCAACAGCAACAACAG-3', *emral* cDNA: 37-57) × Ral-up2 (5'-GTTACCGCAGATCAGCATTGG-3', *emral* cDNA: 405-386), **F2:** Ral-dw4 (5'-CAGATTTTGC GTGGAAG-3', *emral* cDNA: 352-369) × Ral-chrup1 (5'-GTTTCGGAATGCTGAAGTGAC-3', *emral* cDNA: 662-643), **F3:** Ral-dw6 (5'-GCTAAGACCAATACAAATGTTCG-3', *emral* cDNA: 496-516) × Ral-Cup2 (5'-CACTTTTCTTATCCAGTCGG-3', *emral* cDNA: 917-898).

#### Echinokokkenspezifischer Nachweis

Für den Nachweis das *emral* ein Echinokokkenfaktor ist, wurde aus *in vitro* kultivierten Metacystodensvesikeln (verl. 5.10.1) und der Leber eines uninfizierten Gerbils (*M. unguiculatus*) mit dem DNeasy Kit (Qiagen) chromosomale DNA isoliert. Mit jeweils 1 µl (1:100 verdünnt) dieser DNAs als Template wurden PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") durchgeführt, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Echinokokken-spezifischen Primer für *emral* waren Ral-5' (5'-ATGACTCAACAGCAACAACAG-3', *emral* cDNA: 37-57) × Ral-3' (5'-CAAAATCTTGCATCTCTTC-3', *emral* cDNA: 636-618), die ein PCR-Produkt von ~600 bp ergaben. Für die Gerbil-spezifische PCR wurden die Primer Tub12up (5'-CCC-CAAGTGTATGATACTGG-3') und Tub12ST (5'-CTGGGCAGTGCGGCAACCA-3') eingesetzt, die im Gen für β-Tubulin [46] von *M. unguiculatus* binden und ein Produkt von ~ 1.1 kbp ergaben.

#### Expression in *E. coli* und GTP-Bindung:

Für die rekombinante Expression wurde die codierende Sequenz von *emral* über PCR mit den Primern Ral-5'mod (5'-GTGACTCAACAGCAACAACAG-3', *emral* cDNA: \*38-57) × Ral-3'mod (5'-GAAAATCTTGCATCTCTTC-3', *emral* cDNA: \*636-619) amplifiziert, in den Vektor pBAD-TOPO (Invitrogen) kloniert und anschließend sequenziert. Das Expressionsplasmid, in dem *emral* N-terminal mit einem Thioredoxin und C-terminal mit einem V5-Antikörperepitop und einem 6×His-Tag fusioniert ist, wurde wie unter 5.6.5 beschrieben in *E. coli*-TOP10 Zellen für 3 Stunden

unter Zugabe von 0.2% Arabinose rekombinant exprimiert. Die Zelllysate wurden in einem 12.5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Für den Nachweis im Western Blot wurde der anti-V5 Antikörper (Invitrogen) 1:5000 eingesetzt. Der GTP-Bindungsassay wurde wie in Kapitel 5.5.10) beschrieben durchgeführt [170].

**Kombinierte Translation und Prenylierung in Kaninchen-Reticulocytenextrakt:** Die codierende Sequenz von *emral* wurde mit den Primern Ral 5'-Eco (5'-GCAGTTTGAATTCAT-GACTCAACA GCAACAACAG-3', *emral* cDNA: \*37-56) × Ral 3'-Bam (5'-GCTGAAGTGGAT-CCTTACA AAATCTTGCATCTCTTC-3', *emral* cDNA: \*639-618) aus cDNA amplifiziert und in den Vektor pGBKT7 (Clontech) über die EcoR1 und die BamH1 Schnittstellen, in frame mit einem N-terminalen c-Myc Epitop, kloniert. Dieses fusionierte Leseraster wurde mit T7 RNA Polymerase *in vitro* transkribiert und davon dann 200 ng der produzierten mRNA mit Kaninchen-Reticulocytenextrakt (Promega), für 6 Stunden bei 30°C in Gegenwart von 1mM GTP und 4µCi [<sup>3</sup>H] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat, *in vitro* translatiert (vergl. 5.5.12 + 5.5.13). Die Reaktion wurde über ein 15% PAA-Gel aufgetrennt, das Gel fixiert (2-Propanol/H<sub>2</sub>O/Eisessig, 25:65:10), mit Amplify (Amersham) behandelt, getrocknet und für acht Tage auf einen Röntgenfilm gelegt.

**Prenylierung von rekombinant exprimiertem EmRal in Kaninchen-Reticulocytenextrakt und Echinokokken-Lysat:** Die codierende Sequenz von *emral* wurde mit den Primern Ral-5' (5'-AT-GACTCAACAGCAA CAACAG-3', *emral* cDNA: 37-57) × Ral 3'-Bam (5'-GCTGAAGTG GAT-CCTTACAAAATCT TGCATCTCTTC-3', *emral* cDNA: \*639-618) aus cDNA amplifiziert und in den Vektor pBAD-Thio (Invitrogen) kloniert, wobei eine N-terminale Fusion von EmRal mit Thioredoxin entstand. Das Fusionsprotein wurde nach Anleitung (Invitrogen) in *E.coli* exprimiert, das resultierende Zellpellet in Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EGTA und Protease Inhibitor Cocktail von Roche) unter Verwendung des Fast Prep Purification Systems mit Lysing Matrix B (beides Qbiogene) lysiert und daraus dann das rekombinante Fusionsprotein mit dem Anti-Thioredoxinantikörper (Invitrogen) über G-Agarose (Upstate) immunpräzipitiert. Das immunpräzipitierte Protein wurde entweder in 60%-igem Kaninchen-Reticulocytenextrakt (Promega) oder in Echinokokken-Lysat (siehe unten), in Gegenwart von 1mM GTP und 4µCi [<sup>3</sup>H] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat für 4 Stunden bei 32°C inkubiert. Die Reaktionen wurden über ein 15% PAA-Gel aufgetrennt, das Gel fixiert (2-Propanol/H<sub>2</sub>O/Eisessig, 25:65:10), mit Amplify (Amersham) behandelt, getrocknet und für acht Tage auf einen Röntgenfilm gelegt.

Das Echinokokken-Lysat wurde aus 150 µl frisch isolierten *Protoscolices* hergestellt, die in 100 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EGTA und Protease Inhibitor Cocktail von Roche) mit dem Fast Prep Purification Systems und der Lysing Matrix B (beides Qbiogene) lysiert wurden.

#### **RT-PCR und virtueller Northern-Blot:**

Für die **RT-PCR** (vergl. 5.4.8) und den **virtuellen Northern-Blot** (vergl. 5.4.18) wurde Gesamt-RNA (vergl. 5.3.1) aus *in vitro* und *in vivo* kultiviertem Echinokokken-Larvenmaterial (vergl. 5.9.3 + 5.10.1) isoliert und in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (vergl. 5.3.5). Diese cDNAs wurde über PCRs mit den Primern SL-5PR und CD3 angereichert, die resultierenden PCRs mit einem PCR-Aufreinigungskit Kit (Qiagen) aufgereinigt und auf eine Konzentration von 50 ng doppelsträngiger trans-gespleißter cDNA pro µl eingestellt.

Für die **RT-PCRs** diente je ein µl dieser Lösungen als Template für die PCRs mit den *emral*-spezifischen Primern Ral-5' (5'-ATGACTCAACAGCAACAACAG-3', *emral* cDNA: 37-57) × Ral-3' (5'-CAAAATCTTGCATCTCTTC-3', *emral* cDNA: 636-619). Von jeder PCR wurden 10 µl auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt.



Für den **virtuellen Northern-Blot** wurde auf ein 1% Agarosegel je Tasche 500 ng der SL-cDNAs aufgetragen, auf eine Nylonmembran (Macherey + Nagel) übertragen und mit einer [<sup>32</sup>P]-markierten Sonde hybridisiert. Für die Sonde wurde auf cDNA mit den *emral*-spezifischen Primern Ral-5' (5'-ATGACTCAACAGCAACAACAG-3', *emral* cDNA: 37-57) × Ral-3' (5'-CAAATCTTGCATCTCTTC-3', *emral* cDNA: 636-619) eine PCR gefahren, und diese nach Anleitung des Herstellers mit dem Random-Primer-labeling-Kit (Boehringer Mannheim) mit [<sup>32</sup>P] markiert. Die Hybridisierung, die Waschschrte und die Röntgenfilm-Exposition folgten nach Anleitung (vergl. 5.4.18).

### Yeast-2-Hybrid

Für die Y2H-Interaktionsversuche (Kapitel Y2H - 5.7.3) von EmRal mit EmRaf (Negativkontrolle) mit dem Gal4-basierten MATCHMAKER-System (Clontech) wurde das *emral* Leseraster in einer PCR mit den Primern Ral-5'-EcoR1 (5'-GCAGTTTGAATTCATGACTCAACAGCAACAACAG-3', *emral* cDNA: \*24-44) und Ral-3'-Bam (5'-GCTGAAGTGGATCCTTACAAAATCTTG-CATCTCTTC-3', *emral* cDNA: \*626-605) amplifiziert und das resultierende Fragment über die Schnittstellen EcoR1 und BamH1 in den Vektor pGBKT7 (BD) kloniert (vergl. 5.13.5). Dieser Vektor, der die Bindungsdomäne enthält wurde dann gemeinsam mit einer EmRaf-Fusion (vergl. 5.13.5), die die Aktivierungsdomäne (AD) enthält, in Hefen transformiert. Das Wachstum der Transformanden wurde auf verschieden stark selektiven Platten beobachtet. Wachsende Hefen auf selektiven Nährböden deuten auf eine Interaktion der beteiligten AD- und BD-Fusionsproteine hin.

### 5.18.2 *emral* (cDNA)

*emral* cDNA (932 bp), Protein (200 AS, 23.1 kDa, ch +4.47)

Codierende Sequenz 600 bp, Start ATG bei bp 37, Stop TAA bei bp 637

Introns: I1 nach bp 222 (162 bp), I2 nach bp 334 (2698 bp), I3 nach bp 509 (652 bp)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CACCGTTAATCGGTCCTTAC CTTGCAGTTTTGTATGATGA CTCAACAGCAACAACAGCAA AACTTTGTTAAGTTGATTGT CGCTGGTGTGGCGGTGTGG 100
GCAAGAGTGCTCTCACGCTC TACTTCATGTACGATGAATT TGTC AAGGACTATGAACCCA CACGGGCGGACTCCTACCGA AAGAAGATATCGTTCGGTAG 200
TGAGGACGTTCAACTACATA TTCTCGACACTGCCGGACAA GAAGACTACGCAGGCATTTCG AGATACTTTCTATCGCAATA GTGAGGGATTCTCCTCGTC 300
TTCGATCTCACTGACAGACA GTCGTTCACTTCTTTGGGTG AATTTGTGGATCAGATTTTG CGTGTGAAGCGTCCGATAG GGTGCCAATGCTGATCTGCG 400
GTAACAAGGTGGACCTGACA GAAAATCGGAGGGTATCGCA GGAAGAAGCGGAAGATTTCT GTCGCAAAATGCCATGTTCC TACCTCGAGACGTCCGCTAA 500
GACCAATACAAATGTCGAAA AGGCCTTCTCACCCTCGCC CGAGAGGTTTACCAACTGAA AGTGGCTCAGAGACAGCAGC ACCAGCCCGACAGCCACC 600
AAGCAAGGTCACAAAAAGAA GAGATGCAAGATTTTGTAAA TTGTCACCTTACGATTTCCGA ACTTCCTATTTCCCAATTG CTTTTCATCTTATTCTTTC 700
CTCACTCTCTTTTGGCTTCA TACCTTCCACTCTGCTTGGC TCCTCCTTTCAGTTTTC TTTCCCTTCTGGTTCCTC TCTACTCTACCTTTTAACT 800
CATTGAATCTGCTTGCCTTG GTAGGGGATAAGGGGAACCT TTCTTTTCTGGTCGCTAAC AGATTCCCACTACTGGGGGG TAATTTCAATTATTTTGCCG 900
ACTGGATAAGAAAAGTGTA AAAAGGACCCCTAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

### 5.18.3 EmRal (Proteinsequenz)

200 AS, 23.1 kDa, ch +4.47

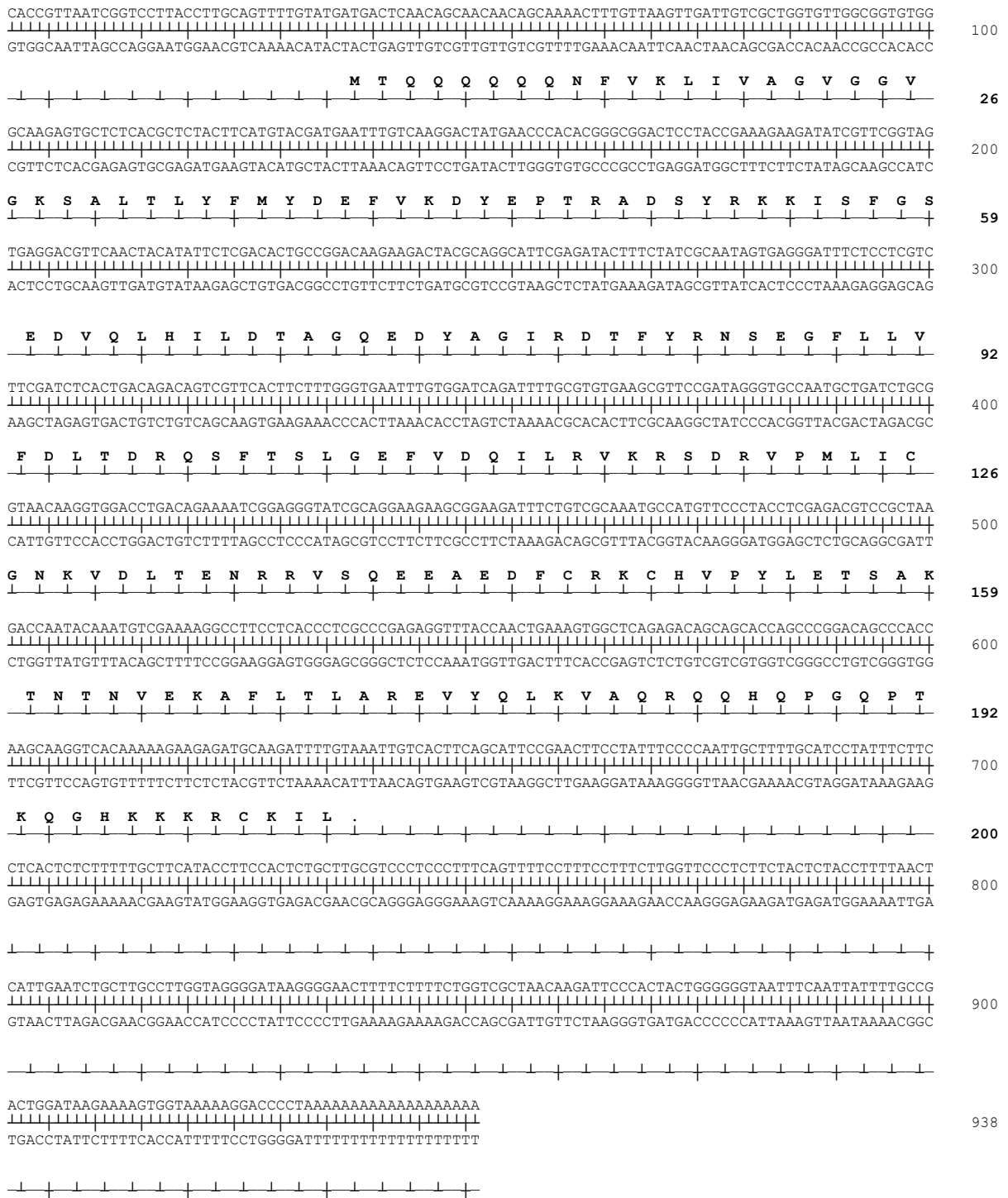
```

      10      20      30      40      50
      |-----|-----|-----|-----|
MTQQQQQQNF VKLIVAGVGG VGKSALTYLF MYDEFVKDYE PTRADSYRKK
ISFGSEDEVQL HILDTAGQED YAGIRDTFYR NSEGFLLVFD LTDRQSFTSL 100
GEFVDQILRV KRSDRVPLI CGNKVDLTEN RRVSQEEAED FCRKCHVPYL
ETSAKTNTNV EKAFLTLARE VYQLKVAQRQ QHQPGQPTKQ GHKKRCKIL 200

```



### 5.18.5 emral (Map)



### 5.18.6 *emral* (Oligonucleotide)

#### *emral* Oligonucleotide (cDNA)

Ral 3'	<i>emral</i> cDNA 636-618	CAAAATCTTGCATCTCTTC
Ral 3'mod	<i>emral</i> cDNA *636-618	GAAAATCTTGCATCTCTTC
Ral 5'mod	<i>emral</i> cDNA *37-57	GTGACTCAACAGCAACAACAG
Ral 3' stop	<i>emral</i> cDNA 629-618	TTACAAAATCTTGCATCTCTTC
Ral 5'	<i>emral</i> cDNA 37-57	ATGACTCAACAGCAACAACAG
Ral 5' chrom	<i>emral</i> cDNA 14-36	GTCCTTACCTTGCAGTTTTGTATG
Ral up1	<i>emral</i> cDNA 244-223	TGTTGTCCGGCAGTGTGCGAG
Ral-chr up1	<i>emral</i> cDNA 662- 643	GTTCGGAATGCTGAAGTGAC
Ral-chr up2	<i>emral</i> cDNA 917-898	GACTTTTCTTATCCAGTCGG
Ral-dw	<i>emral</i> cDNA 110-129	CTCTCACGCTCTACTTCATG
Ral-dw2	<i>emral</i> cDNA 304-321	GATCTCACTGACAGACAG
Ral-dw3	<i>emral</i> cDNA 183-202	GAAGATATCGTTCCGGTAGTG
Ral-dw4	<i>emral</i> cDNA 352-369	CAGATTTTGCCTGTGAAG
Ral-dw5	<i>emral</i> cDNA 608-628	GTCACAAAAAGAAGAGATGCA
Ral-dw6	<i>emral</i> cDNA 496-517	GCTAAGACCAATACAAATGTGCG
Ral-up	<i>emral</i> cDNA 241-223	CTTGTCGGCAGTGTGCGAG
Ral-up2	<i>emral</i> cDNA 405-386	GTTACCGCAGATCAGCATTGG
Ral-Cup2	<i>emral</i> cDNA 917-898	CACTTTCTTATCCAGTCGG
Ral-up3	<i>emral</i> cDNA 335-315	AAAGAAGTGAACGACTGTCTG

#### *emral* Oligonucleotide (Schnittstellen)

Ral 3' BAM	<i>emral</i> cDNA *639-618	GCTGAAGTGGATCCTTACAAAATCTTGCATCTCTTC
Ral 5' EcoR1	<i>emral</i> cDNA *37-57	GCAGTTTGAATTCATGACTCAACAGCAACAACAG
Ral-5' Bam-Hum	<i>emral</i> cDNA *37-57	GTAGTAGGATCCAAAAAATGACTCAACAGCAACAACAG

#### *emral* Oligonucleotide (chromosomaler Locus)

DAL-L7A-I2 DW1	<i>emral</i> chrDNA 392-412	CTTTCTATCGCAATAGTGAGG
DAL-L7A-I2 UP1	<i>emral</i> chrDNA 2851-2831	GGAAATAAAGTGAAATCATGG
LFA DW2	<i>emral</i> chrDNA 963-981	CAACGCAATTCTCACGATG
LFA UP2	<i>emral</i> chrDNA 2252-2232	ACTAATTTATACGACCAAATG

## 5.19 EmRap1

### 5.19.1 EmRap1: Material und Methoden

Sämtliche molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden finden sich in den Kapiteln 5.1 - 5.13. Die verwendeten Organismen und deren Kultivierung ist in den Kapiteln 5.6 - 5.12 beschrieben. Für Computeranalysen wurden die Programme und Methoden aus Kapitel 5.1 verwendet.

#### Klonierung der *emrap1* cDNA und des chromosomalen Locus:

Die *emrap1*-cDNA wurde während eines Sequenzierungsprojektes aus einer Plasmid-cDNA-Bank (hergestellt von K. Huber [158]) isoliert und sequenziert (Klon P3-227). Das vollständige Leserahinter erhält man mit der Primerkombination Rap1-5'-dw (5'-ATGCGAGACTACAAGTTGGTG-3', *emrap1* cDNA: 81-101) und Rap1-3' (5'-GCAGATGCTGCATTCTTTCTTCG-3', *emrap1* cDNA: 630-608).

Der chromosomale Locus von *emrap1* wurde, in drei überlappenden Fragmenten über PCR aus chromosomaler *E. multilocularis*-DNA amplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und abschließend sequenziert. Die drei Fragmente wurden mit den folgenden Primerkombinationen amplifiziert. **F1:** Rap1-chr.dw1 (5'-GAGCAATCGTTGGCCTCACG-3', *emrap1* cDNA: 48-67) × Rap1-up (5'-GCACTAGAGGTACCTCGTG-3', *emrap1* cDNA: 417-399), **F2:** Rap1-dw2 (5'-GATCTCTACGAGCAGATTCTG-3', *emrap1* cDNA: 363-383) × Rap1-ch-up1 (5'-AAG-GAACTGGACGTGGTG-3', *emrap1* cDNA: 686-668), **F3:** Rap1-dw3 (5'-GAAAGAATG-CAGCATCTGCTAG-3', *emrap1* cDNA: 612-633) × Rap1-ch-up2 (5'-TGAGTGTAGCACGT-TAACGG-3', *emrap1* cDNA: 1153-1134).

#### Expression in *E. coli* und GTP-Bindung:

Für die rekombinante Expression wurde die codierende Sequenz von *emrap1* über PCR mit den Primern Rap1-5'mod (5'-GTGCGAGACTACAAGTTGGTG-3', *emrap1* cDNA: 81-101) × Rap1-3' (5'-GCAGATGCTGCATTCTTTCTTCG-3', *emrap1* cDNA: 630-608) amplifiziert, in den Vektor pBAD/THIO-TOPO (Invitrogen) kloniert und anschließend sequenziert. Das Expressionsplasmid, in dem *emrap1* N-terminal mit einem Thioredoxin und C-terminal mit einem V5-Antikörperepitop und einem 6×His-Tag fusioniert ist, wurde wie unter 5.6.5 beschrieben in *E. coli*-TOP10 Zellen für 3 Stunden unter Zugabe von 0.2% Arabinose rekombinant exprimiert. Die Zelllysate wurden in einem 12.5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Für den Nachweis im Western Blot wurde der anti-V5 Antikörper (Invitrogen) 1:5000 eingesetzt. Der GTP-Bindungsassay wurde wie in Kapitel 5.5.10 beschrieben durchgeführt [170].

#### Prenylierung von rekombinant exprimiertem EmRap1 in Kaninchen-Reticulocytenextrakt und Echinokokken-Lysat:

Die codierende Sequenz von *emrap1* wurde mit den Primern Rap1-5'mod (5'-GTGCGAGACTACAAGTTGGTG-3', *emrap1* cDNA: 81-101) × Rap1-up-BamH1 (5'-AGACATGGATCCCTAG-CAGATGCTGCATTCTTTCTTCG-3', *emrap1* cDNA: \*633-608) aus cDNA amplifiziert und in den Vektor pBAD-Thio (Invitrogen) kloniert, wobei eine N-terminale Fusion von EmRap1 mit Thioredoxin entstand. Das Fusionsprotein wurde nach Anleitung (Invitrogen) in *E. coli* exprimiert, das resultierende Zellpellet in Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EGTA und Protease Inhibitor Cocktail von Roche) unter Verwendung des Fast Prep Purification Systems mit Lysing Matrix B (beides Qiagen) lysiert (5.5.4) und daraus dann das rekombinante Fusionsprotein mit dem Anti-Thioredoxinantikörper (Invitrogen) über G-Agarose (Upstate) immunpräzipitiert (5.5.9). Das immunpräzipitierte Protein wurde entweder in 60%-igem Kaninchen-Reticulocytenextrakt (Promega) oder in Echinokokken-Lysat (5.9.5), in Gegenwart von 1mM GTP und 4μCi [<sup>3</sup>H] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat für 4 Stunden bei

32°C inkubiert (vergl. 5.5.13). Die Reaktionen wurden über ein 15% PAA-Gel aufgetrennt, das Gel fixiert (2-Propanol/H<sub>2</sub>O/Eisessig, 25:65:10), mit Amplify (Amersham) behandelt, getrocknet und für acht Tage auf einen Röntgenfilm gelegt.

### **Yeast-2-Hybrid (Y2H):**

Für die Y2H-Interaktionsversuche (Kapitel Y2H - 5.7.3) von EmRap1 mit EmRaf in dem Gal4-basierten MATCHMAKER-System (Clontech) wurde das *emrap1* Leseraster in einer PCR mit den Primern Rap1-dw-EcoR1 (5'-GGAATCGAATTCATGCGAGACTACAAGTTGG-3', *emrap1* cDNA: \*81-101) und Rap1-up-BamH1 (5'-AGACATGGATCCCTAGCAGATGCTGCATTCTTTCTTCG-3', *emrap1* cDNA: \*633-608) amplifiziert und das resultierende Fragment über die Schnittstellen EcoR1 und BamH1 in den Vektor pGBKT7 (BD) kloniert (vergl. 5.13.5). Dieser Vektor, der die Bindungsdomäne enthält wurde dann gemeinsam mit einer EmRaf-Fusion (vergl. 5.13.5), die die Aktivierungsdomäne (AD) enthält, in Hefen transformiert. Das Wachstum der Transformanden wurde auf verschiedenen stark selektiven Platten beobachtet. Wachsende Hefen auf selektiven Nährböden deuten auf eine Interaktion der beteiligten AD- und BD-Fusionsproteine hin.

### **Echinokokkenspezifischer Nachweis**

Für den Nachweis das *emrap1* ein Echinokokkenfaktor ist, wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskizeln (vergl. 5.10.1) und der Leber eines uninfizierten Gerbils (*M. unguiculatus*) mit dem DNeasy Kit (Qiagen) chromosomale DNA isoliert. Mit jeweils 1 µl (1:100 verdünnt) dieser DNAs als Template wurden PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") durchgeführt, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Echinokokken-spezifischen Primer für *emrap1* waren Rap1-5'-dw (5'-ATGCGAGACTACAAGTTGGTG-3', *emrap1* cDNA: 81-101) × Rap1-up1 (5'-GCACTAGAGGTACCTCGTG-3', *emrap1* cDNA: 417-399), die ein PCR-Produkt von ~ 730 bp ergaben. Für die Gerbil-spezifische PCR wurden die Primer Tub12up (5'-CCCCAAGTGTATGATACTGG-3') und Tub12ST (5'-CTGGGCAGTGCGGCAACCA-3') eingesetzt, die im Gen für β-Tubulin [46] von *M. unguiculatus* binden und ein Produkt von ~ 1.1 kbp ergaben.

### **RT-PCR: Expression in Zyste und Protoscolex**

Um die Expression von *emrap1* während einer Infektion des Zwischenwirts (*M. unguiculatus*) und in den verschiedenen Larvenstadien zu untersuchen, wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) die Gesamt-RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskizeln (vergl. 5.10.1), *in vivo* kultiviertem Gesamtlarvenmaterial (vergl. 5.9.3), *in vivo* kultivierten Protoscolices (vergl. 5.9.6) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten (vergl. 5.9.6) Protoscolices isoliert und mit dem SMART II cDNA Synthesis Kit (BD-Biosciences) in cDNA umgeschrieben. Jeweils 1 µl dieser cDNAs wurde dann für die PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") eingesetzt. Der Nachweis (Größe: 340 bp) von *emrap1* erfolgte über eine Amplifikation mit den Primern Rap1-5'-dw-mod(5'-GTGC-GAGACTACAAGTTGGTG-3', *emrap1* cDNA: \*81-101) und Rap1-up1 (5'-GCACTAGAGGTACCTCGTG-3', *emrap1* cDNA: 417-399). Die PCR-Produkte wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### **Antikörper: Western Blot und Immunhistochemie:**

Für die Erkennung von EmRap1 in Echinokokken-Material wurde ein polyklonaler Kaninchen-αRap1 -Antikörper (StressGen) verwendet. Für den Western Blot wurden das oben beschriebene, über Immunpräzipitation (vergl. 5.5.9) aufgereinigte Thioredoxin-EmRap1-Fusionsprotein (s.o.), Lysat von *in vitro* kultivierten Metacestodeneskizeln (vergl. 5.9.5) und Lysat von frisch isolierten Protoscolices (vergl. 5.9.5) in einem 12.5% PAA-Gel nach der Größe aufgetrennt (vergl. 5.5.1), und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (vergl. 5.5.3). Mit dem Erstantikörper αRap1 (1 µg/ml) und dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper α-Kaninchen IgG (Jackson Immuno Research) wurde dann das rekombinant exprimierte und das immunpräzipitierte EmRas detektiert.

Immunhistochemie: Aus mit *E. multilocularis* infizierten Rennmäusen (*M. unguiculatus*) wurden die mit Echinokokken-Gewebe durchzogenen Lebern entfernt, in Einfriermedium (TissueTec; Sakura) gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Mit einem Kryotom wurden 5µm starke Gefrierschnitte hergestellt, auf silikonisierte Objektträger, in Aceton für 10 min bei -20°C fixiert und dann an der Luft getrocknet. Die trockenen Proben wurden in PBS rehydriert und die endogenen Peroxidasen dann durch eine 20 minütige Inkubation in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in Methanol) inaktiviert. Nach einmaligem Waschen in PBS für 5 min wurden die Proben 1 Stunde bei RT in PBS mit 5% Ziegen Serum geblockt (Blockierungspuffer). Nach einem weiteren 5 minütigen Waschschriff in PBS wurden auf jeden Objektträger 200 µl des ersten Antikörpers (αRap1 1:500 in Blockierungspuffer) gegeben und alles bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 mal für je 5 min mit PBS gewaschen, die Proben dann mit dem zweiten Antikörper (Maus-αHase, Peroxidase konjugiert; Dianova) 1:200 in Blockierungspuffer für 30 min bei RT inkubiert, nach 3 weiteren 5 minütigen Waschschriffen in PBS mit Diaminobenzidin-Reagenz (Serva) entwickelt und dann mit Hematoxilin gefärbt.

### 5.19.2 *emrap1* (cDNA)

*emrap1* cDNA (1150 bp), Protein (183 AS, 20.8 kDa, ch – 1.09, pl 5.99)

Codierende Sequenz 549 bp, Start ATG bei bp 81, Stop TAG bei bp 630

Introns: I1 nach bp 263 (410 bp), I2 nach bp 554 (2192 bp)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
CACCGTTAATCGGTCCTTAC	CTTGCAGTTTTGTATGCCTC	TGTGTGTGAGCAATCGTTGG	CCTCACGTGGAATTACGGTC	<b>ATG</b> CGGAGACTACAAGTTGGT							100
GGTTCTCGGCAGCGGAGGTG	TTGGCAAGAGCGCACTGACG	GTGCAGTTTGTACAAAAGCAT	TTTCGTGCGAAAAGTATGATC	CTACTATCGAGGATAGTTAC							200
AGGAAGCAAATCGACGTGGA	TGGCCAGCAGTGCATGCTCG	AAATTCTCGTACTGCAGGC	ACAGAGCAATTCACGGCTAT	CGCGACCTCTATATGAAAA							300
ACGGTCAGGGGTTTGTGCTG	TGCTACTCTATTACCTCCCA	GTCCACCTTCAATGACTTGG	CAGATCTCTACGAGCAGATT	CTGCGCGTGAAGGACACGCA							400
CGAGGTACCTCTAGTCTGG	TGGGAACAAGTGTGATCTT	GACAACGAGCGTGTCTGGG	CAGGGAGCAAGGCCAAACTC	TGGCCAGAAATGGAATTGT							500
GTTTTATGGAGACCACTGC	AAAAGCCAAAATCAACGTC	ATGAGGTATTTCTTTGATTTG	GTGCGTCAAATAACAACCG	AACACCGGTCCCCAAAAGA							600
CACGAACGAAGAAAGAATGC	AGCATCTGC <b>TAG</b> CGCGCGAC	GTCTCCTTCTCTCTCTCGAC	CACCAGTCACCACGTCAGT	TCCTTCATATATTGGAGCGA							700
TGGGAAGGGCCGTGGACTCT	ATTATCTTCGTTAGCGCTGC	CTCCTACCCCTTCTCTCTC	CCTCGTCTTAAAGAGATGAC	AATCTGCACACCTGCTTATC							800
CCGTAATTTAATCGCCTCTA	TATGCGAACATCTCGAACTC	TATACACTCCGGCGCACATC	TATTCATGCAAATCACCGT	CACCATTTTAGTCATTTTCG							900
TGCTTTTTTCGCTAATAAT	CATTCGTTCTCCCATTTCT	GCATTTACCTCACTGCAAA	CCGGTTGGGTGGATGCTGAA	GTTTCTCTGCTTCTTTGGC							1000
ACTCTTTTTTATTCTGCTA	CTGTAATAGTTTATTACAT	GCAGTATTTACCTCCCC	AACCAACCTTGATATCTGTC	TTTTCTGTCTGCTTTTTTC							1100
CTTGAAGCTAATAAACTGCG	CGAGTTTGTAGCTCCGTTAA	CGTGCTACACTCAAAAAAAA	AAA								1163

### 5.19.3 EmRap1 (Proteinsequenz)

183 AS, 20.8 kDa, ch – 1.09, pl 5.99

	10	20	30	40	50	
MRDYKLVVLG	SGGVGKSALT	VQFVQSIFVE	KYDPTIEDSY	RKQIDVDGQQ		
CMLEILDLAG	TEQFTAMRDL	YMKNQGQFVL	CYSITSQSTF	NDLADLYEQI		100
LRVKDTHEVP	LVLVGNKCDL	DNERVVGREQ	GQTLARNWNC	VFMETSAAK		
INVNEVFFDL	VRQINNRTPV	PKKTRTKKEC	SIC			200

### 5.19.4 *emrap1* (chromosomaler Locus)

Chromosomaler Locus: 3241 bp, Start ATG: bp 34, Stop TAA: bp 4113

Exons sind fett hervorgehoben: E1 (216 bp, 1 - 216), E2 (281 bp, 627 - 908),

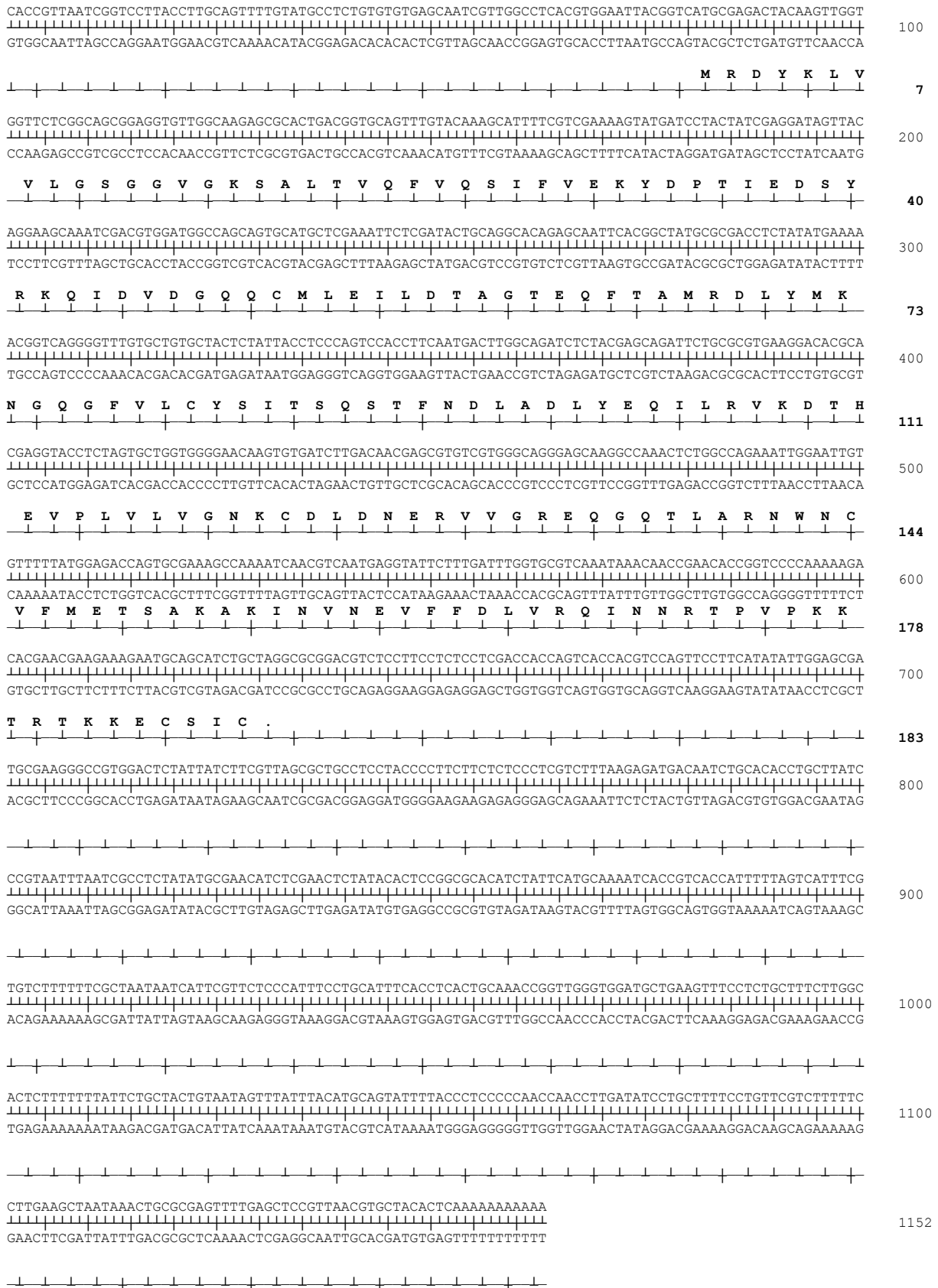
E3 (140bp, 3101 – 3241)

Introns: I1 (409 bp, 217 - 626), I2 (2192 bp, 909 - 3100)

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
		GAGCAATCGTTGGCCTCAGG	TGGAATTACGGTCAATGCGAG	ACTACAAGTTGGTGGTTCTC	GGCAGCGGAGGTGTTGGCAA	GAGCGCACTGACGGTGCAGT						100
		<b>TTGTACAAAGCATTTCGTCTC</b>	<b>GAAAAGTATGATCCTACTAT</b>	<b>CGAGGATAGTTACAGGAAGC</b>	<b>AAATCGACGTGGATGGCCAG</b>	<b>CAGTGCATGCTCGAAATTC</b>						200
		<b>CGATACTGCAGGCACAGTAT</b>	GTGATCGCGTCCCTTTCTCC	CAATTCCTCAAAATATTGAAG	GTACCAGCTGTCGCGCCGAA	GCATTTTTTACTAATTAGGT						300
		TAACCTCGTGTAAATTCAGCT	TAAATGATTGCCCTTCGGT	GACGCCAGAGGTTTATTTTT	CTCTACTTCTCATTGTTCGA	AATCAGATAAACCTTGGTAC						400
		CACCTCTTTACATAGACATT	TTTCTCACTGGGGAAAGCTT	TCATTGAAGCCACTGGCAGG	GTGTAACACAGCGGTAGTG	CCTGTGGTGGCGATTGAAT						500
		CTTGAGTAGACTTGTCTTATA	ATGGCTAGTTTTAGTGTGTG	TCGGTTGGAGCCCTCTTGA	CACCTCAAGCCAGGTATGA	GGGGGCTGTAGTTTGTGTG						600
		GACCATAAAACTTACATCAT	TTGTAGGAGCAATTCACGGC	<b>TATGCGCGACCTCTATATGA</b>	<b>AAAACGGTCAGGGGTTTGTG</b>	<b>CTGTGCTACTCTATTACCTC</b>						700
		<b>CCAGTCCACCTTCAATGACT</b>	<b>TGGCAGATCTCTACGAGCAG</b>	<b>ATTCTGCGCGTGAAGGACAC</b>	<b>GCACGAGGTACCTCTAGTGC</b>	<b>TGGTGGGGAAACAAGTGTGAT</b>						800
		<b>CTTGACACAGAGCGTGTCTG</b>	<b>GGGCAGGGAGCAAGGCCAAA</b>	<b>CTCTGGCCAGAAATTGGAAAT</b>	<b>TGTGTTTTTATGGAGACCAG</b>	<b>TGCCAAAGCCAAAATCAACG</b>						900
		<b>TCAATGAGGTAATCTTTTCT</b>	AGCCTCCCTCCGCTCTCATT	TCATTTTCCAGACGTATGTT	GTGTGGGTAGCTCGGGTATT	ACCCGAATCATACTTATCA						1000
		AGGTTTACAGAAACATGGAATT	TCCTTCATAAGCCTGTTTAC	TTTTATCTAAAGCACGTTTC	TAGCGTTAGAACGGGTGCCT	ATATTTTGTAGTCCGTCTTCA						1100
		AATTTTCTGCATTCCAAATAT	TCACTCCCAGTAATCGACCT	CATATGCAACACTTAAAAGT	GTTGCATATGAGGTCTTAAAG	ATCTCTTCCACCAGACGTT						1200
		TGCCCTTTTTCGGCCTCGGC	ATACCTATTTGCATCAACTT	GAGGTGAGGCGAAAATTTAA	TGGCTTGTGGAGGCTAAGT	AAACATATTAGCCTTTTTTT						1300
		CATGTAACGTAGCTGATTTT	GGAAATGGTCGTCTTGTAG	AGTCATTTGCTGTTTCTGA	ATAGGCTAAATAAGTGCAT	TGGATTGAAACACCCTAACT						1400
		CTTTCACCGAGTGCAGCGCC	TCTCCCACTTCCTTGTGTG	AGTGAATGGGGTTTGTGCTT	GTACATTTGACTAAATGTGA	CACACATGCGTACAGCTTAG						1500
		TGCCATGAAAGCCCGTGTAAT	GCAAAAATACTTGACACGCA	TTTCGTGTTAGCATCTAGCG	ACCACACGACGACCTGTATG	TGGGTGCGCATGTGCATATG						1600
		CGTGCTTACGCTGGCTCGCT	ATGAGTCATCTTTGGCGAGT	GTGTGCATGCGCGCGCCTC	GCGCCTAGTATCGCTGGGAG	GTTTTTGTGCATCCGCCAT						1700
		GGGGTACCGCAGCCCCACCT	CTCTCTTGTCTCTACGCC	TTTGACCTCCTCTCTTGTGC	TCGTGATTCATCACACCAC	ACAAGGTGTAGCTGGCGAG						1800
		GCTGTATATGTGCACGTGCG	CACGTGCATGTGATACTAAG	ATCTCCTCTCGAGGCTCTTA	CTTTCAGTGTCTACGCGTGC	ATACATTTAAACGCTCGCTTC						1900
		TTTTTGACCTTCACTACGCC	CTTTTCACCTTTCATTTCAA	TCTGACGCGCTATGTTTCTT	TGAAAAGAAGGATTTGGGGG	GCGCTTTCGAACCTTGCCTT						2000
		CCCCAATGGAGCATTTCAGAC	TTGCCGCACTGCGGAGTGTG	CATAAACATTTTCCGCCAGA	AAGTTTACACAATGCTGGGA	GTGCAAGTCTTTAGGCTTGT						2100
		TTACGATGAAAGGCCAAGT	AAGGTCAAATGGTGTTTTTT	ACATTTGTGTTACGTATTTG	TCTGTCTTTTGAACAGTTAG	CAAAAATCGGTCATTGCTTTC						2200
		AAATACCACACATTTTCTG	GCACAACCTGTTAAGGCCCT	TGTTCTAGTTGGAAGTGAAT	TTATCCAGAACTTTAGCGAG	AGCTATTTTCTATTTCCCTTG						2300
		GTGTAGGCATTCAAACTTTA	TGGAACCTCGATTTGATTTT	AAAAATTTATTTGAGGCTTT	CTATTTCTTCAGCGTAGA	AAATTCCTGGTATGGGCAT						2400
		TCGTATTCCTGAACCTGGAA	GAAGCATTGCTTTTATCCAC	ATATTGGGGAAATTCATG	TCAACTACTTCTCTTCGGG	GGTCATGAGACGAAAACG						2500
		TCATTCATTCCTTATTTGTTA	AACTGTTTTATTCCTAACA	AAATGCTTATTAGTACTCCC	AAATCTTCTAATCGGATTT	CAATAAATTTACTGGATTTG						2600
		GGATGTGTACCCTTTTAAAC	CGTTTTTCTGTAAAACA	AGACTTATAAACCGGTCAGT	GAAGAATTTAAACTTTAAAG	CTTAATACTTAAATACAAG						2700
		TGGTGTAAATTTGGCCACTAT	AAAGACCAAGATAAAAACA	GTGGTTGTTTTTACATGATC	GCCTCTGCTTTTGCCTTAA	AATTAAGTTAGGTTATGAGT						2800
		TGGTACTTCGTACCATTAGA	CTAAACGAGGCCATTACGGC	TAGCGATGATAATTCATGA	TGGTTTATGCCAGTAATTTAT	TAAACACCGTTTCAAAGCA						2900
		AAAACACTGGGCATTTTGTG	CGTAAGTAGACGTACGTATT	TAAAATCTCGTTCTCTTTTT	AGAAGTTCGCTGTGTAGCT	TAAAACCTGGCTTGGCAAATA						3000
		GGCCCGGTAGTTGCAAAAC	CGCTTAGGCGGACCGTTGG	TGTTTTTAAATGTAGCGCTCG	TTAAAATCACGCTGGTTGAT	CCCCCATGGTGGATTTTAG						3100
		<b>GTATTCCTTTGATTTGGTGCG</b>	<b>TCAAATAAACCAACCGAACAC</b>	<b>CGGTCCCAAAAAAGGACAGC</b>	<b>AACGAAGAAAGAAATGCAGCA</b>	<b>TCTGTCTAGGCGGGACGCTCT</b>						3200
		CCTTCCTCTCCTCGACCACC	AGTCACCACGTCCAGTTCCT	T								3241



### 5.19.5 emrap1 (Map)



### 5.19.6 *emrap1* (Oligonucleotide)

#### *emrap1* Oligonucleotide (cDNA)

Rap1-3'	<i>emrap1</i> cDNA bp 630 - 608	GCAGATGCTGCATTCTTTCTTCG
Rap1-3' mod	<i>emrap1</i> cDNA bp *630 - 608	GTAGCAGATGCTGCATTCTTTCTTCG
Rap1-5'dw	<i>emrap1</i> cDNA bp 81 - 101	ATGCGAGACTACAAGTTGGTG
Rap1-5'dw mod	<i>emrap1</i> cDNA bp *81 - 101	GTGCGAGACTACAAGTTGGTG
Rap1-ch-dw1	<i>emrap1</i> cDNA bp 48 - 67	GAGCAATCGTTGGCCTCACG
EmRap-C	<i>emrap1</i> cDNA bp 630-608	GCAGATGCTGCATTCTTTCTTCG
EmRap-N	<i>emrap1</i> cDNA bp 81 - 101	ATGCGAGACTACAAGTTGGTG
Rap1-ch-up1	<i>emrap1</i> cDNA bp 686 - 668	AAGGAACTGGACGTGGTG
Rap1-ch-up2	<i>emrap1</i> cDNA bp 1153 - 1134	TGAGTGTAGCACGTTAACGG
Rap1-dw1	<i>emrap1</i> cDNA bp 259 - 278	GCACAGAGCAATTCACGG
Rap1-dw2	<i>emrap1</i> cDNA bp 363 - 383	GATCTCTACGAGCAGATTCTG
Rap1-dw3	<i>emrap1</i> cDNA bp 612 - 633	GAAAGAATGCAGCATCTGCTAG
Rap1-up1	<i>emrap1</i> cDNA bp 417 - 399	GCACTAGAGGTACCTCGTG

#### *emrap1* Oligonucleotide (chromosomaler Locus)

DAP1.....dw1	<i>emrap1</i> chrDNA bp 1225 - 1244	CTATTTGCATCAACTTGAGG
DAP1.....up1	<i>emrap1</i> chrDNA bp 2737 - 2714	TTTTATCTTGGTCTTTATAGTGG
P1-2 dw2	<i>emrap1</i> chrDNA bp 1821 - 1840	CACGTGCATGTGATACTAAG
P1-2 dw3	<i>emrap1</i> chrDNA bp 2398 - 2456	CATTCGTATTCCTGAACTG
P1-2 up2	<i>emrap1</i> chrDNA bp 2163 - 2142	AGACAAATACGTAACACAAATG
P1-2 up3	<i>emrap1</i> chrDNA bp 1551 - 1533	GCTAACACTAATGCGTGTG

#### *emrap1* Oligonucleotide (cDNA)

Rap1-5' Bam-Hum	<i>emrap1</i> cDNA bp *81 - 101	GTAGTAGGATCCAAAAAATGCGAGACTACAAGTTGGTG
Rap1-dw-EcoR1	<i>emrap1</i> cDNA bp *81 - 101	GGAATCGAATTCATGCGAGACTACAAGTTGG
Rap1-up-BamH1	<i>emrap1</i> cDNA bp *633 - 608	AGACATGGATCCCTAGCAGATGCTGCATTCTTTCTTCG

## 5.20 EmRap2

### 5.20.1 EmRap2: Material und Methoden

Sämtliche molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden finden sich in den Kapiteln 5.1 - 5.13. Die verwendeten Organismen und deren Kultivierung ist in den Kapiteln 5.6 - 5.12 beschrieben. Für Computeranalysen wurden die Programme und Methoden aus Kapitel 5.1 verwendet.

#### Klonierung der *emrap2* cDNA und des chromosomalen Locus:

Die *emrap2*-cDNA wurde über eine auf *emras* ausgelegte degenerative PCR aus einer Plasmid-cDNA-Bank (hergestellt von K. Huber [158]) isoliert. Dafür wurde aus dem, in Ras-ähnlichen kleinen Proteinen hoch konservierten, Aminosäure-Sequenzmotiv GGVGKSA der degenerierte Primer Ras-N1 (5'-GGTGGTGGTTGGXAARTCXGC-3', R = Purin, Y = Pyrimidin, K = G + T, N = alle Nucleotide, *emrap2* cDNA: 433-453, EmRap2 Proteinsequenz: GGVGKSA) abgeleitet. Mit diesem Primer, der Richtung 3'-Ende liest und dem Vektor-spezifischen Primer JG4-3 up (5'-TTGGAGACTTGACCAAACCTCTG-3') wurde dann die degenerative PCR durchgeführt (30 Zyklen; 1' - 94°C, 2' - 54°C, 2' - 72°C). Dabei wurde ein 130 bp langes Fragment amplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und sequenziert, dass am 5'- und am 3'-Ende den Primer Ras-N1 enthielt und eine hohe Homologie zu bekannten Rap2-cDNAs unterschiedlicher phylogenetischer Ursprünge besaß. Mit dem aus dieser Sequenz abgeleiteten Primer Rap2-TD-dw (5'-ACCCACAATCGAG-GACTTCTACCG-3', *emrap2* cDNA: 497-521) und dem Primer JG4-3-TD (5'-GACCAAA-CCTCTGGCGAAGAAGTCCAAAG-3') wurde das fehlende 3'-Ende und mit den Primern TD-Rap2-dw (5'-ACCCACAATCGAGGACTTCTACCG-3', *emrap2* cDNA: 497-521) und JG4-5 (5'-GATGCCTCCTACCCTTATGATG-3') das fehlende 5'-Ende der *emrap2*-cDNA aus der Plasmid-cDNA-Bank (hergestellt von K. Huber [158]) amplifiziert, in TOPO-TA kloniert und sequenziert. Die vollständige cDNA wurde dann über PCR mit den Primern Rap2-ch-dw1 (5'-CTAATACGACTCACTATAG-3', *emrap2* cDNA: 1-19) und CD3-RT (5'-ATCTCTT-GAAAGGATCCTGCAGGT<sub>26</sub>V (V = G + C + A)-3',) aus *E. multilocularis*-cDNA amplifiziert, in TOPO-TA kloniert und sequenziert. Das vollständige *emrap2*-Leseraster erhielt man mit der Primerkombination Rap2-dw4 (5'-ATGGACGAATACAAAGTTGTTG-3', *emrap2* cDNA: 400-421) und Rap2-3'-up (5'-GAGGTAGGAGAGGTGAGAAG-3', *emrap2* cDNA: 1034-1015).

Der chromosomale Locus von *emrap2* konnte nur teilweise bestätigt werden. Die bisher bekannte Sequenz besteht aus 2 Fragmenten. Das N-terminale Fragment konnte mit der Primerkombination Rap2-c5-dw (5'-GACCCAACCTCCCTTTTGTTCG-3', *emrap2* cDNA: 248-268) und Rap2-up-nest (5'-TAGAAGTCCTCGATTGTG-3', *emrap2* cDNA: 518-501) amplifiziert werden, das C-terminale mit den Primern Rap2-dw5 (5'-GTATACAGCATTGCCTCATTG-3', *emrap2* cDNA: 640-660) und Rap2-3'-neu-mod (5'-GTTTCAGTCTCCTATCGTGTCC-3', *emrap2* cDNA: 1016-986). Zahlreiche Versuche die fehlenden 130 bp des chromosomalen Locus (bp 510-640) von *emrap2* zu überbrücken, ob mit diversen DNA-Polymerasen, unterschiedlichen Primerkombinationen und/oder verschiedenen Versuchsbedingungen waren bisher erfolglos.

#### RT-PCR: Expression in Zyste und Protoscolex

Um die Expression von *emrap2* während einer Infektion des Zwischenwirts (*M. unguiculatus*) und in den verschiedenen Larvenstadien zu untersuchen, wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) die Gesamt-RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (vergl. 5.10.1), *in vivo* kultiviertem Gesamtlarvenmaterial (vergl. 5.9.3), *in vivo* kultivierten Protoscolices (vergl. 5.9.6) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten (vergl. 5.9.6) Protoscolices isoliert und mit dem SMART II cDNA Synthesis Kit (BD-Biosciences) in cDNA umgeschrieben. Jeweils 1 µl dieser cDNAs wurde dann mit den Primern Rap2-dw4 (5'-ATGGACGAATACAAAGTTGTTG-3', *emrap2* cDNA: 400-421) und Rap2-up (5'-ATTTACTAGAATCTCCTTGC GG-3', *emrap2* cDNA: 540-519) sowie mit

Rap2b (5'-GTTGCTGTGCTTTTGTAGAG-3', *emrap2* cDNA: 866-885) und Rap2-3'neu-mod (5'-GAGCAGATGGCATTTCCTCTTG-3', *emrap2* cDNA: \*579-559) in je einer PCR amplifiziert (40 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30", Größe: ~140/150 bp), in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### **Echinokokkenspezifischer Nachweis**

Für den Nachweis das *emrap2* ein Echinokokkenfaktor ist, wurde aus *in vitro* kultivierten Metacystodenvesikeln (vergl. 5.10.1) und der Leber eines uninfizierten Gerbils (*M. unguiculatus*) mit dem DNeasy Kit (Qiagen) chromosomale DNA isoliert. Mit jeweils 1 µl (1:100 verdünnt) dieser DNAs als Template wurden PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") durchgeführt, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Echinokokken-spezifischen Primer für *emrap2* waren Rap2-C5-dw (5'-GACCCAACTCCCTTTTGTTCG-3', *emrap2* cDNA: 248-268) × Rap2-up-nest (5'-TAGAAGTCCTCGATTGTG-3', *emrap2* cDNA: 518-501), die ein PCR-Produkt von 280 bp ergaben sowie Rap2-dw5 (5'-GTATACAGCATTGCCTCATTG-3', *emrap2* cDNA: 640-660) × Rap2-up8 (5'-GGTCTCTACAAAAGCACAG-3', *emrap2* cDNA: 898-870) mit einem PCR-Produkt von 250 bp. Für die Gerbil-spezifische PCR wurden die Primer Tub12up (5'-CCCCAAGTGTATGATACTGG-3') und Tub12ST (5'-CTGGGCAGTGCGGCAAC-CA-3') eingesetzt, die im Gen für β-Tubulin [46] von *M. unguiculatus* binden und ein Produkt von ~ 1.1 kbp ergaben.

### **Expression in *E.coli* und GTP-Bindung:**

Für die rekombinante Expression wurde die codierende Sequenz von *emrap2* über PCR mit den Primern Rap2-5'mod (5'-GTGGACGAATACAAAGTTGTTG-3', *emrap2* cDNA: \*400-421) × Rap2-3'up (5'-GAGGTAGGAGAGGTTGAGAAG-3', *emrap2* cDNA: \*1034-1015) amplifiziert, in den Vektor pBAD/THIO-TOPO (Invitrogen) kloniert und anschließend sequenziert. Das Expressionsplasmid, in dem *emrap2* N-terminal mit einem Thioredoxin und C-terminal mit einem V5-Antikörperperitop und einem 6×His-Tag fusioniert ist, wurde wie unter 5.6.5 beschrieben in *E.-coli*-TOP10 Zellen für 3 Stunden unter Zugabe von 0.2% Arabinose rekombinant exprimiert. Die Zelllysate wurden in einem 12.5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Für den Nachweis im Western Blot wurde der anti-V5 Antikörper (Invitrogen) 1:5000 eingesetzt. Der GTP-Bindungsassay wurde wie in Kapitel (vergl. 5.5.10) beschrieben durchgeführt [170].

### **Prenylierung von rekombinant exprimiertem EmRap2 in Kaninchen-Reticulocytenextrakt und Echinokokken-Lysat:**

Die codierende Sequenz von *emrap2* wurde mit den Primern Rap2-5'mod (5'-GTGGACGAATACAAAGTTGTTG-3', *emrap2* cDNA: \*400-421) × Rap2-3'-Bam (5'-CAGGCCGGATCCT-CAGAGGATAGCACAGGCTCCAG-3', *emrap2* cDNA: \*1002-980) aus cDNA amplifiziert und in den Vektor pBAD-Thio (Invitrogen) kloniert, wobei eine N-terminale Fusion von EmRap2 mit Thioredoxin entstand. Das Fusionsprotein wurde nach Anleitung (Invitrogen) in *E.coli* exprimiert, das resultierende Zellpellet in Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EGTA und Protease Inhibitor Cocktail von Roche) unter Verwendung des Fast Prep Purification Systems mit Lysing Matrix B (beides Qbiogene) lysiert (vergl. 5.5.4) und daraus dann das rekombinante Fusionsprotein mit dem Anti-Thioredoxinantikörper (Invitrogen) über G-Agarose (Upstate) immunpräzipitiert (vergl. 5.5.9). Das immunpräzipitierte Protein wurde entweder in 60%-igem Kaninchen-Reticulocytenextrakt (Promega) oder in Echinokokken-Lysat (vergl. 5.9.5), in Gegenwart von 1mM GTP und 4µCi [<sup>3</sup>H] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat für 4 Stunden bei 32°C inkubiert (vergl. 5.5.13). Die Reaktionen wurden über ein 15% PAA-Gel aufgetrennt, das Gel fixiert (2-Propanol/H<sub>2</sub>O/Eisessig, 25:65:10), mit Amplify (Amersham) behandelt, getrocknet und für acht Tage auf einen Röntgenfilm gelegt.

### Yeast-2-Hybrid (Y2H):

Für die Y2H-Interaktionsversuche (Kapitel Y2H - 5.7.3) von EmRap2 mit EmRaf in dem Gal4-basierten MATCHMAKER-System (Clontech) wurde das *emrap2* Leseraster in einer PCR mit den Primern Rap2-EcoR1-dw (5'-GCTTTTGAATTCATGGACGAATACAAAGTTG-3', *emrap2* cDNA: \*400-418) und Rap2-3'-Bam (5'-CAGGCCGGATCCTCAGAGGATAGCACAGGCTC-CAG-3', *emrap2* cDNA: \*1002-980) amplifiziert und das resultierende Fragment über die Schnittstellen EcoR1 und BamH1 in den Vektor pGBKT7 (BD) kloniert (vergl. 5.13.5). Dieser Vektor, der die Bindungsdomäne enthält wurde dann gemeinsam mit einer EmRaf-Fusion (vergl. 5.13.5), die die Aktivierungsdomäne (AD) enthält, in Hefen transformiert. Das Wachstum der Transformanden wurde auf verschiedenen stark selektiven Platten beobachtet. Wachsende Hefen auf selektiven Nährböden deuten auf eine Interaktion der beteiligten AD- und BD-Fusionsproteine hin.

### 5.20.2 *emrap2* (cDNA)

*emrap2* cDNA (1164 bp), Protein (200 AS, 21.7 kDa, ch +2.11, pl 8.05)

Codierende Sequenz 600 bp, Start ATG bei bp 400, Stop TGA bei bp 1000

Intron: I1 nach bp 942 etwa 4500 bp, nicht sequenziert), weitere Introns sind vermutlich vorhanden, aber noch nicht gefunden.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CTAATACGACTCACTATAGG	GCAAGCAGTGGTAACAACGC	AGAGTACGCGGGGACGGGAG	CTAGGGTTTGTCTGTTGGTGT	TTTTTGGATTGCCTCTCTTT	100				
ATGCTAACTTTTCGGGATTC	TGTTACCAGTCTGTATTTG	AATCAAAAAGCCCAATGGACG	TCATTCTTTTTCGTTTGGTG	ATATATTACAACATTCTTCT	200				
GTTAATTTACCAAGTTGGA	GTTATAAACAGCGTCATTGT	TTTTGATGACCCAACTCCCT	TTTGTTCGATTTGTGGATTA	TCCTCTCATAGCACTTGCAC	300				
AATACATCTGGCGCTATTC	CTGCACGTCAGTGTATAACC	GCAGATGGGTCTTGAAAGAA	AATCGGTTGTTACTTTTCA	TATATTTGCTTTTGAGGAGA	400				
<b>TGGACCAATACAAAGTTGTT</b>	<b>GTTCTCGGTGATGGGGAGT</b>	<b>TGGAAGAGCGCCCTAACTG</b>	<b>TTTCGCTTCGTCACAGGGAGA</b>	<b>TTTGAGGAAAAGTACGACCC</b>	500				
CACAATCGAGGACTTCTACC	GCAAGGAGATTCTAGTAAAT	GGTAAAGCGTGCATGTTGGA	GATTCTTGACACAGCGGGCA	GTGAGCAGTTTTCTCACTG	600				
CAGGACCTTTACATTCGCAA	CGGCCAGGGTTTTGTGCTCG	TATACAGCATTGCCTCATTG	CAGAGTCTCCTCGACCTAGA	GGCAGTGCATCAACAGATCC	700				
TCCGTTTCAAGACTAAGGCG	CCTTCCCGGAAGTCCAAAAC	TTCGAAGTCAGCGCCATCGC	CAGTACTACCGCCAATTGTG	CTGGCGGGTAATAAGCGGGA	800				
TCTAACGGCAGTAGGGCACC	GCGAGGTCGCCAGGGCCGAC	GGGGATGCGGGCGCGAGGCG	ATGGGGTTGCTGTGCTTTTG	TAGAGACCTCGGCCAAGACG	900				
GGGGAAGGTGTGATGGATGT	CTTTTCGAGAAGTGGTTATGC	AGATGGCTCAGGAGTCTGCA	AAGAAGAAGGGCTGCACCAC	TGGAGCCTGTGCTATCCTCT	1000				
<b>GACTTGCCGGCCTGCTTCTC</b>	<b>ACCTCTCCTACCTCTTCTT</b>	<b>GGGGTGTGGGTGTGTGCTGA</b>	<b>GTTTGTAAATATTTACCGTT</b>	<b>CCTCTCTTTTTTTCGTTATT</b>	1100				
TTTGATATTTCCAACCTGTG	TGTACATATTGCCTCGATGA	AGAAGATGAAGACGTTTTTT	TTTT		1200				

### 5.20.3 EmRap2 (Proteinsequenz)

200 AS, 21.7 kDa, ch +2.11, pl 8.05

10	20	30	40	50
MDEYKVVVLG	DGGVKGSALE	VRFVTRFEE	KYDPTIEDFY	RKEILVNGKA
CMLEILDLAG	SEQFSSLQDL	YIRNGQGFVL	VYSIASLQSL	LDLEAVHQOI
LRFKTKAPSR	KSKTSKSAPS	PVLPPIVLAG	NKADLTAVGH	REVARADGDA
AARRWGCCAF	VETSAKTGEG	VMDVFREVVM	QMAQESAKK	GCTTGACAIL
				100
				200

### 5.20.4 *emrap2* (chromosomaler Locus)

Die Charakterisierung des chromosomalen Locus gestaltete sich schwierig, daher sind nur einige Bereiche bestätigt, welche in der Sequenz, die der cDNA Sequenz entspricht, fett hervorgehoben sind (Fragment 1: Rap2 C5' dw × Rap2 up nest, Fragment 2: Rap2 dw5 × Rap2 3' neu mod). Desweiteren konnte ein etwa 4,5 kb großes Intron (I1) nach bp 942 lokalisiert werden, das aber nicht sequenziert wurde.

	10		20		30		40		50		60		70		80		90		100	
CTAATACGACTCACTATAGG	GCAAGCAGTGGTAACAACGC	AGAGTACGCGGGGACGGGAG	CTAGGGTTTGTGCTGGTGT	TTTTTGGATTGCCTCTCTTT	100															
ATGCTAACTTTTCGCGATTTC	TGTTACCAGTCTCTGATTTG	AATCAAAAGCCCAATGGACG	TCATTCCTTTTCGTTTGGTG	ATATATTACAACATTTCTTCT	200															
GTTAATTTACCAAGTTGGA	GTTATAAACAGCGTCATTGT	TTTTGAT <b>GACCCA</b> ACTCCCT	<b>TTTGTTCG</b> ATTTGTGGATTA	<b>TCCTCTCA</b> TAGCACT <b>TCGCAC</b>	300															
<b>AATACATCTGGCGCTATTTTC</b>	<b>CTGCACGT</b> CAGTGTATAACC	<b>GCAGATGGG</b> TCTTT <b>GAAAGAA</b>	<b>AATCGGTTG</b> TTTACTTTTCA	<b>TATATTTG</b> CTTTT <b>GAGGAGA</b>	400															
<b>TGGACGA</b> ATACAAGTTGTT	<b>GTTC</b> CGGTGATGGGGGAGT	<b>TGGA</b> AGAGCGCCCTAACTG	<b>TTTCG</b> TTTCGTCACAGGAGA	<b>TTT</b> GAGGAAAAGTACGCC	500															
<b>CACAATCGAGGACTTCTACC</b>	GCAAGGAGATTTAGTAAAT	GGTAAAGCGTGCATGTTGGA	GATTCCTTGACACAGCGGCA	GTGAGCAGTTTTCTCACTG	600															
CAGGACCTTTACATTCGCAA	CGGCCAGGGTTTTGTGCTCG	<b>TATACAGCA</b> TTGCCTCATTG	<b>CAGAGTCT</b> CCTCGACCTAGA	<b>GGCAGTGC</b> ATCAACAGATCC	700															
<b>TCCGTTTCAAGACTAAGCGC</b>	<b>CCTTCCCG</b> GAAGTCCAAAAC	<b>TTTCAAGT</b> CAGCGCCATCGC	<b>CAGTACTAC</b> CCCAATTGTG	<b>CTGGCGG</b> TAATAAGGCGGA	800															
<b>TCTAACCGCAGTAGGGCAC</b>	<b>GCGAGG</b> TCGCCAGGGCCGAC	<b>GGGGAT</b> GCGCGCGAGGGCG	<b>ATGGGG</b> TTGCTGTGCTTTTG	<b>TAGAGAC</b> CTCGGCGAAGACG	900															
<b>GGGGAAGGTGTGATGGATGT</b>	<b>CTTTCG</b> GAGAAGTGGTTATGC	<b>AGATGG</b> CTCAGGAGTCTGCA	<b>AAGAAGA</b> AGGGCTGCACCAC	<b>TGGAGC</b> CTGTGCTATCCTCT	1000															
<b>GACTTG</b> CCGGCCTGCTTCTC	ACCTCTCCTACCTCTTTCTT	GGGGTGTGGTGTGTGCTGA	GTTTGTAAATATTTACCGTT	CCTCTCTTTTTTTCGTTATT	1100															
TTTGCAATATTTCCAACCTGTG	TGTACATATTGCCTCGATGA	AGAAGATGAAGACGTTTTTT	TTTT	1200																

### 5.20.5 EmRap2 (Oligonucleotide)

*emrap2* (cDNA)

Rap2 3' up	<i>emrap2</i> cDNA 1034-1015	GAGGTAGGAGAGGTGAGAAG
Rap2 5' mod	<i>emrap2</i> cDNA *400-421	GTGGACGAATACAAAGTTGTTG
Rap2 C5' dw	<i>emrap2</i> cDNA 248-268	GACCCAACCTCCCTTTTGTTCG
Rap2-3'	<i>emrap2</i> cDNA 999-980	GAGGATAGCACAGGCTCCAG
Rap2-3' mod	<i>emrap2</i> cDNA 999-980	GAGGATAGCACAGGCTCCAG
Rap2-3' neu 2	<i>emrap2</i> cDNA 992-975	GCACAGGCTCCAGTGGTG
Rap2-3' neu mod	<i>emrap2</i> cDNA 1016-986	GTTCAGTCTCCTATCGTGTCC
Rap2-b	<i>emrap2</i> cDNA 866-885	GTTGCTGTGCTTTTGTAGAG
Rap2-C3' up	<i>emrap2</i> cDNA 1034-1015	GAGGTAGGAGAGGTGAGAAG
Rap2-C5'-dw	<i>emrap2</i> cDNA 248-268	GACCCAACCTCCCTTTTGTTCG
Rap2-ch 3' up2	<i>emrap2</i> cDNA 1077-1057	GGTAAATATTTACAAACTCAG
Rap2-ch-dw1	<i>emrap2</i> cDNA 1-19	CTAATACGACTCACTATAG
Rap2-chr up3	<i>emrap2</i> cDNA 364-342	GATTTTCTTTCAAGACCCATCTG
Rap2-dw	<i>emrap2</i> cDNA 400-418	ATGGACGAATACAAAGTTG
Rap2-dw nest	<i>emrap2</i> cDNA 477-496	GAGATTTGAGGAAAAGTACG
Rap2-dw-dw3	<i>emrap2</i> cDNA 348-369	GGTCTTGAAAGAAAATCGGTTG
Rap2-dw1	<i>emrap2</i> cDNA 453-472	CCTAACTGTTTCGCTTCGTCA
Rap2-dw10	<i>emrap2</i> cDNA 581-600	GTGAGCAGTTTTCTCACTG
Rap2-dw11	<i>emrap2</i> cDNA 600-517	GCAGGACCTTTACATTCG
Rap2-dw12	<i>emrap2</i> cDNA 720-735	GCCTTCCCGGAAGTCC
Rap2-dw13	<i>emrap2</i> cDNA 928-946	GAAGTGGTTATGCAGATGG
Rap2-dw2	<i>emrap2</i> cDNA 456-475	AACTGTTTCGCTTCGTACAG

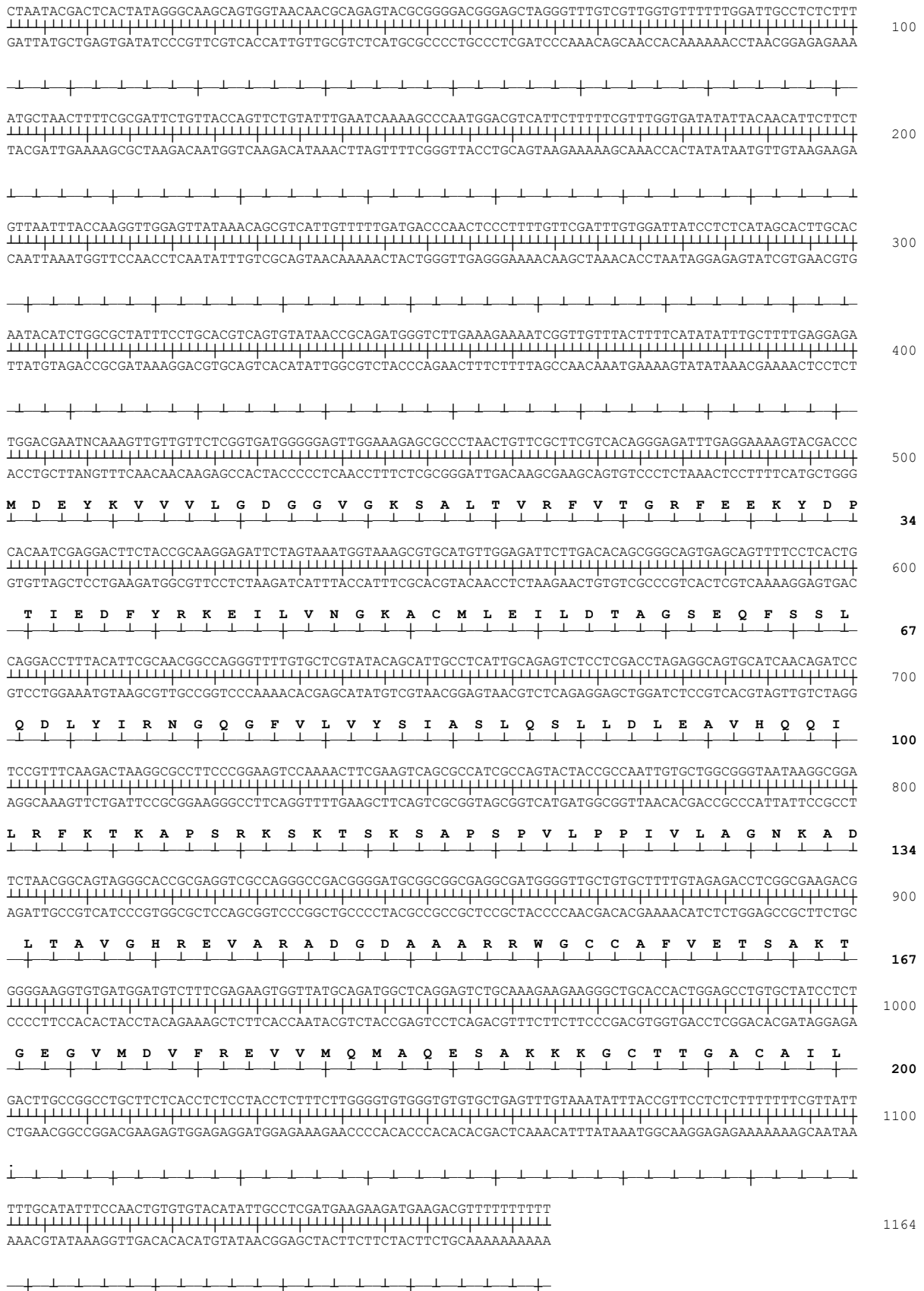
*emrap2* (cDNA)

Rap2-dw3	<i>emrap2</i> cDNA 477-496	GAGATTTGAGGAAAAGTACG
Rap2-dw4	<i>emrap2</i> cDNA 400-421	ATGGACGAATACAAAGTTGTTG
Rap2-dw5	<i>emrap2</i> cDNA 640-660	GTATACAGCATTGCCTCATTG
Rap2-dw6	<i>emrap2</i> cDNA 469-487	GTCACAGGGAGATTGAGG
Rap2-dw7	<i>emrap2</i> cDNA 665-682	GTCTCCTCGACCTAGAGG
Rap2-dw8	<i>emrap2</i> cDNA 526-547	GAGATTCTAGTAAATGGTAAAG
Rap2-dw9	<i>emrap2</i> cDNA 549-568	GTGCATGTTGGAGATTCTTG
Rap2-up	<i>emrap2</i> cDNA 540-519	ATTTACTAGAATCTCCTTGCGG
Rap2-up nest	<i>emrap2</i> cDNA 518-501	TAGAAGTCCTCGATTGTG
Rap2-up4	<i>emrap2</i> cDNA 752-734	GCTGACTTCGAAGTTTTGG
Rap2-up5 (!!!)	<i>emrap2</i> cDNA 426-405	GAGAACAACAACCTTTGTATTG
Rap2-up5 (!!!)	<i>emrap2</i> cDNA 691-672	GATGCACTGCCTCTAGGTCG
Rap2-up6	<i>emrap2</i> cDNA 654-637	GGCAATGCTGTATACGAG
Rap2-up7	<i>emrap2</i> cDNA 598-579	GTGAGGAAAACCTGCTCACTG
Rap2-up8	<i>emrap2</i> cDNA 898-870	GGTCTCTACAAAAGCACAG
TD Rap2 dw	<i>emrap2</i> cDNA 497-521	ACCCCACAATCGAGGACTTCTACCG
TD Rap2 up	<i>emrap2</i> cDNA 520-495	GGTAGAAGTCCTCGATTGTGGGGTTCG

*emrap2* (Schnittstellen)

Rap2 5'-Bam-Hum	<i>emrap2</i> cDNA *400-421	GTAGTAGGATCCAAAAAATGGACGAATACAAAGTTGTTG
Rap2 EcoR1 dw	<i>emrap2</i> cDNA *400-418	GCTTTTGAATTCATGGACGAATACAAAGTTG
Rap2-3' BAM	<i>emrap2</i> cDNA *1002-980	CAGGCCGGATCCTCAGAGGATAGCACAGGCTCCAG

### 5.20.6 emrap2 (Map)





## 5.21 EmRas

### 5.21.1 EmRas: Material und Methoden

Sämtliche molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden finden sich in den Kapiteln 5.1 - 5.13. Die verwendeten Organismen und deren Kultivierung ist in den Kapiteln 5.6 - 5.12 beschrieben. Für Computeranalysen wurden die Programme und Methoden aus Kapitel 5.1 verwendet.

#### Klonierung der *emras* cDNA und des chromosomalen Locus:

Die *emras*-cDNA wurde über eine degenerative PCR aus einer Plasmid-cDNA-Bank (hergestellt von K. Huber [158]) isoliert. Dafür wurde aus dem, in Ras-ähnlichen kleinen Proteinen hoch konservierten, Aminosäure-Sequenzmotiv MRDQYMR der degenerierte Primer Ras-C1 (5'-CG-CATRTAYTGRTCNCKCAT-3', R = Purin, Y = Pyrimidin, K = G + T, N = alle Nucleotide, *emras* cDNA: 227-247, EmRas Proteinsequenz: MRDQYMR) abgeleitet. Mit diesem Primer, der Richtung 5'-Ende liest und dem Vektor-spezifischen Primer JG4-5 dw (5'-CTCCCGAATTCGG-CACGAG-3') wurde dann die degenerative PCR durchgeführt (30 Zyklen; 1' - 94°C, 2' - 54°C, 2' - 72°C). Dabei wurde ein 230 bp langes Fragment amplifiziert, in pTOPO-TA kloniert und sequenziert, dass eine hohe Homologie zu den 5'-Sequenzen bekannter Ras-cDNAs unterschiedlicher phylogenetischer Ursprünge besitzt. Mit dem aus dieser Sequenz abgeleiteten Primer Ras-5' (5'-ATGCCTGAGTACAAACTCG-3', *emras* cDNA: 29-37) und dem Primer CD3 (5'-ATCTCTT-GAAAGGATCCTGCA-3') und nachfolgend für die nested-PCR mit den Primern Ras-dw nest (5'-GACGATCCAGCT TATCCAG-3', *emras* cDNA: 85-103) und CD3 nest (5'-TCTCTT-GAAAGGATCCTGCAAGGT-3') wurde dann aus *E. multilocularis*-cDNA über eine 3'-RACE das fehlende 3'-Ende der cDNA amplifiziert, in TOPO-TA kloniert und sequenziert. Das vollständige Leseraster von *emras* wurde dann über PCR mit den Primern Ras-5' (5'-ATGCCTGAGTACAAACTCG-3', *emras* cDNA: 29-37) und Ras-3' (5'-CAGCAGATGGCA TTTCCTC-3', *emras* cDNA: 580-562) aus *E. multilocularis*-cDNA amplifiziert, in TOPO-TA kloniert und sequenziert.

Der chromosomale Locus von *emras* konnte nur teilweise bestätigt werden. Die gesamte bisher bekannte 676 bp lange N-terminale chromosomale Sequenz konnte in zwei überlappenden Fragmenten über PCR auf chromosomale DNA von *E. multilocularis* mit den Primerkombinationen für **F1**: Ras-chr-dw2 (5'-GGTACCATTGTACTAAACAAAATG-3', *emras* cDNA: 8-31) × Ras-up2 (5'-GCACCTCATCTGCGTCTTTG-3', *emras* cDNA: 356-337) und für **F2**: Ras-dw3 (5'-GTCAAAGACGCAGATGAGGTG-3', *emras* cDNA: 335-355) × Ras-up3 (5'-GTCCTCAACACCTTGACGG-3', *emras* cDNA: 490-472) amplifiziert werden. Zahlreiche Versuche das fehlende 3'-Ende des chromosomalen Locus von *emras* mit diversen DNA-Polymerasen, unterschiedlichen Primerkombinationen und/oder verschiedenen Versuchsbedingungen zu amplifizieren waren bisher erfolglos.

#### Stadienspezifische Expression: RT-PCR

Um die Expression von *emras* während einer Infektion des Zwischenwirts (*M. unguiculatus*) und in den verschiedenen Larvenstadien zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA (vergl. 5.3.1) aus *in vitro* und *in vivo* kultiviertem Echinokokken-Larvenmaterial (vergl. 5.9.3 + 5.10.1) isoliert und mit dem Omniscript RT-Kit (Qiagen) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (vergl. 5.3.5). Jeweils 2 µl dieser cDNAs wurden dann mit den Primern Ras-5' (5'-ATGCCTGAGTACAAACTCG-3', *emras* cDNA: 29-47) und Ras-3'mod (5'-GAGCAGATGGCATTTCCTCTTG-3', *emras* cDNA: \*579-559) in einer PCR amplifiziert (30 Zyklen: 94°C - 30", 57°C - 30", 72°C - 30", Größe: ~550 bp), in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

#### Echinokokkenspezifischer Nachweis

Für den Nachweis das *emras* ein Echinokokkenfaktor ist, wurde aus *in vitro* kultivierten Metacystodenesvesikeln (vergl. 5.10.1) und der Leber eines uninfizierten Gerbils (*M. unguiculatus*) mit dem DNeasy Kit (Qiagen) chromosomale DNA isoliert. Mit jeweils 1 µl (1:100 verdünnt) dieser DNAs als Template wurden PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") durchgeführt, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Echinokokken-spezifischen Primer für *emras* waren Ras-5'mod (5'-GTGCCTGAGTACAAACTCG-3', *emras* cDNA: \*30-47) × Ras-up2 (5'-GCACCTCATCTGCGTCTTTG-3', *emras* cDNA: 356-337), die ein PCR-Produkt von ~450 bp ergaben. Für die Gerbil-spezifische PCR wurden die Primer Tub12up (5'-CC-CCAAGTGTATGATACTGG-3') und Tub12ST (5'-CTGGGCAGTGCGGCAACCA-3') eingesetzt, die im Gen für β-Tubulin [46] von *M. unguiculatus* binden und ein Produkt von ~1.1 kbp ergaben.

### **Expression in *E.coli* und GTP-Bindung:**

Für die rekombinante Expression wurde die codierende Sequenz von *emras* über PCR mit den Primern Ras-5'mod (5'-GTGCCTGAGTACAAACTCG-3', *emras* cDNA: \*30-47) × Ras-3'mod (5'-GAGCAGATGGCATTTCCTCTTG-3', *emras* cDNA: \*579-559) amplifiziert, in den Vektor pBAD/THIO-TOPO (Invitrogen) kloniert und anschließend sequenziert. Das Expressionsplasmid, in dem *emras* N-terminal mit einem Thioredoxin und C-terminal mit einem V5-Antikörperperitop und einem 6×His-Tag fusioniert ist, wurde wie unter 5.6.5 beschrieben in *E.coli*-TOP10 Zellen für 3 Stunden unter Zugabe von 0.2% Arabinose rekombinant exprimiert. Die Zelllysate wurden in einem 12.5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Für den Nachweis im Western Blot wurde der anti-V5 Antikörper (Invitrogen) 1:5000 eingesetzt. Der GTP-Bindungsassay wurde wie in Kapitel (vergl. 5.5.10) beschrieben durchgeführt [170].

### **Prenylierung von rekombinant exprimiertem EmRas in Kaninchen-Reticulocytenextrakt und Echinokokken-Lysat:**

Die codierende Sequenz von *emras* wurde mit den Primern Ras-5'mod (5'-GTGCCTGAGTACAAACTCG-3', *emras* cDNA: \*30-47) × Ras-3'-Bam (5'-ATCGCAGGATCCCTAAGCAGATGGCATTTCCTC-3', *emras* cDNA: \*583-562) aus cDNA amplifiziert und in den Vektor pBAD-Thio (Invitrogen) kloniert, wobei eine N-terminale Fusion von EmRas mit Thioredoxin entstand. Das Fusionsprotein wurde nach Anleitung (Invitrogen) in *E.coli* exprimiert, das resultierende Zellpellet in Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EGTA und Protease Inhibitor Cocktail von Roche) unter Verwendung des Fast Prep Purification Systems mit Lysing Matrix B (beides Qbiogene) lysiert (vergl. 5.5.4) und daraus dann das rekombinante Fusionsprotein mit dem Anti-Thioredoxinantikörper (Invitrogen) über G-Agarose (Upstate) immunpräzipitiert (vergl. 5.5.9). Das immunpräzipitierte Protein wurde entweder in 60%-igem Kaninchen-Reticulocytenextrakt (Promega) oder in Echinokokken-Lysat (vergl. 5.9.5), in Gegenwart von 1mM GTP und 4µCi [<sup>3</sup>H] markiertem Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Pyrophosphat für 4 Stunden bei 32°C inkubiert (vergl. 5.5.13). Die Reaktionen wurden über ein 15% PAA-Gel aufgetrennt, das Gel fixiert (2-Propanol/H<sub>2</sub>O/Eisessig, 25:65:10), mit Amplify (Amersham) behandelt, getrocknet und für acht Tage auf einen Röntgenfilm gelegt.

### ***In vivo* Komplementation in Hefen:**

Die *in vivo* Komplementation einer Hefe-*ras2Δ*-Mutante durch *emras* wurde nach einem schon beschriebenen Assay für invasives Wachstum [217] von S. Brückner und H.-U. Mösch an der Phillips-Universität in Marburg durchgeführt. Dazu wurde das *emras*-Leseraster mit den Primern Ras5'-Bam-HUM (5'-GTAGTAGGATCCAAAAAATGCCTGAGTACAAACTCG-3', *emras* cDNA: \*29-47) und Ras up-Bam (5'-ATCGCAGGATCCCTACAGCAGATGGCATTTCCTC-3', *emras* cDNA: 583-562) aus cDNA amplifiziert und über die BamH1-Schnittstelle in das Plasmid pRS426 (pB3386) kloniert. Das resultierende Plasmid, in dem *emras* unter der Kontrolle eines Galactose-induzierbaren Promotors exprimiert wird, wurde pB3386-Ras3 (im Paper: pMSHUM-EmRas [297]) genannt. Für den Versuch wurden dann von S. Brückner und H.-U. Mösch die Plasmide

pRS426-GAL1 und pMSHUM-EmRas gemeinsam mit den Plasmiden pRS316-RAS2 und pRS316-RAS2<sup>val196</sup> [217] in den Hefe-*ras2Δ* mutierten Hefestamm YHUM 120 [217] transformiert. Wachstums- und invasive Wachstums-Assays wurden, wie vorher beschrieben [217], ausgeführt.

#### **Antikörper: Western Blot und Immunhistochemie:**

Für die Erkennung von EmRas in Echinokokken-Material wurde ein polyklonaler Kaninchen- $\alpha$ Ras-Antikörper (StressGen) verwendet, der gegen einen, zwischen EmRas und Säugetier-Ras hoch konservierten, Bereich gerichtet ist. Für den Western Blot wurden das oben beschriebene, über Immunpräzipitation (vergl. 5.5.9) aufgereinigte Thioredoxin-EmRas-Fusionsprotein (s.o.), Lysat von *in vitro* kultivierten Metacestodenvesikeln (vergl. 5.9.5) und Lysat von frisch isolierten Protoscolices (vergl. 5.9.5) in einem 12.5% PAA-Gel nach der Größe aufgetrennt (vergl. 5.5.1), und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (vergl. 5.5.3). Mit dem Erstantikörper  $\alpha$ Ras (1  $\mu$ g/ml) und dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper  $\alpha$ -Kaninchen IgG (Jackson Immuno Research) wurde dann das rekombinant exprimierte und das immunpräzipitierte EmRas detektiert.

Die Immunhistochemie wurde von Dennis Tappe durchgeführt. Aus mit *E. multilocularis* infizierten Rennmäusen (*M. unguiculatus*) wurden die mit Echinokokken-Gewebe durchzogenen Lebern entfernt, in Einfriermedium (TissueTec; Sakura) gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Mit einem Kryotom wurden 5  $\mu$ m starke Gefrierschnitte hergestellt, auf silikonisierte Objektträger, in Aceton für 10 min bei -20°C fixiert und dann an der Luft getrocknet. Die trockenen Proben wurden in PBS rehydriert und die endogenen Peroxidasen dann durch eine 20 minütige Inkubation in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in Methanol) inaktiviert. Nach einmaligem Waschen in PBS für 5 min wurden die Proben 1 Stunde bei RT in PBS mit 5% Ziegen Serum geblockt (Blockierungspuffer). Nach einem weiteren 5 minütigen Waschschriff in PBS wurden auf jeden Objektträger 200  $\mu$ l des ersten Antikörpers ( $\alpha$ Ras 1:500 in Blockierungspuffer) gegeben und alles bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 mal für je 5 min mit PBS gewaschen, die Proben dann mit dem zweiten Antikörper (Maus- $\alpha$ Hase, Peroxidase konjugiert; Dianova) 1:200 in Blockierungspuffer für 30 min bei RT inkubiert, nach 3 weiteren 5 minütigen Waschschriffen in PBS mit Diaminobenzidin-Reagenz (Serva) entwickelt und dann mit Hematoxilin gegengefärbt.

#### **Yeast-2-Hybrid (Y2H):**

Für die Y2H-Interaktionsversuche (Kapitel Y2H - 5.7.3) von EmRas mit EmRaf mit dem Gal4-basierten MATCHMAKER-System (Clontech) wurde das *emras* Leseraster in einer PCR mit den Primern Ras-dw EcoR1 (5'-GTACTAGAATTCATGCCTGAGTACAAACTCG-3', *emras* cDNA: \*29-47) und Ras up Bam (5'-ATCGCAGGATCCCTACAGCAGATGGCATTTCCTC-3', *emras* cDNA: \*583-562) amplifiziert und das resultierende Fragment über die Schnittstellen EcoR1 und BamH1 in den Vektor pGBKT7 (BD) kloniert (vergl. 5.13.5). Dieser Vektor, der die Bindungsdomäne enthält wurde dann gemeinsam mit einer EmRaf-Fusion (vergl. 5.13.5), die die Aktivierungsdomäne (AD) enthält, in Hefen transformiert. Das Wachstum der Transformanden wurde auf verschiedenen stark selektiven Platten beobachtet. Wachsende Hefen auf selektiven Nährböden deuten auf eine Interaktion der beteiligten AD- und BD-Fusionsproteine hin.

### 5.21.2 *emras* (cDNA)

*emras* cDNA (632 bp), Protein (184 AS, 20.9 kDa, ch +0.17, pl 7.15)

Codierende Sequenz 552 bp, Start ATG bei bp 29, Stop TAG bei bp 580

Intron: I1 nach bp 59 37 bp), I2 nach bp 118 (39 bp), I3 nach bp 137 (35 bp), I4 nach bp 222 (43 bp), weitere Introns sind vermutlich vorhanden, aber noch nicht gefunden.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ATAATAGGGTACCATTTGTAC TAAACAAAATGCTGAGTAC AAACCTGTTGTTGTCGGAGC TGGTGGAGTCGGAAAGAGTG CGCTGACGATCCAGCTTATC 100
CAGAAATCATTTTGTAGATGA GTACGACCCCAACGATTGAGG ATTCCTATAGGAAGCAAGTA AATATTGATGGGGAGACTTG CATGCTTGATATTTCTGGATA 200
CGGCTGGTCAAGAAGAGTAC AGCGCCATGCGTGACCAATA TATCGAACTGGCGAGGGCT TTCTCTGTGTATTTGCTGTT AATAACGCCAAAAGCTTTGA 300
AGACATTAGTCAATACCGCG AACAGATTAACGGGTCAAA GACGCAGATGAGGTGCCAT GGTTTTAATTGGGAACAAGG TAGACCTTGAGTCAGATCA 400
GTCGATTCTACAAAGGCTGA GGCCGTTGCTAAGGCGTACA ACATTCCCTACATTGAAACA TCTGCTAAAACCCGTCAGG TGTGAGGACGCATTTTCA 500
CTCTTGTTCGAGAAATCCGC AAATTTAAGGAAAGGGGAAA CGAGAAGAAAAGCGCGCA AGAGGAAATGCCATCTGCTG TAGTGTGGGTGCGATTACAT 600
TGACAAACTGTGCCACGGTG GAGTGACAGACA

```

### 5.21.3 EmRas (Proteinsequenz)

184 AS, 20.9 kDa, ch +0.17, pl 7.15

```

      10      20      30      40      50
      |-----|-----|-----|-----|
MPEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVNIDGET
CMLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAVNNAKSF EDISQYREQI 100
KRVKDADEVP MVLIGNKVDL AVRSVDSTKA EAVAKAYNIP YIETSAKTRQ
GVEDAFFTLV REIRKFKERG NEKKKRGKRK CHLL 200

```

### 5.21.4 *emras* (chromosomaler Locus)

Die Charakterisierung des chromosomalen Locus gestaltete sich schwierig, daher ist nur der N-Terminus bestätigt. Der C-Terminus ab bp 676 (cDNA ab bp 492) ist unbestätigt.

Chromosomaler Locus: 676 bp, Start ATG: bp 22, Stop TAG: nicht vorhanden

Exons sind fett hervorgehoben: E1 (52 bp, 1-52), E2 (50 bp, 90-139), E3 (29 bp, 178-206), E4 (84 bp, 242-325), E5 über 306 bp, ab 370)

Introns: I1 (37 bp, 53-89), I2 (39bp, 140-177), I3 (35 bp, 206-241), I4 (43 bp, 326-369)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GGTACCATTGTAATAACAA AATGCCTGAGTACAACTCG TTGTTGTCGGAGGTAATATT ACTGTTTTCTATGCGCTTTC GCTGCTTAGCTGGTGGAGTC 100
GGAAAGAGTGCCTGACGAT CCAGCTTATCCAGAATCAGT AAGATATTTTATATTATTA AATTATCCCTAAACAGTTT TGTAGATGAGTACGACCCAA 200
CGATTGGTGAGTTATTTTG CCTGCTAATTTGTTGGTTGCA GAGGATTCCCTATAGGAAGCA AGTAAATATTGATGGGGAGA CTGTCATGCTTGATATTCG 300
GATACGGCTGGTCAAGAAGA GTACAGGTATGTTATTGCCT CTATCGTCTTTTAACTGTC CACTTTCAGCGCCATGCGTG ACCAATATATCGCAACTGGC 400
GAGGGCTTCTCTGTGTATT TGCTGTTAATAACGCCAAA GCTTTGAAGACATTAGTCAA TACCGCGAACAGATTAACG GGTCAAAGACGCAGATGAGG 500
TGCCCATGGTTTGTAAAGTTC CCTGTAGATTTCCCTAGAGT CTTCCTTAAGTAATTTGGGAA CAAGGTAGACCTTGCAAGTCA GATCAGTCGATTTCTACAAA 600
GCTGAGGCGCTTGCTAAGGC GTACAACATTCCCTACATTTG AAACATCTGCTAAAACCCGT CAAGGTGTTGAGGACG 676

```

## 5.21.5 emras (Map)

ATAATAGGGTACCATTGTAATAACAAAATGCCTGAGTACAACTCGTTGTTGTCTGGAGCTGGTGGAGTCGGAAAGAGTGCCTGACGATCCAGCTTATC	100
TATTATCCCATGGTAACATGATTGTTTACGGACTCATGTTTGAGCAACAACAGCCTCGACCACCTCAGCCTTCTCACGGACTGCTAGGTCGAATAG	
M P E Y K L V V V G A G G V G K S A L T I Q L I	24
CAGAATCATTTTGTAGATGAGTACGACCCAACGATTGAGGATTCCTATAGGAAGCAAGTAAATATTGATGGGGAGACTTGCATGCTTGATATCTGGATA	200
GTCTTAGTAAACATCTACTCATGCTGGGTGCTAACTCCTAAGGATATCCTTCGTTTCATTATAACTACCCCTCTGAACGTACGAACTATAAGACCTAT	
Q N H F V D E Y D P T I E D S Y R K Q V N I D G E T C M L D I L D	57
CGGCTGGTCAAGAAGAGTACAGCGCCATGCGTGACCAATATATGCGAACTGGCGAGGGCTTCTCTGTGTATTGCTGTAAATAACGCCAAAAGCTTGA	300
GCCGACCAGTTCTTCTCATGTCTGGGTACGCACTGGTTATATACGCTTGACCCTCCCGAAAGAGACACATAAAGACAATTATTGCGGTTTTTCGAAACT	
T A G Q E E Y S A M R D Q Y M R T G E G F L C V F A V N N A K S F E	91
AGACATTAGTCAATACCGCAACAGATTAAACGGGTCAAAGACGAGATGAGGTGCCCATGGTTTTAATTGGGAACAAGGTAGACCTTGCAGTCAGATCA	400
TCTGTAATCAGTTATGGCGCTTGCTAATTTGCCAGTTTCTGCGTCTACTCCAGGGTACCAAAATTAACCCTTGTTCCATCTGGAACGTCAGTCTAGT	
D I S Q Y R E Q I K R V K D A D E V P M V L I G N K V D L A V R S	124
GTCTGATTCTACAAAGGCTGAGGCCGTTGCTAAGGCGTACAACATTCCTTACATTGAAACATCTGCTAAAACCCGTCAGGTGTTGAGGACGCATTTTTCA	500
CAGCTAAGATGTTTCCGACTCCGGCAACGATTCCGCATGTTGTAAGGGATGTAACCTTGTAGACGATTTTGGGCAGTTCACAACCTCCGCTAAAAAGT	
V D S T K A E A V A K A Y N I P Y I E T S A K T R Q G V E D A F F	157
CTCTGTTCGAGAAATCCGCAAATTTAAGGAAAGGGAAACGAGAAGAAAAGCGCGGCAAGAGGAAATGCCATCTGCTGTAGTGTGGGTGCGATTACAT	600
GAGAACAGCTCTTTAGGCGTTTAAATTCCTTCCCTTTGCTCTCTTTTTCGCGCCGTTCTCCTTTACGGTAGACGACATCACACCCACGCTAATGTA	
T L V R E I R K F K E R G N E K K K R G K R K C H L L .	184
TGACAAACTGTGCCACGGTGGAGTGACAGACA	632
ACTGTTTGACACGGTGCCACCTCACTGTCTGT	

### 5.21.6 *emras* (Oligonucleotide)

#### *emras* Oligonucleotide (cDNA)

Ras 3'	<i>emras</i> cDNA 580-562	CAGCAGATGGCATTTCCTC
Ras 3' neu mod	<i>emras</i> cDNA *579-559	GAGCAGATGGCATTTCCTCTTG
Ras 5'	<i>emras</i> cDNA 29-47	ATGCCTGAGTACAAACTCG
Ras 5' mod	<i>emras</i> cDNA *30-47	GTGCCTGAGTACAAACTCG
Ras C1	<i>emras</i> cDNA 246-227	CGCATATATTGGTCACGCAT
Ras ch dw	<i>emras</i> cDNA 1-17	ATAATAGGGTACCATTG
Ras chr dw2	<i>emras</i> cDNA 8-31	GGTACCATTGTACTAAACAAAATG
Ras chr up 3'-2	<i>emras</i> cDNA 613-592	GCACAGTTTGTCAATGTAATCG
Ras dw	<i>emras</i> cDNA 29-47	ATGCCTGAGTACAAACTCG
Ras dw nest	<i>emras</i> cDNA 85-103	GACGATCCAGCTTATCCAG
Ras dw10	<i>emras</i> cDNA 537-556	GAAACGAGAAGAAAAAGCGC
Ras dw3	<i>emras</i> cDNA 335-355	GTCAAAGACGCAGATGAGGTG
Ras dw4	<i>emras</i> cDNA 474-491	GTCAAGGTGTTGAGGACG
Ras dw6 mod	<i>emras</i> cDNA *443-364	GATTCCCTACATTGAAACATCAG
Ras dw7 mod	<i>emras</i> cDNA *386-404	GCTTGCAGTCAGATCAGTCG
Ras dw8 mod	<i>emras</i> cDNA *501-519	GCTCTTGTTCGAGAAATCCG
Ras dw9	<i>emras</i> cDNA 512-530	GAAATCCGCAAATTTAAGG
Ras up2	<i>emras</i> cDNA 356-337	GCACCTCATCTGCGTCTTTG
Ras up3	<i>emras</i> cDNA 490-472	GTCTCAACACCTTGACGG
Ras up4	<i>emras</i> cDNA 528-509	GGATTTCTCGAACAAGAGTG
Ras up5	<i>emras</i> cDNA 535-516	CCTTTCCTTAAATTTGCGGA
Ras up6	<i>emras</i> cDNA 554-535	GCTTTTTCTTCTCGTTTCCC
Ras-up-seq 3'	<i>emras</i> cDNA 620-614	CACCGTGGCACAGTTTG

#### *emras* Oligonucleotide (Schnittstellen)

Ras up Pst	<i>emras</i> cDNA *580-562	GCACCCCTGCAGCAGCAGATGGCATTTCCTC
Ras up-BAMM1	<i>emras</i> cDNA *583-562	ATCGCAGGATCCCTACAGCAGATGGCATTTCCTC
Ras dw EcoR1	<i>emras</i> cDNA *29-47	GTA TAGAATT CATGCCTGAGTACAAACTCG
Ras 5' Bam HUM	<i>emras</i> cDNA *29-47	GTAGTAGGATCCAAAAAATGCCTGAGTACAAACTCG

#### *emras* degenerierte Oligonucleotide

Ras-C1	CGCATRTAYTGRTCXCKCAT
Ras-C2	TTCATGTAYARRTCXCKCAT
Ras-N1	GGTGGTGTGGXAARTCXGC
Ras-N2	GGTGGTGTGGXAARAGYGC
Ras-SPC1	CATGGCWGARTAYTCYTCYTG
Ras-SPC2	CATGGCRCTRAYTCYTCYTG

## 5.22 Em1433-2

### 5.22.1 Em1433-2: Material und Methoden

Sämtliche molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden finden sich in den Kapiteln 5.1 - 5.13. Die verwendeten Organismen und deren Kultivierung ist in den Kapiteln 5.6 - 5.12 beschrieben. Für Computeranalysen wurden die Programme und Methoden aus Kapitel 5.1 verwendet.

#### Klonierung der *em1433-2* cDNA und des chromosomalen Locus:

Da die Amplifikation des schon bekannten *em1433-1* [277] aus unseren cDNA-Präparationen misslang, konnte die *em1433-2* cDNA, die einen alternativen 5'-Terminus besitzt, über eine 5'-RACE mit den Primern 1433-up (5'-TTAGGAGTCGGTCTCACACTCG-3', *em1433-2* cDNA: 479-461) und JG4-5-dw (5'-GATGCCTCCTACCCTTATGATG-3') aus einer Plasmid-cDNA-Bank (hergestellt von K. Huber [158]) isoliert werden. Das vollständige Leseraster von konnte mit den Primern 1433-2-5' (5'-TTAGGAGTCGGTCTCACACTCG-3', *em1433-2* cDNA: 17-37) und 1433-2-3' (5'-GGAGTCGGTCTCACACTCGG-3', *em1433-2* cDNA: 760-741) amplifiziert werden.

Der chromosomale Locus von *em1433-2* konnte in drei überlappenden Fragmenten über PCR aus chromosomaler DNA von *E. multilocularis* mit den Primerkombinationen für **F1**: 1433-chr-dw1 (5'-GCTGTTGGTTTTCTGAAATG-3', *em1433-2* cDNA: 1-20) × 1433-up2 (5'-GCAACGGATAGCAAGTTGCG-3', *em1433-2* cDNA: 195-175), für **F2**: 1433-dw (5'-GAGCTTAACAACGAGGAG-3', *em1433-2* cDNA: 158-175) × 1433-2-3' (5'-GGAGTCGGTCTCACACTCGG-3', *em1433-2* cDNA: 760-741) und für **F3**: 1433-dw2 (5'-GTACTTCATCATGCAGCTG-3', *em1433-2* cDNA: 693-712) × 1433-chr.up (5'-GTGTTTTACAAGATGAAGCG-3', *em1433-2* cDNA: 864-845) amplifiziert werden.

#### Echinokokkenspezifischer Nachweis

Für den Nachweis das *em1433-2* ein Echinokokkenfaktor ist, wurde aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskelen (vergl. 5.10.1) und der Leber eines uninfizierten Gerbils (*M. unguiculatus*) mit dem DNeasy Kit (Qiagen) chromosomale DNA isoliert. Mit jeweils 1 µl (1:100 verdünnt) dieser DNAs als Template wurden PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 30") durchgeführt, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Echinokokken-spezifischen Primer für *em1433-2* waren 1433-chr-dw1 (5'-GCTGTTGGTTTTCTGAAATG-3', *em1433-2* cDNA: 1-20) × 1433-up (5'-CTGTTGACTTGTCATTCTG-3', *em1433-2* cDNA: 479-461), die ein PCR-Produkt von 523 bp ergaben. Für die Gerbil-spezifische PCR wurden die Primer Tub12up (5'-CCCCAAGTGTATGATACTGG-3') und Tub12ST (5'-CTGGGCAGTGCGGCAACCA-3') eingesetzt, die im Gen für β-Tubulin [46] von *M. unguiculatus* binden und ein Produkt von ~ 1.1 kbp ergaben.

#### RT-PCR: Expression von *em1433-2* in Zyste und Protoscolex

Um die Expression von *em1433-2* während einer Infektion des Zwischenwirts (*M. unguiculatus*) und in den verschiedenen Larvenstadien zu untersuchen, wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) die Gesamt-RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestodeneskelen (vergl. 5.10.1), *in vivo* kultiviertem Gesamtlarvenmaterial (vergl. 5.9.3), *in vivo* kultivierten Protoscolices (vergl. 5.9.6) und *in vivo* kultivierten sowie aktivierten (vergl. 5.9.6) Protoscolices isoliert und mit dem SMART II cDNA Synthesis Kit (BD-Biosciences) in cDNA umgeschrieben. Jeweils 1 µl dieser cDNAs wurde dann für die PCRs (30 Zyklen: 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 1') eingesetzt. Der Nachweis (Größe:

760 bp) von *em1433-2* erfolgte über eine Amplifikation mit den Primern 1433-2-5' mod (5'-GTGG-CAGCTATCACCTCTTGG-3', *em1433-2* cDNA: \*17-37) und Rap1-up1 (5'-TTAGGAGT-CGGTCTCACACTCG-3', *em1433-2* cDNA: 763-742). Die PCR-Produkte wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

### Yeast-2-Hybrid (Y2H):

Für die Y2H-Interaktionsversuche (Kapitel Y2H - 5.7.3) von Em14-3-3.2 mit EmRaf in dem Gal4-basierten MATCHMAKER-System (Clontech) wurde das *em14-3-3.2* Leseraster in einer PCR mit den Primern 1433-5'-EcoR1-dw (5'-TGGTTTGAATTCATGGCAGCTATCACCTCTTGG-3', *em14-3-3.2* cDNA: \*17-37) und 1433-up-BamH1 (5'-CGGCCCGGATCCTTAGGAGTCGGTCTCACACTCG-3', *em14-3-3.2* cDNA: \*763-742) amplifiziert und das resultierende Fragment über die Schnittstellen EcoR1 und BamH1 in die Vektoren pGBKT7 (BD) und pGADT7 (AD) kloniert (vergl. 5.13.5). Der Vektor, der die Bindungsdomäne enthielt wurde gemeinsam mit einer EmRaf-Fusion (vergl. 5.13.5), die die Aktivierungsdomäne (AD) enthielt, in Hefen transformiert. In weiteren Ansätzen wurde das Em14-3-3.2-AD-Konstrukt gemeinsam mit dem Em14-3-3.2-BD-Konstrukt in Hefen transformiert. Das Wachstum der Transformanden wurde auf verschiedenen stark selektiven Platten beobachtet. Wachsende Hefen auf selektiven Nährböden deuten auf eine Interaktion der beteiligten AD- und BD-Fusionsproteine hin.

### 5.22.2 *em1433-2* (cDNA)

*em1433-2* cDNA (937 bp), Protein (248 AS, 27.8 kDa, ch -11.84, pl 4.71)

Codierende Sequenz 744 bp, Start ATG bei bp 17, Stop TAA bei bp 711

Intron: I1 nach bp 346 (43 bp), I2 nach bp 730 (42 bp)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CTGTTGGTTTCTGAAATGG CAGCTATCACCTCTTGGATT ACGGATAGTGGGTGCAAGGA TCATGCTTCTCTTGTCTCCA TAGCAAAGTTGGCCGAACAG 100
GCCGAGCGTTATGAGGATAT GGCTGTGCGCCATGAAAACCA TTGCCGAGATGGGCAATGAG CTTAACAACGAGGAGCGCAA CTTGCTATCCGTTGCGTACA 200
AAAATGTAGTCGGGGCTCGT CGTTCATCGTGGAGAATAAT GTCTAGTATCGCTAAGAAGC AGGCTGGCACTCCGCTTGCT GATCAGACGGACATTTACCT 300
TAAGAAGTGGAGGAAGAAT TGACCAAAATCTGCAACGAT GTTCTGGCCCTCCTTTCGAA GAATTTAATCACGGAGAAAA TTGGTGCTGAAGCAAAGATT 400
TTCTACTACAAGATGATGGG TGATTACTATCGCTACTTGG CGGAAGTTCAGGAGGGTGAA CAGAATGACAAGTCAACAGA GGCTGCTGAGGAGGCGTATC 500
AAAAGGCTACCTCACTTGCT GAGGCGGAGCTCTCAGTCAC TCATCCAATTCGACTTGGGC TGGCGCTCAACTTCTCCGTC TTCTACTATGAGATTAAGAAA 600
TATGCCCGAGAAAGCCTGTT CACTAGCCAAAGCGGCTTTC GATGCTGCCATTACAGAGGT GGACTCGATCAAAGATGAGA CGTACAAGGATAGTACTCTC 700
ATCATGCAGCTGTTGCGTGA TAATCTGACGCTCTGGAACT CCGAGTGTGAGACCCGACTCC TAAACCCCGGGCCGTCTTT TCTGCTGTCGTTGTTCTGAT 800
TGAGCAAAAATTACAACAA TGGTTGCGTTGGTCTCATT GTTTCGCTTTCATCTGTAAA AACTACTACTAATACTTGC TTCGTTTATCCCAAAGATA 900
AATCTATTATAGTTAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 937

```

### 5.22.3 Em1433-2 (Proteinsequenz)

(248 AS, 27.8 kDa, ch -11.84, pl 4.71)

```

      10      20      30      40      50
|||||  |||||  |||||  |||||  |||||
MAAITSWITD SGCKDHASLV SIAKLAEQAE RYEDMAVAMK TIAEMGNELN
NEERNLLSVA YKNVVGARRS SWRIMSSIAK KQAGTPLADQ TDIYLKQVEE 100
ELTKICNDVL ALLSKNLITE KIGAEAKIFY YKMMGDYRY LAEVQEGEQN
DKSTEAEEEA YQKATSLAEA ELSVTHPIRL GLALNFSVYF YEIKNMPEKA 200
CSLAKAAFDA AITEVDSIKD ETYKDSTLIM QLLRDNLTLW NSECETDS

```



### 5.22.4 em1433-2 (chromosomaler Locus)

Chromosomaler Locus: 951 bp, Start ATG: bp 17, Stop TAA: bp 850

Exons sind fett hervorgehoben: E1 (346 bp, 1 - 346), E2 (384 bp, 390 - 774),

E3 (133 bp, 818– 951)

Introns: I1 (43 bp, 347 - 883), I2 (42 bp, 775 -817)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
CTGTTGGTTTTCTGAAATGG	CAGCTATCACCTCTTGGATT	ACGGATAGTGGGTGCAAGGA	TCATGCTTCTTGTCTCCA	TAGCAAAGTTGGCCGAACAG							100
GCCGAGCGTTATGAGGATAT	GGCTGTCGCCATGAAAACCA	TTGCCGAGATGGGCAATGAG	CTTAACAACGAGGAGCGCAA	CTTGCTATCCGTTCGTACA							200
AAAATGTAGTCGGGGCTCGT	CGTTCATCGTGGAGAATAAT	GTCTAGTATCGCTAAGAAGC	AGGCTGGCACTCCGCTTGCT	GATCAGACGGACATTTACCT							300
<b>TAAGAAGTGGAGGAAGAAT</b>	<b>TGACCAAAATCTGCAACGAT</b>	<b>GTTCTGGTAGGCGTATCACT</b>	GCCGTTGTGTTTTATTTTAT	AATTTTTTAGGCCCTCCTTT							400
CGAAGAATTTAATCACGGAG	AAAATTGGTGTGAAGCAAA	GATTTTCTACTACAAGATGA	TGGGTGATTACTATCGCTAC	TTGGCGGAAGTTCAGGAGGG							500
TGAACAGAATGACAAGTCAA	CAGAGGCTGCTGAGGAGGCG	TATCAAAGGCTACCTCACT	TGCTGAGGCGGAGCTCTCAG	TCACTCATCCAATTCGACTT							600
GGGCTGGCGCTCAACTTCTC	CGTCTTCTACTATGAGATTA	AAAATATGCCCTAGAAAGCC	TGTTCACTAGCCAAAGCGGC	TTTCGATGCTGCCATTACAG							700
AGGTGGACTCGATCAAAGAT	GAGACGTACAAGGATAGTAC	TCTCATCATGCAGCTGTTGC	<b>GTGATAATCTGACGGTAGGT</b>	TAAACTTTTGTCTCTGAAAT							800
AACTATCTTTCCTTTAGCTC	<b>TGGAACTCCGAGTGTGAGAC</b>	<b>CGACTCCTAAACCCCGGGGC</b>	CGTCTTTTCTGCTGCTGCTGG	TTCTGATTGAGCAAAAAT							900
ACAACAATGGTTGCATTGGT	TCTCATTGTTTCGCTTCATC	TTGTAAACAC									1000

### 5.22.5 em1433-2 (Oligonucleotide)

*em1433-2* Oligonucleotide (cDNA)

1433-2-3'	<i>em1433-2</i> cDNA 760-741	GGAGTCGGTCTCACACTCGG
1433-2-5'	<i>em1433-2</i> cDNA 17-37	ATGGCAGCTATCACCTCTTGG
1433-2-5'-mod	<i>em1433-2</i> cDNA *17-37	GTGGCAGCTATCACCTCTTGG
1433-3' up	<i>em1433-2</i> cDNA 763-742	TTAGGAGTCGGTCTCACACTCG
1433-3'-nostop-up	<i>em1433-2</i> cDNA 760-742	GGAGTCGGTCTCACACTCG
1433-5' dw	<i>em1433-2</i> cDNA 17-37	ATGGCAGCTATCACCTCTTGG
1433-chr dw1	<i>em1433-2</i> cDNA 1-20	GCTGTTGGTTTTCTGAAATG
1433-chr up1	<i>em1433-2</i> cDNA 864-845	GTGTTTTACAAGATGAAGCG
1433-dw	<i>em1433-2</i> cDNA 158-175	GAGCTTAACAACGAGGAG
1433-dw2	<i>em1433-2</i> cDNA 693-712	GTACTCTCATCATGCAGCTG
1433-up	<i>em1433-2</i> cDNA 479-461	CTGTTGACTTGTCATTCTG
1433-up2	<i>em1433-2</i> cDNA 195-175	GCAACGGATAGCAAGTTGCG
331-dw	<i>em1433-2</i> cDNA 569-592	AACTTCTCCGCTTCTACTATGAG
IG-178 C	<i>em1433-2</i> cDNA 348-331	GCCAGAACATCGTTGCAG

*em1433-2* Oligonucleotide (Schnittstellen)

1433 up-BamH1	<i>em1433-2</i> cDNA 763-742	CGGCCCGGATCCTTAGGAGTCGGTCTCACACTCG
1433-2-5'-Bam-Hum	<i>em1433-2</i> cDNA *17-37	GTAGTAGGATCCAAAAAATGGCAGCTAT- CACCTCTTGG
1433-5'-EcoR1	<i>em1433-2</i> cDNA *17-37	TGGTTTGAATTCATGGCAGCTATCACCTCTTGG
1433-up-PST1	<i>em1433-2</i> cDNA 763-742	CGGCCCTGCAGTTAGGAGTCGGTCTCACACTCG
1433-dw-EcoR1	<i>em1433-1</i> cDNA, (cDNA [289])	TTTTTTGAATTCATGAGCAGACTCGCTGAATG
1433-dw2-EcoR1	<i>em1433-1</i> cDNA, (cDNA [289])	EcoR1-GAATTCATGAGCAGACTCGCTGAA
Y2H-1433-1-DW, (EcoR1)	<i>em1433-1</i> cDNA, (cDNA [289])	GTAGTAGAATTCATGAGCAGACTCGCTGAATG

5.22.6 em1433-2 (Map)

CTGTTGGTTTTCTGAAATGGCAGCTATCACCTCTTGGATTACGGATAGTGGGTGCAAGGATCATGCTTCTCTTGTCTCCATAGCAAAGTTGGCCGAACAG  
 100  
 GACAACCAAAGACTTTACCGTCGATAGTGGAGAACCTAATGCCTATCACCCACGTTCTTAGTACGAAGAGAACAGAGGTATCGTTTCAACCGCTTGTC  
 M A A I T S W I T D S G C K D H A S L V S I A K L A E Q  
 28  
 GCGGAGCGTTATGAGGATATGGCTGTCGCCATGAAAACCATTGCCGAGATGGGCAATGAGCTTAACAACGAGGAGCGCAACTTGCTATCCGTTGCGTACA  
 200  
 CGGCTCGCAACTACTCCTATACCGACAGCGGTACTTTTGGTAACGGCTCTACCCGTTACTCGAATTGTTGCTCCTCGCGTTGAACGATAGGCAACGCATGT  
 A E R Y E D M A V A M K T I A E M G N E L N N E E R N L L S V A Y  
 61  
 AAAATGTAGTCGGGGCTCGTCGTTTCATCGTGGAGAATAATGTCTAGTATCGCTAAGAAGCAGGCTGGCACTCCGCTTGCTGATCAGACGGACATTTACCT  
 300  
 TTTTACATCAGCCCGAGCAGCAAGTAGCACCTCTTATTACAGATCATAGCGATTCTTCGTCGACCGTGAGGCGAACGACTAGTCTGCCTGTAATGGA  
 K N V V G A R R S S W R I M S S I A K K Q A G T P L A D Q T D I Y L  
 95  
 TAAGAAGTGGAGGAAGAATTGACCAAAATCTGCAACGATGTTCTGGCCCTCCTTTCGAAGAATTTAATCACGGAGAAAATGGTGTGAAGCAAAGATT  
 400  
 ATTCTCCACTCCTTCTTAAGTGGTTTAGACGTTGCTACAAGACCGGGAGGAAAGCTTCTTAAATTAGTGCCTCTTTAACCAGACTTCGTTTCTAA  
 K K V E E E L T K I C N D V L A L L S K N L I T E K I G A E A K I  
 128  
 TTCTACTACAAGATGATGGGTGATTACTATCGTACTTGGCGGAAGTTCAGGAGGGTGAACAGAATGACAAGTCAACAGAGGCTGCTGAGGAGCGGTATC  
 500  
 AAGATGATGTTCTACTACCCACTAATGATAGCGATGAACCGCTTCAAGTCTCCACTTGTCTTACTGTTCAAGTGTCTCCGACGACTCCTCCGCATAG  
 F Y Y K M M G D Y Y R Y L A E V Q E G E Q N D K S T E A A E E A Y  
 161  
 AAAAGGCTACCTCACTTGCTGAGGCGGAGCTCTCAGTCACTCATCCAATTCGACTTGGGCTGGCGCTCAACTTCTCCGTCTTCTACTATGAGATTAAAAA  
 600  
 TTTCCGATGGAGTGAACGACTCCGCCTCGAGAGTCAGTGAAGTAAAGTGAACCCGAGTTGAAGAGGCAGAAGATGATACTCTAATTTTT  
 Q K A T S L A E A E L S V T H P I R L G L A L N F S V F Y Y E I K N  
 195  
 TATGCCCAGAAAAGCCTGTTCACTAGCCAAAAGCGGCTTTCGATGCTGCCATTACAGAGTGGACTCGATCAAAGATGAGACGTACAAGGATAGTACTCTC  
 700  
 ATACGGGCTCTTTCGACAAGTGATCGGTTTCGCCGAAAGCTACGACGTAATGTCTCCACTGAGCTAGTTTCTACTCTGCATGTTCTATCATGAGAG  
 M P E K A C S L A K A A F D A A I T E V D S I K D E T Y K D S T L  
 228  
 ATCATGCAGCTGTTGCGTGATAAATCTGACGCTCTGGAATCCGAGTGTGAGACCGACTCCTAAACCCCGGGCCGCTTTTTCTGCTGTCGTTCTGAT  
 800  
 TAGTAGTGCACAACGCACTATTAGACTGCGAGACCTTGAGGCTCACACTCTGGCTGAGGATTTGGGGCCCGCAGAAAAGACGACAGCACCAAGACTA  
 I M Q L L R D N L T L W N S E C E T D S .  
 248  
 TGAGCAAAAATTACAACAATGGTTGCGTTGGTTCTCATTTGCTTTCATCTTGTAAAACACTACTACTAATACTTGCTTCGTTTTATCCAAAAGATA  
 800  
 ACTCGTTTTTAAATGTTGTTACCAACGCAACCAAGAGTAACAAAGCGAAGTAGAACATTTGTGATGATGATTATGAACGAAGCAAAAATAGGGTTTCTAT  
 AATCTATTATAGGTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 837  
 TTAGATAATATCCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

---

## 6 Literatur

---

1. Abe, S., S. Chiba, M. Neena, Y. Minamino, M. Doi and T. Gray (2003), "Origin and evolution of the genomic region for Raf, MKRN, PPAR, and SYN families in human chromosome 3p25, 6p21.31, 7q34, 22q12-13, and Xp11.4," *Mar. Biotechnol.* 6, 404-12
2. Aboobaker, A. A. and M. L. Blaxter (2003), "Use of RNA interference to investigate gene function in the human filarial nematode parasite *Brugia malayi*," *Mol Biochem Parasitol*, 129 (1), 41-51.
3. Aebersold, D. M., Y. D. Shaul, Y. Yung, N. Yarom, Z. Yao, T. Hanoch, and R. Seger (2004), "Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function," *Mol Cell Biol*, 24 (22), 10000-15.
4. Ahn, N. G., R. Seger, R. L. Bratlien, C. D. Diltz, N. K. Tonks, and E. G. Krebs (1991), "Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. *In vitro* activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase," *J Biol Chem*, 266 (7), 4220-7.
5. Aitken, A., D. Jones, Y. Soneji, and S. Howell (1995), "14-3-3 proteins: biological function and domain structure," *Biochem Soc Trans*, 23 (3), 605-11.
6. Aitken, A., H. Baxter, T. Dubois, S. Clokie, S. Mackie, K. Mitchell, A. Peden, and E. Zemlickova (2002), "Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation," *Biochem Soc Trans*, 30 (4), 351-60.
7. Akasaka, K., M. Tamada, F. Wang, K. Kariya, F. Shima, A. Kikuchi, M. Yamamoto, M. Shirouzu, S. Yokoyama, and T. Kataoka (1996), "Differential structural requirements for interaction of Ras protein with its distinct downstream effectors," *J Biol Chem*, 271 (10), 5353-60.
8. Alessi, D. R., Y. Saito, D. G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C. J. Marshall, and S. Cowley (1994), "Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74Raf-1," *Embo J*, 13 (7), 1610-9.
9. Almeida, T. A., J. A. Perez, and F. M. Pinto (2000), "Size-fractionation of RNA by hot agarose electrophoresis," *Biotechniques*, 28 (3), 414, 16.
10. Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim, and M. Perucho (1988), "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes," *Cell*, 53 (4), 549-54.
11. Alvarez, E., I. C. Northwood, F. A. Gonzalez, D. A. Latour, A. Seth, C. Abate, T. Curran, and R. J. Davis (1991), "Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase," *J Biol Chem*, 266 (23), 15277-85.
12. Ammann, R. W., N. Ilitsch, B. Marincek, and A. U. Freiburghaus (1994), "Effect of chemotherapy on the larval mass and the long-term course of alveolar echinococcosis. Swiss Echinococcosis Study Group," *Hepatology*, 19 (3), 735-42.
13. Ammann, R., K. Tschudi, M. von Ziegler, F. Meister, J. Cotting, J. Eckert, F. Witassek, and A. Freiburghaus (1988), "[The long-term course of 60 patients with alveolar echinococcosis in continuous therapy with mebendazole (1976-85)]," *Klin Wochenschr*, 66 (21), 1060-73.
14. Ammann, R.W. and Eckert, J (1995), "Clinical diagnosis and treatment of echinococcus in humans," In Thompson, R.C.A. and Lymbery, A.J (Eds.), in "Echinococcus and Hydatid disease." CAB International, Wallingford.
15. Ammann, R.W., A. Fleiner-Hoffmann and J. Eckert (1999), "Schweizerische Echinokokkose-Studiengruppe. Schweizerische Studie für Chemotherapie der alveolären Echinokokkose - Rückblick auf ein 20-jähriges klinisches Forschungsprojekt," *Schweiz Med Wochenschr*, 129, 323-32.
16. Aroian, R. V., M. Koga, J. E. Mendel, Y. Ohshima, and P. W. Sternberg (1990), "The let-23 gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily," *Nature*, 348 (6303), 693-9.
17. Aumuller, E., G. Schramm, A. Gronow, K. Brehm, B. F. Gibbs, M. J. Doenhoff, and H. Haas (2004), "Echinococcus multilocularis metacestode extract triggers human basophils to release interleukin-4," *Parasite Immunol*, 26 (10), 387-95.

18. Avruch, J., X. F. Zhang, and J. M. Kyriakis (1994), "Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway," *Trends Biochem Sci*, 19 (7), 279-83.
19. Barnier, J. V., C. Papin, A. Eychene, O. Lecoq, and G. Calothy (1995), "The mouse B-Raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression," *J Biol Chem*, 270 (40), 23381-9.
20. Basu, T. N., D. H. Gutmann, J. A. Fletcher, T. W. Glover, F. S. Collins, and J. Downward (1992), "Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients," *Nature*, 356 (6371), 713-5.
21. Beck, T. W., M. Huleihel, M. Gunnell, T. I. Bonner, and U. R. Rapp (1987), "The complete coding sequence of the human A-Raf-1 oncogene and transforming activity of a human A-Raf carrying retrovirus," *Nucleic Acids Res*, 15 (2), 595-609.
22. Becker, N., P. Gilardi-Hebenstreit, T. Seitanidou, D. Wilkinson, and P. Charnay (1995), "Characterisation of the Sek-1 receptor tyrosine kinase," *FEBS Lett*, 368 (2), 353-7.
23. Bell, G. I., N. M. Fong, M. M. Stempien, M. A. Wormsted, D. Caput, L. L. Ku, M. S. Urdea, L. B. Rall, and R. Sanchez-Pescador (1986), "Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization," *Nucleic Acids Res*, 14 (21), 8427-46.
24. Bender, R. C., L. M. Bixler, J. P. Lerner, and C. J. Bayne (2002), "Schistosoma mansoni sporocysts in culture: host plasma hemoglobin contributes to *in vitro* oxidative stress," *J Parasitol*, 88 (1), 14-8.
25. Bhullar, R. P. and H. D. Seneviratne (1996), "Characterization of human platelet GTPase activating protein for the Ral GTP-binding protein," *Biochim Biophys Acta*, 1311 (3), 181-8.
26. Bixler, L. M., J. P. Lerner, M. Ivanchenko, R. S. McCormick, D. W. Barnes, and C. J. Bayne (2001), "Axenic culture of Schistosoma mansoni sporocysts in low O<sub>2</sub> environments," *J Parasitol*, 87 (5), 1167-8.
27. Blaxter, M. and L. Liu (1996), "Nematode spliced leaders--ubiquity, evolution and utility," *Int J Parasitol*, 26 (10), 1025-33.
28. Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001), "Oncogenic kinase signalling," *Nature*, 411 (6835), 355-65.
29. Blumenthal, T. (1995), "Trans-splicing and polycistronic transcription in *Caenorhabditis elegans*," *Trends Genet*, 11 (4), 132-6.
30. Bogoyevitch, M. A. and N. W. Court (2004), "Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8," *Cell Signal*, 16 (12), 1345-54.
31. Boguski, M. S. and F. McCormick (1993), "Proteins regulating Ras and its relatives," *Nature*, 366 (6456), 643-54.
32. Bollag, G., S. Freeman, J. F. Lyons, and L. E. Post (2003), "Raf pathway inhibitors in oncology," *Curr Opin Investig Drugs*, 4 (12), 1436-41.
33. Bonner, T., S. J. O'Brien, W. G. Nash, U. R. Rapp, C. C. Morton, and P. Leder (1984), "The human homologs of the Raf (mil) oncogene are located on human chromosomes 3 and 4," *Science*, 223 (4631), 71-4.
34. Boonstra, J., P. Rijken, B. Humbel, F. Cremers, A. Verkleij, and P. van Bergen en Henegouwen (1995), "The epidermal growth factor," *Cell Biol Int*, 19 (5), 413-30.
35. Borst, P. (1986), "Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes," *Annu Rev Biochem*, 55, 701-32.
36. Bos, J. L. (1997), "Ras-like GTPases," *Biochim Biophys Acta*, 1333 (2), M19-31.
37. Bos, J. L., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, M. Verlaan-de Vries, J. H. van Boom, A. J. van der Eb, and B. Vogelstein (1987), "Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers," *Nature*, 327 (6120), 293-7.
38. Bos, J. L., J. de Rooij, and K. A. Reedquist (2001), "Rap1 signalling: adhering to new models," *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (5), 369-77.
39. Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, J. S. Gregory, C. Slaughter, C. Moomaw, J. Hsu, and M. H. Cobb (1990), "An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control," *Science*, 249 (4964), 64-7.
40. Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos (1991), "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF," *Cell*, 65 (4), 663-75.

41. Bourne, H. R., D. A. Sanders, and F. McCormick (1990), "The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions," *Nature*, 348 (6297), 125-32.
42. Bourne, H. R., D. A. Sanders, and F. McCormick (1991), "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism," *Nature*, 349 (6305), 117-27.
43. Brehm, K., K. Hubert, E. Sciutto, T. Garate, and M. Frosch (2002), "Characterization of a spliced leader gene and of trans-spliced mRNAs from *Taenia solium*," *Mol Biochem Parasitol*, 122 (1), 105-10.
44. Brehm, K., K. Jensen, and M. Frosch (2000), "mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*," *J Biol Chem*, 275 (49), 38311-8.
45. Brehm, K., K. Jensen, P. Frosch, and M. Frosch (1999), "Characterization of the genomic locus expressing the ERM-like protein of *Echinococcus multilocularis*," *Mol Biochem Parasitol*, 100 (1), 147-52.
46. Brehm, K., K. Kronthaler, H. Jura, and M. Frosch (2000), "Cloning and characterization of beta-tubulin genes from *Echinococcus multilocularis*," *Mol Biochem Parasitol*, 107 (2), 297-302.
47. Brehm, K., M. Wolf, H. Beland, A. Kroner, and M. Frosch (2003), "Analysis of differential gene expression in *Echinococcus multilocularis* larval stages by means of spliced leader differential display," *Int J Parasitol*, 33 (11), 1145-59.
48. Brehm, K., P. Kern, K. Hubert, and M. Frosch (1999), "Echinococcosis from every angle," *Parasitol Today*, 15 (9), 351-2.
49. Bresson-Hadni, S., M. Liance, R. Houin, J. L. Bresson, D. Lenys, J. P. Miguet, and D. Vuitton (1988), "[Cross-reactivity between parasitic antigens and T lymphocyte surface antigens: a possible host-escape mechanism for *Echinococcus multilocularis*]," *C R Seances Soc Biol Fil*, 182 (1), 61-6.
50. Broek, D., N. Samiy, O. Fasano, A. Fujiyama, F. Tamanoi, J. Northup, and M. Wigler (1985), "Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins," *Cell*, 41 (3), 763-9.
51. Brondello, J. M., J. Pouyssegur, and F. R. McKenzie (1999), "Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation," *Science*, 286 (5449), 2514-7.
52. Brott, B. K., A. Alessandrini, D. A. Largaespada, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, C. M. Crews, and R. L. Erikson (1993), "MEK2 is a kinase related to MEK1 and is differentially expressed in murine tissues," *Cell Growth Differ*, 4 (11), 921-9.
53. Brtva, T. R., J. K. Drugan, S. Ghosh, R. S. Terrell, S. Campbell-Burk, R. M. Bell, and C. J. Der (1995), "Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras," *J Biol Chem*, 270 (17), 9809-12.
54. Brunet, A., D. Roux, P. Lenormand, S. Dowd, S. Keyse, and J. Pouyssegur (1999), "Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry," *Embo J*, 18 (3), 664-74.
55. Bub, E., T. Stolze and G. Strohmeyer (1975), "Pathogenese, Diagnose und klinisches Bild der hepatischen Echinokokkose," *Internist (Berl.)* 16, 428-35.
56. Buday, L. and J. Downward (1993), "Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor," *Cell*, 73 (3), 611-20.
57. Camps, M., A. Nichols, and S. Arkinstall (2000), "Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function," *Faseb J*, 14 (1), 6-16.
58. Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, M. H. Cobb, and E. J. Goldsmith (1997), "Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation," *Cell*, 90 (5), 859-69.
59. Carey, K. D., R. T. Watson, J. E. Pessin, and P. J. Stork (2003), "The requirement of specific membrane domains for Raf-1 phosphorylation and activation," *J Biol Chem*, 278 (5), 3185-96.
60. Caron, E. (2003), "Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges," *J Cell Sci*, 116 (Pt 3), 435-40.
61. Carpenter, G. (1993), "EGF: new tricks for an old growth factor," *Curr Opin Cell Biol*, 5 (2), 261-4.
62. Casci, T. and M. Freeman (1999), "Control of EGF receptor signalling: lessons from fruitflies," *Cancer Metastasis Rev*, 18 (2), 181-201.
63. Casey, P. J. and M. C. Seabra (1996), "Protein prenyltransferases," *J Biol Chem*, 271 (10), 5289-92.

64. Chang, C. and P. W. Sternberg (1999), "C. elegans vulval development as a model system to study the cancer biology of EGFR signaling," *Cancer Metastasis Rev*, 18 (2), 203-13.
65. Chen, R. H., C. Abate, and J. Blenis (1993), "Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (23), 10952-6.
66. Chen, R. H., J. Chung, and J. Blenis (1991), "Regulation of pp90<sup>rsk</sup> phosphorylation and S6 phosphotransferase activity in Swiss 3T3 cells by growth factor-, phorbol ester-, and cyclic AMP-mediated signal transduction," *Mol Cell Biol*, 11 (4), 1861-7.
67. Cheng, M., T. G. Boulton, and M. H. Cobb (1996), "ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase," *J Biol Chem*, 271 (15), 8951-8.
68. Chien, Y. and M. A. White (2003), "RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival," *EMBO Rep*, 4 (8), 800-6.
69. Choi, S. C. and J. K. Han (2005), "Rap2 is required for Wnt/beta-catenin signaling pathway in *Xenopus* early development," *Embo J*, 24 (5), 985-96.
70. Choji, K., N. Fujita, M. Chen, A. S. Spiers, Y. Morita, M. Shinohara, T. Nojima, and G. Irie (1992), "Alveolar hydatid disease of the liver: computed tomography and transabdominal ultrasound with histopathological correlation," *Clin Radiol*, 46 (2), 97-103.
71. Chong, H., H. G. Vikis, and K. L. Guan (2003), "Mechanisms of regulating the Raf kinase family," *Cell Signal*, 15 (5), 463-9.
72. Chong, H., J. Lee, and K. L. Guan (2001), "Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation," *Embo J*, 20 (14), 3716-27.
73. Chung, J., C. J. Kuo, G. R. Crabtree, and J. Blenis (1992), "Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases," *Cell*, 69 (7), 1227-36.
74. Clough, R. R., R. S. Sidhu, and R. P. Bhullar (2002), "Calmodulin binds RalA and RalB and is required for the thrombin-induced activation of Ral in human platelets," *J Biol Chem*, 277 (32), 28972-80.
75. Coles, L. C. and P. E. Shaw (2002), "PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway," *Oncogene*, 21 (14), 2236-44.
76. Conchedda, M., F. Gabriele, and G. Bortoletti (2006), "Development and sexual maturation of *Echinococcus granulosus* adult worms in the alternative definitive host, Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)," *Acta Trop*, 97 (2), 119-25.
77. Craig, P. (2003), "*Echinococcus multilocularis*," *Curr Opin Infect Dis*, 16 (5), 437-44.
78. Dalby, K. N., N. Morrice, F. B. Caudwell, J. Avruch, and P. Cohen (1998), "Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90<sup>rsk</sup> that are inducible by MAPK," *J Biol Chem*, 273 (3), 1496-505.
79. Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal (2002), "Mutations of the BRaf gene in human cancer," *Nature*, 417 (6892), 949-54.
80. de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman, A. Wittinghofer, and J. L. Bos (1998), "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP," *Nature*, 396 (6710), 474-7.
81. Deak, M., A. D. Clifton, L. M. Lucocq, and D. R. Alessi (1998), "Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB," *Embo J*, 17 (15), 4426-41.
82. DeFeo-Jones, D., E. M. Scolnick, R. Koller, and R. Dhar (1983), "ras-Related gene sequences identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*," *Nature*, 306 (5944), 707-9.
83. Dhillon, A. S. and W. Kolch (2002), "Untying the regulation of the Raf-1 kinase," *Arch Biochem Biophys*, 404 (1), 3-9.

84. Dissanayake, S. (2000), "Upregulation of a Raf kinase and a DP-1 family transcription factor in epidermal growth factor (EGF) stimulated filarial parasites," *Int J Parasitol*, 30 (10), 1089-97.
85. Dissanayake, S., M. Xu, and W. F. Piessens (1992), "Filarial parasites contain a ras homolog of the TC4/ran/Spil family," *Mol Biochem Parasitol*, 56 (2), 259-67.
86. Downward, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger, and M. D. Waterfield (1984), "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences," *Nature*, 307 (5951), 521-7.
87. Eckert, J. and P. Deplazes (2004), "Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern," *Clin Microbiol Rev*, 17 (1), 107-35.
88. Eckert, J. and P. Deplazes (2004), "Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern," *Clin Microbiol Rev*, 17 (1), 107-35.
89. Ehrhardt, A., G. R. Ehrhardt, X. Guo, and J. W. Schrader (2002), "Ras and relatives - job sharing and networking keep an old family together," *Exp Hematol*, 30 (10), 1089-106.
90. Emkey, R., S. Freedman, and L. A. Feig (1991), "Characterization of a GTPase-activating protein for the Ras-related Ral protein," *J Biol Chem*, 266 (15), 9703-6.
91. Enslin, H., D. M. Branch, and R. J. Davis (2000), "Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms," *Embo J*, 19 (6), 1301-11.
92. Ewald, D., J. Eckert, B. Gottstein, M. Straub, and H. Nigg (1992), "Parasitological and serological studies on the prevalence of *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863 in red foxes (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in Switzerland," *Rev Sci Tech*, 11 (4), 1057-61.
93. Fabian, J. R., I. O. Daar, and D. K. Morrison (1993), "Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase," *Mol Cell Biol*, 13 (11), 7170-9.
94. Fanger, G. R., C. Widmann, A. C. Porter, S. Sather, G. L. Johnson, and R. R. Vaillancourt (1998), "14-3-3 proteins interact with specific MEK kinases," *J Biol Chem*, 273 (6), 3476-83.
95. Fanger, G. R., P. Gerwins, C. Widmann, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson (1997), "MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases?," *Curr Opin Genet Dev*, 7 (1), 67-74.
96. Fantl, W. J., A. J. Muslin, A. Kikuchi, J. A. Martin, A. M. MacNicol, R. W. Gross, and L. T. Williams (1994), "Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins," *Nature*, 371 (6498), 612-4.
97. Farrell, F. X. and E. G. Lapetina (1992), "Partial purification of a GTPase-activating protein for rap2b from bovine brain membranes," *Biochem Biophys Res Commun*, 189 (2), 717-21.
98. Farrell, F. X., K. Yamamoto, and E. G. Lapetina (1993), "Prenyl group identification of rap2 proteins: a ras superfamily member other than ras that is farnesylated," *Biochem J*, 289 (Pt 2), 349-55.
99. Farrell, F. X., K. Yamamoto, and E. G. Lapetina (1993), "Prenyl group identification of rap2 proteins: a ras superfamily member other than ras that is farnesylated," *Biochem J*, 289 (Pt 2), 349-55.
100. Fausto, N., A. D. Laird, and E. M. Webber (1995), "Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration," *Faseb J*, 9 (15), 1527-36.
101. Felton-Edkins, Z. A., J. A. Fairley, E. L. Graham, I. M. Johnston, R. J. White, and P. H. Scott (2003), "The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIIB," *Embo J*, 22 (10), 2422-32.
102. Fernandez-Almonacid, R. and O. M. Rosen (1987), "Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor," *Mol Cell Biol*, 7 (8), 2718-27.
103. Fernandez, C., W. F. Gregory, P. Loke, and R. M. Maizels (2002), "Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences," *Mol Biochem Parasitol*, 122 (2), 171-80.
104. Ferrell, J. E., Jr. and R. R. Bhatt (1997), "Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase," *J Biol Chem*, 272 (30), 19008-16.
105. Finnie, C., J. Borch, and D. B. Collinge (1999), "14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions," *Plant Mol Biol*, 40 (4), 545-54.

106. Fisher, D. A. and J. Lakshmanan (1990), "Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals," *Endocr Rev*, 11 (3), 418-42.
107. Freed, E., M. Symons, S. G. Macdonald, F. McCormick, and R. Ruggieri (1994), "Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation," *Science*, 265 (5179), 1713-6.
108. Fridman, M., H. Maruta, J. Gonez, F. Walker, H. Treutlein, J. Zeng, and A. Burgess (2000), "Point mutants of c-Raf-1 RBD with elevated binding to v-Ha-Ras," *J Biol Chem*, 275 (39), 30363-71.
109. Frosch, P. M., C. Geier, F. J. Kaup, A. Muller, and M. Frosch (1993), "Molecular cloning of an echinococcal microtrichal antigen immunoreactive in *Echinococcus multilocularis* disease," *Mol Biochem Parasitol*, 58 (2), 301-10.
110. Frosch, P. M., M. Frosch, T. Pfister, V. Schaad, and D. Bitter-Suermann (1991), "Cloning and characterisation of an immunodominant major surface antigen of *Echinococcus multilocularis*," *Mol Biochem Parasitol*, 48 (2), 121-30.
111. Fu, H., K. Xia, D. C. Pallas, C. Cui, K. Conroy, R. P. Narsimhan, H. Mamon, R. J. Collier, and T. M. Roberts (1994), "Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins," *Science*, 266 (5182), 126-9.
112. Fu, H., R. R. Subramanian, and S. C. Masters (2000), "14-3-3 proteins: structure, function, and regulation," *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 617-47.
113. Fukai, S., H. T. Matern, J. R. Jagath, R. H. Scheller, and A. T. Brunger (2003), "Structural basis of the interaction between RalA and Sec5, a subunit of the sec6/8 complex," *Embo J*, 22 (13), 3267-78.
114. Fukui, K., T. Sasaki, K. Imazumi, Y. Matsuura, H. Nakanishi, and Y. Takai (1997), "Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins," *J Biol Chem*, 272 (8), 4655-8.
115. Gao, X., T. Satoh, Y. Liao, C. Song, C. D. Hu, K. Kariya Ki, and T. Kataoka (2001), "Identification and characterization of RA-GEF-2, a Rap guanine nucleotide exchange factor that serves as a downstream target of M-Ras," *J Biol Chem*, 276 (45), 42219-25.
116. Garrington, T. P. and G. L. Johnson (1999), "Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways," *Curr Opin Cell Biol*, 11 (2), 211-8.
117. Gasperini, R. and G. Gibson (1999), "Absence of protein polymorphism in the Ras genes of *Drosophila melanogaster*," *J Mol Evol*, 49 (5), 583-90.
118. Gavin, A. C. and A. R. Nebreda (1999), "A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1," *Curr Biol*, 9 (5), 281-4.
119. Gelmedin, V., R. Zavala-Gongora, C. Fernandez, and K. Brehm (2005), "*Echinococcus multilocularis*: Cloning and characterization of a member of the SNW/SKIP family of transcriptional coregulators," *Exp Parasitol*.
120. Gill, G. N., P. J. Bertics, and J. B. Santon (1987), "Epidermal growth factor and its receptor," *Mol Cell Endocrinol*, 51 (3), 169-86.
121. Gille, H., M. Kortenjann, O. Thomae, C. Moomaw, C. Slaughter, M. H. Cobb, and P. E. Shaw (1995), "ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation," *Embo J*, 14 (5), 951-62.
122. Giroux, S., M. Tremblay, D. Bernard, J. F. Cardin-Girard, S. Aubry, L. Larouche, S. Rousseau, J. Huot, J. Landry, L. Jeannotte, and J. Charron (1999), "Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta," *Curr Biol*, 9 (7), 369-72.
123. Glomset, J. A. and C. C. Farnsworth (1994), "Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes," *Annu Rev Cell Biol*, 10, 181-205.
124. Gopalbhai, K., G. Jansen, G. Beauregard, M. Whiteway, F. Dumas, C. Wu, and S. Meloche (2003), "Negative regulation of MAPKK by phosphorylation of a conserved serine residue equivalent to Ser212 of MEK1," *J Biol Chem*, 278 (10), 8118-25.
125. Gottstein, B. (1992), "*Echinococcus multilocularis* infection: immunology and immunodiagnosis," *Adv Parasitol*, 31, 321-80.
126. Gottstein, B. (2000), "[Epidemiology and systematics of cystic and alveolar hydatid disease]," *Chirurg*, 71 (1), 1-8.
127. Gottstein, B. and A. Hemphill (1997), "Immunopathology of echinococcosis," *Chem Immunol*, 66, 177-208.



128. Gottstein, B. and R. Felleisen (1995), "Protective immune mechanisms against the metacestode of *Echinococcus multilocularis*," *Parasitol Today*, 11 (9), 320-6.
129. Gottstein, B., P. Deplazes, and M. Aubert (1992), "Echinococcus multilocularis: immunological study on the "Em2-positive" laminated layer during *in vitro* and *in vivo* post-oncospherical and larval development," *Parasitol Res*, 78 (4), 291-7.
130. Greenfield, C., I. Hiles, M. D. Waterfield, M. Federwisch, A. Wollmer, T. L. Blundell, and N. McDonald (1989), "Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor," *Embo J*, 8 (13), 4115-23.
131. Greenwald, I. (1990), "Genetic and molecular analysis of EGF-related genes in *Caenorhabditis elegans*," *Mol Reprod Dev*, 27 (1), 73-9.
132. Gum, R. J. and P. R. Young (1999), "Identification of two distinct regions of p38 MAPK required for substrate binding and phosphorylation," *Biochem Biophys Res Commun*, 266 (1), 284-9.
133. Gupta, P. and R. Prywes (2002), "ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for epidermal growth factor-induced c-jun expression," *J Biol Chem*, 277 (52), 50550-6.
134. Gupta, S., A. Seth, and R. J. Davis (1993), "Transactivation of gene expression by Myc is inhibited by mutation at the phosphorylation sites Thr-58 and Ser-62," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (8), 3216-20.
135. Hackel, P. O., E. Zwick, N. Prenzel, and A. Ullrich (1999), "Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways," *Curr Opin Cell Biol*, 11 (2), 184-9.
136. Haertel, M., C. Fretz, and W. A. Fuchs (1980), "[The computer tomographic diagnosis of echinococcosis (author's transl)]," *Rofo*, 133 (2), 164-70.
137. Hagemann, C. and U. R. Rapp (1999), "Isotype-specific functions of Raf kinases," *Exp Cell Res*, 253 (1), 34-46.
138. Hagemann, C. and U. R. Rapp (1999), "Isotype-specific functions of Raf kinases," *Exp Cell Res*, 253 (1), 34-46.
139. Hall, A. (1990), "The cellular functions of small GTP-binding proteins," *Science*, 249 (4969), 635-40.
140. Han, M. and P. W. Sternberg (1990), "let-60, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a ras protein," *Cell*, 63 (5), 921-31.
141. Hancock, J. F., K. Cadwallader, and C. J. Marshall (1991), "Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B)," *Embo J*, 10 (3), 641-6.
142. Hanks, S. K., A. M. Quinn, and T. Hunter (1988), "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains," *Science*, 241 (4861), 42-52.
143. Heath, W. F. and R. B. Merrifield (1986), "A synthetic approach to structure-function relationships in the murine epidermal growth factor molecule," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (17), 6367-71.
144. Hemphill, A. and B. Gottstein (1995), "Immunology and morphology studies on the proliferation of *in vitro* cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes," *Parasitol Res*, 81 (7), 605-14.
145. Hemphill, A., M. Stettler, M. Walker, M. Siles-Lucas, R. Fink, and B. Gottstein (2002), "Culture of *Echinococcus multilocularis* metacestodes: an alternative to animal use," *Trends Parasitol*, 18 (10), 445-51.
146. Hermeking, H., C. Lengauer, K. Polyak, T. C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein (1997), "14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression," *Mol Cell*, 1 (1), 3-11.
147. Herrmann, C. and N. Nassar (1996), "Ras and its effectors," *Prog Biophys Mol Biol*, 66 (1), 1-41.
148. Hide, G. (1998), "Mammalian epidermal growth factor stimulates G-protein activity in *Trypanosoma brucei*," *Parasitol Res*, 84 (2), 143-6.
149. Hide, G., A. Gray, C. M. Harrison, and A. Tait (1989), "Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes," *Mol Biochem Parasitol*, 36 (1), 51-9.
150. Hilger, R. A., M. E. Scheulen, and D. Strumberg (2002), "The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer," *Onkologie*, 25 (6), 511-8.
151. Hofer, F., S. Fields, C. Schneider, and G. S. Martin (1994), "Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (23), 11089-93.

152. Holland, P. M. and J. A. Cooper (1999), "Protein modification: docking sites for kinases," *Curr Biol*, 9 (9), R329-31.
153. Hu, C. D., K. Kariya, G. Kotani, M. Shirouzu, S. Yokoyama, and T. Kataoka (1997), "Coassociation of Rap1A and Ha-Ras with Raf-1 N-terminal region interferes with ras-dependent activation of Raf-1," *J Biol Chem*, 272 (18), 11702-5.
154. Hu, C. D., K. Kariya, M. Tamada, K. Akasaka, M. Shirouzu, S. Yokoyama, and T. Kataoka (1995), "Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras," *J Biol Chem*, 270 (51), 30274-7.
155. Huang, C. Y. and J. E. Ferrell, Jr. (1996), "Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (19), 10078-83.
156. Huang, W., A. Alessandrini, C. M. Crews, and R. L. Erikson (1993), "Raf-1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (23), 10947-51.
157. Hubbard, S. R. and J. H. Till (2000), "Protein tyrosine kinase structure and function," *Annu Rev Biochem*, 69, 373-98.
158. Hubert, K., E. Cordero, M. Frosch, and F. Solomon (1999), "Activities of the EM10 protein from *Echinococcus multilocularis* in cultured mammalian cells demonstrate functional relationships to ERM family members," *Cell Motil Cytoskeleton*, 42 (3), 178-88.
159. Hubert, K., R. Zavala-Gongora, M. Frosch, and K. Brehm (2004), "Identification and characterization of PDZ-1, a N-ERMAD specific interaction partner of the *Echinococcus multilocularis* ERM protein Elp," *Mol Biochem Parasitol*, 134 (1), 149-54.
160. Hunter, T. (2000), "Signaling--2000 and beyond," *Cell*, 100 (1), 113-27.
161. Irie, K., Y. Gotoh, B. M. Yashar, B. Errede, E. Nishida, and K. Matsumoto (1994), "Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the Raf protein kinase," *Science*, 265 (5179), 1716-9.
162. Ito, A., Y. Osawa, M. Nakao, T. Horii, M. Okamoto, M. Itoh, and T. Yamashita (1995), "Em18 and Em16, new serologic marker epitopes for alveolar echinococcosis in western blot analysis, are the only two epitopes recognized by commercially available weak positive (cut off) sera for Em2plus-ELISA," *J Helminthol*, 69 (4), 369-71.
163. Ivanchenko, M. G., J. P. Lerner, R. S. McCormick, A. Toumadje, B. Allen, K. Fischer, O. Hedstrom, A. Helmrich, D. W. Barnes, and C. J. Bayne (1999), "Continuous in vitro propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (9), 4965-70.
164. Jaumot, M. and J. F. Hancock (2001), "Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions," *Oncogene*, 20 (30), 3949-58.
165. Jelinek, T., P. Dent, T. W. Sturgill, and M. J. Weber (1996), "Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation," *Mol Cell Biol*, 16 (3), 1027-34.
166. Jilkina, O. and R. P. Bhullar (1996), "Generation of antibodies specific for the RalA and RalB GTP-binding proteins and determination of their concentration and distribution in human platelets," *Biochim Biophys Acta*, 1314 (1-2), 157-66.
167. Jullien-Flores, V., Y. Mahe, G. Mirey, C. Leprince, B. Meunier-Bisceuil, A. Sorkin, and J. H. Camonis (2000), "RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis," *J Cell Sci*, 113 (Pt 16), 2837-44.
168. Jura, H., A. Bader, and M. Frosch (1998), "In vitro activities of benzimidazoles against *Echinococcus multilocularis* metacestodes," *Antimicrob Agents Chemother*, 42 (5), 1052-6.
169. Jura, H., A. Bader, M. Hartmann, H. Maschek, and M. Frosch (1996), "Hepatic tissue culture model for study of host-parasite interactions in alveolar echinococcosis," *Infect Immun*, 64 (9), 3484-90.
170. Kadono-Okuda, K. and D. A. Andres (1997), "An expression cloning method to identify monomeric GTP-binding proteins by GTP overlay," *Anal Biochem*, 254 (2), 187-91.
171. Kampkotter, A., I. Ridgers, D. A. Johnston, D. Rollinson, W. Kunz, and C. G. Grevelding (1999), "*Schistosoma mansoni*: cloning and characterization of the Ras homologue," *Exp Parasitol*, 91 (3), 280-3.
172. Kern, P., A. Ammon, M. Kron, G. Sinn, S. Sander, L. R. Petersen, and W. Gaus (2004), "Risk factors for alveolar echinococcosis in humans," *Emerg Infect Dis*, 10 (12), 2088-93.

173. Khokhlatchev, A., S. Xu, J. English, P. Wu, E. Schaefer, and M. H. Cobb (1997), "Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases," *J Biol Chem*, 272 (17), 11057-62.
174. Kikuchi, A., S. D. Demo, Z. H. Ye, Y. W. Chen, and L. T. Williams (1994), "ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21," *Mol Cell Biol*, 14 (11), 7483-91.
175. Klambt, C. (2000), "EGF receptor signalling: the importance of presentation," *Curr Biol*, 10 (10), R388-91.
176. Knauf, U., C. Tschopp, and H. Gram (2001), "Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2," *Mol Cell Biol*, 21 (16), 5500-11.
177. Knox, D. P. (2004), "Technological advances and genomics in metazoan parasites," *Int J Parasitol*, 34 (2), 139-52.
178. Kolch, W. (2000), "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions," *Biochem J*, 351 Pt 2, 289-305.
179. Konrad, C., A. Kroner, M. Spiliotis, R. Zavala-Gongora, and K. Brehm (2003), "Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*," *Int J Parasitol*, 33 (3), 301-12.
180. Kovalenko, F. P., A. I. Krotov, and N. N. Novikova (1979), "[Infection of laboratory animals with secondary hydatid disease by the intraperitoneal administration of *Alveococcus multilocularis* accephalocysts]," *Med Parazitol (Mosk)*, 48 (1), 84-6.
181. Kraus, M. H., N. C. Popescu, S. C. Amsbaugh, and C. R. King (1987), "Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms," *Embo J*, 6 (3), 605-10.
182. Kraus, M. H., W. Issing, T. Miki, N. C. Popescu, and S. A. Aaronson (1989), "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (23), 9193-7.
183. Kroner A. (2002), "Klonierung und Charakterisierung von Rezeptorkinasen der EGF- und TGF  $\beta$ - Familie des kleinen Fuchsbandwurmes, *Echinococcus multilocularis*," Medical dissertation, University of Würzburg, Institute of Hygiene and Microbiology
184. Kuiperij, H. B., J. de Rooij, H. Rehmann, M. van Triest, A. Wittinghofer, J. L. Bos, and F. J. Zwartkruis (2003), "Characterisation of PDZ-GEFs, a family of guanine nucleotide exchange factors specific for Rap1 and Rap2," *Biochim Biophys Acta*, 1593 (2-3), 141-9.
185. Kumaratilake, L. M. and R. C. Thompson (1983), "A comparison of *Echinococcus granulosus* from different geographical areas of Australia using secondary cyst development in mice," *Int J Parasitol*, 13 (5), 509-15.
186. Lee, J. E., T. W. Beck, L. Wojnowski, and U. R. Rapp (1996), "Regulation of A-Raf expression," *Oncogene*, 12 (8), 1669-77.
187. Levkowitz, G., H. Waterman, S. A. Ettenberg, M. Katz, A. Y. Tsygankov, I. Alroy, S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz, and Y. Yarden (1999), "Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1," *Mol Cell*, 4 (6), 1029-40.
188. Lewis, T. S., P. S. Shapiro, and N. G. Ahn (1998), "Signal transduction through MAP kinase cascades," *Adv Cancer Res*, 74, 49-139.
189. Li, N., A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, and J. Schlessinger (1993), "Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling," *Nature*, 363 (6424), 85-8.
190. Li, Z., Y. Jiang, R. J. Ulevitch, and J. Han (1996), "The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases," *Biochem Biophys Res Commun*, 228 (2), 334-40.
191. Liao, Y., T. Satoh, X. Gao, T. G. Jin, C. D. Hu, and T. Kataoka (2001), "RA-GEF-1, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1, is activated by translocation induced by association with Rap1\*GTP and enhances Rap1-dependent B-Raf activation," *J Biol Chem*, 276 (30), 28478-83.
192. Lin, C. R., W. S. Chen, W. Kruiger, L. S. Stolarsky, W. Weber, R. M. Evans, I. M. Verma, G. N. Gill, and M. G. Rosenfeld (1984), "Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA: gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells," *Science*, 224 (4651), 843-8.

193. Liu, D., J. Bienkowska, C. Petosa, R. J. Collier, H. Fu, and R. Liddington (1995), "Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein," *Nature*, 376 (6536), 191-4.
194. Livneh, E., L. Glazer, D. Segal, J. Schlessinger, and B. Z. Shilo (1985), "The Drosophila EGF receptor gene homolog: conservation of both hormone binding and kinase domains," *Cell*, 40 (3), 599-607.
195. Loeffler, I. K. and J. L. Bennett (1996), "A rab-related GTP-binding protein in *Schistosoma mansoni*," *Mol Biochem Parasitol*, 77 (1), 31-40.
196. Luo, Z., B. Diaz, M. S. Marshall, and J. Avruch (1997), "An intact Raf zinc finger is required for optimal binding to processed Ras and for ras-dependent Raf activation in situ," *Mol Cell Biol*, 17 (1), 46-53.
197. Machida, N., M. Umikawa, K. Takei, N. Sakima, B. E. Myagmar, K. Taira, H. Uezato, Y. Ogawa, and K. Kariya (2004), "Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 as a putative effector of Rap2 to activate the c-Jun N-terminal kinase," *J Biol Chem*, 279 (16), 15711-4.
198. Magee, A. I., C. M. Newman, T. Giannakouros, J. F. Hancock, E. Fawell, and J. Armstrong (1992), "Lipid modifications and function of the ras superfamily of proteins," *Biochem Soc Trans*, 20 (2), 497-9.
199. Mansour, S. J., W. T. Matten, A. S. Hermann, J. M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G. F. Vande Woude, and N. G. Ahn (1994), "Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase," *Science*, 265 (5174), 966-70.
200. Marais, R. and C. J. Marshall (1996), "Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf," *Cancer Surv*, 27, 101-25.
201. Marais, R., J. Wynne, and R. Treisman (1993), "The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain," *Cell*, 73 (2), 381-93.
202. Marais, R., Y. Light, H. F. Paterson, C. S. Mason, and C. J. Marshall (1997), "Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases," *J Biol Chem*, 272 (7), 4378-83.
203. Marshall, M. S. (1995), "Ras target proteins in eukaryotic cells," *Faseb J*, 9 (13), 1311-8.
204. Martin, G. A., D. Viskochil, G. Bollag, P. C. McCabe, W. J. Crosier, H. Haubruck, L. Conroy, R. Clark, P. O'Connell, R. M. Cawthon, and et al. (1990), "The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21," *Cell*, 63 (4), 843-9.
205. Mason, C. S., C. J. Springer, R. G. Cooper, G. Superti-Furga, C. J. Marshall, and R. Marais (1999), "Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation," *Embo J*, 18 (8), 2137-48.
206. McLeod, S. J., A. H. Li, R. L. Lee, A. E. Burgess, and M. R. Gold (2002), "The Rap GTPases regulate B cell migration toward the chemokine stromal cell-derived factor-1 (CXCL12): potential role for Rap2 in promoting B cell migration," *J Immunol*, 169 (3), 1365-71.
207. McManus, D. P., W. Zhang, J. Li, and P. B. Bartley (2003), "Echinococcosis," *Lancet*, 362 (9392), 1295-304.
208. Melnick, M. B., L. A. Perkins, M. Lee, L. Ambrosio, and N. Perrimon (1993), "Developmental and molecular characterization of mutations in the Drosophila-Raf serine/threonine protein kinase," *Development*, 118 (1), 127-38.
209. Michaud, N. R., J. R. Fabian, K. D. Mathes, and D. K. Morrison (1995), "14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner," *Mol Cell Biol*, 15 (6), 3390-7.
210. Miguet, J. P. and S. Bresson-Hadni (1989), "Alveolar echinococcosis of the liver," *J Hepatol*, 8 (3), 373-9.
211. Mikula, M., M. Schreiber, Z. Husak, L. Kucerova, J. Ruth, R. Wieser, K. Zatloukal, H. Beug, E. F. Wagner, and M. Baccarini (2001), "Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-Raf-1 gene," *Embo J*, 20 (8), 1952-62.
212. Mirey, G., M. Balakireva, S. L'Hoste, C. Rosse, S. Voegelings, and J. Camonis (2003), "A Ral guanine exchange factor-Ral pathway is conserved in *Drosophila melanogaster* and sheds new light on the connectivity of the Ral, Ras, and Rap pathways," *Mol Cell Biol*, 23 (3), 1112-24.
213. Mobedi, I., H. Madadi, and F. Arfaa (1970), "Camel, *Camelus dromedarius*, as intermediate host of *Echinococcus granulosus* in Iran," *J Parasitol*, 56 (6), 1255.
214. Moghal, N. and P. W. Sternberg (2003), "The epidermal growth factor system in *Caenorhabditis elegans*," *Exp Cell Res*, 284 (1), 150-9.

215. Moghal, N. and Sternberg, P. W. (1999), "Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor," *Curr Opin Cell Biol*, 11 (2), 190-6.
216. Morrison, D. K. and R. E. Cutler (1997), "The complexity of Raf-1 regulation," *Curr Opin Cell Biol*, 9 (2), 174-9.
217. Mösch, H. U., E. Kubler, S. Krappmann, G. R. Fink, and G. H. Braus (1999), "Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol Biol Cell*, 10 (5), 1325-35.
218. Moskalenko, S., D. O. Henry, C. Rosse, G. Mirey, J. H. Camonis, and M. A. White (2002), "The exocyst is a Ral effector complex," *Nat Cell Biol*, 4 (1), 66-72.
219. Mumberg, D., R. Muller, and M. Funk (1994), "Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression," *Nucleic Acids Res*, 22 (25), 5767-8.
220. Muslin, A. J., J. W. Tanner, P. M. Allen, and A. S. Shaw (1996), "Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine," *Cell*, 84 (6), 889-97.
221. Myagmar, B. E., M. Umikawa, T. Asato, K. Taira, M. Oshiro, A. Hino, K. Takei, H. Uezato, and K. Kariya (2005), "PARG1, a protein-tyrosine phosphatase-associated RhoGAP, as a putative Rap2 effector," *Biochem Biophys Res Commun*, 329 (3), 1046-52.
222. Nakashima, S., K. Morinaka, S. Koyama, M. Ikeda, M. Kishida, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Kishida, and A. Kikuchi (1999), "Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors," *Embo J*, 18 (13), 3629-42.
223. Nassar, N., G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick, and A. Wittinghofer (1995), "The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue," *Nature*, 375 (6532), 554-60.
224. Nguyen, A., W. R. Burack, J. L. Stock, R. Kortum, O. V. Chaika, M. Afkarian, W. J. Muller, K. M. Murphy, D. K. Morrison, R. E. Lewis, J. McNeish, and A. S. Shaw (2002), "Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation *in vivo*," *Mol Cell Biol*, 22 (9), 3035-45.
225. Nilsen, T. W. (1995), "trans-splicing: an update," *Mol Biochem Parasitol*, 73 (1-2), 1-6.
226. Nohe, A., E. Keating, P. Knaus, and N. O. Petersen (2004), "Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors," *Cell Signal*, 16 (3), 291-9.
227. Northwood, I. C., F. A. Gonzalez, M. Wartmann, D. L. Raden, and R. J. Davis (1991), "Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 669," *J Biol Chem*, 266 (23), 15266-76.
228. Novick, P. and W. Guo (2002), "Ras family therapy: Rab, Rho and Ral talk to the exocyst," *Trends Cell Biol*, 12 (6), 247-9.
229. Nunes, C. P., A. Zaha, B. Gottstein, N. Muller, and M. Siles-Lucas Mdel (2004), "14-3-3 gene characterization and description of a second 14-3-3 isoform in both *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*," *Parasitol Res*, 93 (5), 403-9.
230. Nunes, C. P., A. Zaha, B. Gottstein, N. Muller, and M. Siles-Lucas Mdel (2004), "14-3-3 gene characterization and description of a second 14-3-3 isoform in both *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*," *Parasitol Res*, 93 (5), 403-9.
231. Ohba, Y. (2001), "[Regulation of a small GTPase Rap2]," *Hokkaido Igaku Zasshi*, 76 (1), 13-20.
232. Ohba, Y., K. Kurokawa, and M. Matsuda (2003), "Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1," *Embo J*, 22 (4), 859-69.
233. Ohba, Y., N. Mochizuki, K. Matsuo, S. Yamashita, M. Nakaya, Y. Hashimoto, M. Hamaguchi, T. Kurata, K. Nagashima, and M. Matsuda (2000), "Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade," *Mol Cell Biol*, 20 (16), 6074-83.
234. Ohmachi, M., C. E. Rocheleau, D. Church, E. Lambie, T. Schedl, and M. V. Sundaram (2002), "C. elegans ksr-1 and ksr-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation," *Curr Biol*, 12 (5), 427-33.
235. Ohtsuka, T., K. Shimizu, B. Yamamori, S. Kuroda, and Y. Takai (1996), "Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein," *J Biol Chem*, 271 (3), 1258-61.

236. Okada, T., T. Masuda, M. Shinkai, K. Kariya, and T. Kataoka (1996), "Post-translational modification of H-Ras is required for activation of, but not for association with, B-Raf," *J Biol Chem*, 271 (9), 4671-8.
237. Osman, A., E. G. Niles, and P. T. LoVerde (1999), "Characterization of the Ras homologue of *Schistosoma mansoni*," *Mol Biochem Parasitol*, 100 (1), 27-41.
238. Ossorio, P. N., J. D. Schwartzman, and J. C. Boothroyd (1992), "A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry," *Mol Biochem Parasitol*, 50 (1), 1-15.
239. Oxford, G. and D. Theodorescu (2003), "Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility," *Cancer Lett*, 189 (2), 117-28.
240. Oxford, G. and D. Theodorescu (2003), "Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility," *Cancer Lett*, 189 (2), 117-28.
241. Paganini, S., G. F. Guidetti, S. Catricala, P. Trionfini, S. Panelli, C. Balduini, and M. Torti (2005), "Identification and biochemical characterization of Rap2C, a new member of the Rap family of small GTP-binding proteins," *Biochimie*.
242. Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur (1999), "Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice," *Science*, 286 (5443), 1374-7.
243. Pawson, T. (1995), "Protein modules and signalling networks," *Nature*, 373 (6515), 573-80.
244. Pawson, T. and P. Nash (2000), "Protein-protein interactions define specificity in signal transduction," *Genes Dev*, 14 (9), 1027-47.
245. Pelicci, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, T. Pawson, and P. G. Pelicci (1992), "A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction," *Cell*, 70 (1), 93-104.
246. Peng, X., J. M. Angelastro, and L. A. Greene (1996), "Tyrosine phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase 4 in response to growth factors," *J Neurochem*, 66 (3), 1191-7.
247. Pizon, V., P. Chardin, I. Lerosey, B. Olofsson, and A. Tavitian (1988), "Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the *Drosophila* gene *Dras3* encode proteins closely related to ras in the 'effector' region," *Oncogene*, 3 (2), 201-4.
248. Powers, S., T. Kataoka, O. Fasano, M. Goldfarb, J. Strathern, J. Broach, and M. Wigler (1984), "Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins," *Cell*, 36 (3), 607-12.
249. Prestrelski, S. J., T. Arakawa, C. S. Wu, K. D. O'Neal, K. R. Westcott, and L. O. Narhi (1992), "Solution structure and dynamics of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha," *J Biol Chem*, 267 (1), 319-22.
250. Price, M. A., A. E. Rogers, and R. Treisman (1995), "Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET)," *Embo J*, 14 (11), 2589-601.
251. Pritchard, C. A., L. Bolin, R. Slattery, R. Murray, and M. McMahon (1996), "Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene," *Curr Biol*, 6 (5), 614-7.
252. Rajkovic, A., R. E. Davis, J. N. Simonsen, and F. M. Rottman (1990), "A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (22), 8879-83.
253. Ramachandran, H., P. J. Skelly, and C. B. Shoemaker (1996), "The *Schistosoma mansoni* epidermal growth factor receptor homologue, SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle," *Mol Biochem Parasitol*, 83 (1), 1-10.
254. Rapp, U. R., M. D. Goldsborough, G. E. Mark, T. I. Bonner, J. Groffen, F. H. Reynolds, Jr., and J. R. Stephenson (1983), "Structure and biological activity of v-Raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (14), 4218-22.
255. Rausch, R.L. (1995), In Thompson, R.C.A. and Lymbery, A.J (Eds.), in "Echinococcus and Hydatid disease." CAB International, Wallingford.
256. Rebay, I. (2002), "Keeping the receptor tyrosine kinase signaling pathway in check: lessons from *Drosophila*," *Dev Biol*, 251 (1), 1-17.
257. Reiter, J. L., D. W. Threadgill, G. D. Eley, K. E. Strunk, A. J. Danielsen, C. S. Sinclair, R. S. Pearsall, P. J. Green, D. Yee, A. L. Lampland, S. Balasubramaniam, T. D. Crossley, T. R. Magnuson, C. D. James, and N.

- J. Maihle (2001), "Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms," *Genomics*, 71 (1), 1-20.
258. Reuter, S., A. Buck, O. Grebe, K. Nussle-Kugele, P. Kern, and B. J. Manfras (2003), "Salvage treatment with amphotericin B in progressive human alveolar echinococcosis," *Antimicrob Agents Chemother*, 47 (11), 3586-91.
259. Reuter, S., M. Merkle, K. Brehm, P. Kern, and B. Manfras (2003), "Effect of amphotericin B on larval growth of *Echinococcus multilocularis*," *Antimicrob Agents Chemother*, 47 (2), 620-5.
260. Reuther, G. W. and A. M. Pendergast (1996), "The roles of 14-3-3 proteins in signal transduction," *Vitam Horm*, 52, 149-75.
261. Reuther, G. W. and C. J. Der (2000), "The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree," *Curr Opin Cell Biol*, 12 (2), 157-65.
262. Robinson, F. L., A. W. Whitehurst, M. Raman, and M. H. Cobb (2002), "Identification of novel point mutations in ERK2 that selectively disrupt binding to MEK1," *J Biol Chem*, 277 (17), 14844-52.
263. Robinson, M. J. and M. H. Cobb (1997), "Mitogen-activated protein kinase pathways," *Curr Opin Cell Biol*, 9 (2), 180-6.
264. Rodenhuis, S., R. J. Slebos, A. J. Boot, S. G. Evers, W. J. Mooi, S. S. Wagenaar, P. C. van Bodegom, and J. L. Bos (1988), "Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung," *Cancer Res*, 48 (20), 5738-41.
265. Rojas, M., S. Yao, and Y. Z. Lin (1996), "Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor," *J Biol Chem*, 271 (44), 27456-61.
266. Rossomando, A. J., D. M. Payne, M. J. Weber, and T. W. Sturgill (1989), "Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (18), 6940-3.
267. Rottinger, E., L. Besnardeau, and T. Lepage (2004), "A Raf/MEK/ERK signaling pathway is required for development of the sea urchin embryo micromere lineage through phosphorylation of the transcription factor Ets," *Development*, 131 (5), 1075-87.
268. Roy, S., A. Lane, J. Yan, R. McPherson, and J. F. Hancock (1997), "Activity of plasma membrane-recruited Raf-1 is regulated by Ras via the Raf zinc finger," *J Biol Chem*, 272 (32), 20139-45.
269. Rubinfeld, H., T. Hanoch, and R. Seger (1999), "Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2," *J Biol Chem*, 274 (43), 30349-52.
270. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich (1988), "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase," *Science*, 239 (4839), 487-91.
271. Sanchez, F. A. and A. C. Sanchez (1971), "Estudio de algunas propiedades fisicas y componentes quimicos del liquido y pared germinativa de quistes hidatidicos de diversas especies y de diferente localizacion," *Rev Iber de Parasitol*, 31, 347-66.
272. Santos, T. M., C. R. Machado, G. R. Franco, and S. D. Pena (2002), "Characterization and comparative functional analysis in yeast of a *Schistosoma mansoni* Rho1 GTPase gene," *Mol Biochem Parasitol*, 125 (1-2), 103-12.
273. Sauma, S. and E. Friedman (1996), "Increased expression of protein kinase C beta activates ERK3," *J Biol Chem*, 271 (19), 11422-6.
274. Schaeffer, H. J., A. D. Catling, S. T. Eblen, L. S. Collier, A. Krauss, and M. J. Weber (1998), "MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade," *Science*, 281 (5383), 1668-71.
275. Schaudies, R. P., R. M. Gorman, C. R. Savage, Jr., and R. D. Poretz (1987), "Proteolytic processing of epidermal growth factor within endosomes," *Biochem Biophys Res Commun*, 143 (2), 710-5.
276. Schicker, H.J. (1976), "Die Echinokokkose des Menschen. Stand von Diagnose, Therapie und Prognose bei Echinokokkenerkrankungen in Baden-Württemberg in den Jahren 1960 - 1972," Medical dissertation, University of Tübingen.

277. Schlessinger, J. (1988), "The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein," *Biochemistry*, 27 (9), 3119-23.
278. Schlessinger, J. (2000), "Cell signaling by receptor tyrosine kinases," *Cell*, 103 (2), 211-25.
279. Schlessinger, J. (2002), "Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor," *Cell*, 110 (6), 669-72.
280. Schlessinger, J. and A. Ullrich (1992), "Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases," *Neuron*, 9 (3), 383-91.
281. Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork, and C. P. Ponting (1998), "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (11), 5857-64.
282. Schussler, P., C. G. Grevelding, and W. Kunz (1997), "Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction," *Parasitology*, 115 (Pt 6), 629-34.
283. Seger, R. and E. G. Krebs (1995), "The MAPK signaling cascade," *Faseb J*, 9 (9), 726-35.
284. Seitz, H. and M. Frosch (1994), "Der kleine Fuchsbandwurm - Erreger der alveolären Echinokokkose," *Deutsches Ärzteblatt*, 91, A-2484-93.
285. Shen, P. S., A. Lohia, and J. Samuelson (1994), "Molecular cloning of ras and rap genes from *Entamoeba histolytica*," *Mol Biochem Parasitol*, 64 (1), 111-20.
286. Shimizu, K., M. Goldfarb, Y. Suard, M. Perucho, Y. Li, T. Kamata, J. Feramisco, E. Stavnezer, J. Fogh, and M. H. Wigler (1983), "Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (8), 2112-6.
287. Shoemaker, C. B., H. Ramachandran, A. Landa, M. G. dos Reis, and L. D. Stein (1992), "Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor," *Mol Biochem Parasitol*, 53 (1-2), 17-32.
288. Siles-Lucas, M., C. P. Nunes, and A. Zaha (2001), "Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* metacestodes," *Parasitology*, 122 (Pt 3), 281-7.
289. Siles-Lucas, M., R. S. Felleisen, A. Hemphill, W. Wilson, and B. Gottstein (1998), "Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multilocularis*," *Mol Biochem Parasitol*, 91 (2), 281-93.
290. Sithanandam, G., T. Druck, L. A. Cannizzaro, G. Leuzzi, K. Huebner, and U. R. Rapp (1992), "B-Raf and a B-Raf pseudogene are located on 7q in man," *Oncogene*, 7 (4), 795-9.
291. Skelly, P. J., A. Da'dara, and D. A. Harn (2003), "Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference," *Int J Parasitol*, 33 (4), 363-9.
292. Soloaga, A., S. Thomson, G. R. Wiggin, N. Rampersaud, M. H. Dyson, C. A. Hazzalin, L. C. Mahadevan, and J. S. Arthur (2003), "MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14," *Embo J*, 22 (11), 2788-97.
293. Spaargaren, M. and J. R. Bischoff (1994), "Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (26), 12609-13.
294. Spiliotis, M. and K. Brehm (2004), "*Echinococcus multilocularis*: identification and molecular characterization of a Ral-like small GTP-binding protein," *Exp Parasitol*, 107 (3-4), 163-72.
295. Spiliotis, M., A. Kroner, and K. Brehm (2003), "Identification, molecular characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*," *Gene*, 323, 57-65.
296. Spiliotis, M., D. Tappe, L. Sesterhenn, and K. Brehm (2004), "Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions," *Parasitol Res*, 92 (5), 430-2.
297. Spiliotis, M., D. Tappe, S. Bruckner, H. U. Mosch, and K. Brehm (2005), "Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*," *Mol Biochem Parasitol*, 139 (2), 225-37.
298. Spiliotis, M., Konrad, C., Gelmedin, V., Tappe, D., Brückner, S., Mösch, H.U. and K. Brehm (2006), "Characterization of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from *Echinococcus multilocularis* which is activated in response to host epidermal growth factor," *Mol Biochem Parasitol*, submitted (2-2006)



299. Stephens, R. M., G. Sithanandam, T. D. Copeland, D. R. Kaplan, U. R. Rapp, and D. K. Morrison (1992), "95-kilodalton B-Raf serine/threonine kinase: identification of the protein and its major autophosphorylation site," *Mol Cell Biol*, 12 (9), 3733-42.
300. Sternberg, P. W. and M. Han (1998), "Genetics of RAS signaling in *C. elegans*," *Trends Genet*, 14 (11), 466-72.
301. Stettler, M., J. F. Rossignol, R. Fink, M. Walker, B. Gottstein, M. Merli, R. Theurillat, W. Thormann, E. Dri-cot, R. Segers, and A. Hemphill (2004), "Secondary and primary murine alveolar echinococcosis: combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity," *Int J Parasitol*, 34 (5), 615-24.
302. Stewart, S., M. Sundaram, Y. Zhang, J. Lee, M. Han, and K. L. Guan (1999), "Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization," *Mol Cell Biol*, 19 (8), 5523-34.
303. Stork, P. J. (2003), "Does Rap1 deserve a bad Rap?," *Trends Biochem Sci*, 28 (5), 267-75.
304. Sutton, R. E. and J. C. Boothroyd (1986), "Evidence for trans splicing in trypanosomes," *Cell*, 47 (4), 527-35.
305. Taira, K., M. Umikawa, K. Takei, B. E. Myagmar, M. Shinzato, N. Machida, H. Uezato, S. Nonaka, and K. Ka-riya (2004), "The TRaf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cy-toskeleton," *J Biol Chem*, 279 (47), 49488-96.
306. Takai, Y., K. Kaibuchi, A. Kikuchi, and M. Kawata (1992), "Small GTP-binding proteins," *Int Rev Cytol*, 133, 187-230.
307. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki (2001), "Small GTP-binding proteins," *Physiol Rev*, 81 (1), 153-208.
308. Tanoue, T. and E. Nishida (2002), "Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades," *Pharmacol Ther*, 93 (2-3), 193-202.
309. Tanoue, T. and E. Nishida (2003), "Molecular recognitions in the MAP kinase cascades," *Cell Signal*, 15 (5), 455-62.
310. Tanoue, T., M. Adachi, T. Moriguchi, and E. Nishida (2000), "A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators," *Nat Cell Biol*, 2 (2), 110-6.
311. Teis, D., W. Wunderlich, and L. A. Huber (2002), "Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction," *Dev Cell*, 3 (6), 803-14.
312. Thompson R.C.A. (1995), "Biology and systematics of *Echinococcus*," In Thompson, R.C.A. and Lymbery, A.J (Eds.), *Echinococcus and Hydatid disease*. CAB International, Wallingford
313. Thompson, R. C. and A. J. Lymbery (1990), "*Echinococcus*: biology and strain variation," *Int J Parasitol*, 20 (4), 457-70.
314. Thompson, R. C. and J. Eckert (1982), "The production of eggs by *Echinococcus multilocularis* in the laborato-ry following in vivo and in vitro development," *Z Parasitenkd*, 68 (2), 227-34.
315. Toda, T., I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka, D. Broek, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto, and M. Wigler (1985), "In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase," *Cell*, 40 (1), 27-36.
316. Trahey, M. and F. McCormick (1987), "A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants," *Science*, 238 (4826), 542-5.
317. Tytgat, T., I. Vercauteren, B. Vanholme, J. De Meutter, I. Vanhoutte, G. Gheysen, G. Borgonie, and A. Coomans (2005), "An SXP/RAL-2 protein produced by the subventral pharyngeal glands in the plant parasitic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*," *Parasitol Res*, 95 (1), 50-4.
318. Tzahar, E., G. Levkowitz, D. Karunagaran, L. Yi, E. Peles, S. Lavi, D. Chang, N. Liu, A. Yayon, D. Wen, and et al. (1994), "ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu diffe-rentiation factor/hergulin isoforms," *J Biol Chem*, 269 (40), 25226-33.
319. Ullrich, A., L. Coussens, J. S. Hayflick, T. J. Dull, A. Gray, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Libermann, J. Schlessinger, and et al. (1984), "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant ex-pression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells," *Nature*, 309 (5967), 418-25.
320. Van Aelst, L. (1998), "Two-hybrid analysis of Ras-Raf interactions," *Methods Mol Biol*, 84, 201-22.
321. van der Geer, P., T. Hunter, and R. A. Lindberg (1994), "Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways," *Annu Rev Cell Biol*, 10, 251-337.

322. Vermeire, J. J., A. Osman, P. T. LoVerde, and D. L. Williams (2003), "Characterisation of a Rho homologue of *Schistosoma mansoni*," *Int J Parasitol*, 33 (7), 721-31.
323. Vicogne, J., K. Cailliau, D. Tulasne, E. Browaeys, Y. T. Yan, V. Fafeur, J. P. Vilain, D. Legrand, J. Trolet, and C. Dissous (2004), "Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*," *J Biol Chem*, 279 (36), 37407-14.
324. Vogel, H (1978), "Wie wächst der Alveolarechinococcus?" *Tropenmed Parasitol*, 29, 1-11.
325. Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, and J. L. Bos (1988), "Genetic alterations during colorectal-tumor development," *N Engl J Med*, 319 (9), 525-32.
326. Vossler, M. R., H. Yao, R. D. York, M. G. Pan, C. S. Rim, and P. J. Stork (1997), "cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway," *Cell*, 89 (1), 73-82.
327. Wada, M., H. Nakanishi, A. Satoh, H. Hirano, H. Obaishi, Y. Matsuura, and Y. Takai (1997), "Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins," *J Biol Chem*, 272 (7), 3875-8.
328. Wagner, S., W. Beil, U. E. Mai, C. Bokemeyer, H. J. Meyer, and M. P. Manns (1994), "Interaction between *Helicobacter pylori* and human gastric epithelial cells in culture: effect of antiulcer drugs," *Pharmacology*, 49 (4), 226-37.
329. Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud, and J. A. Cooper (1997), "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2," *Embo J*, 16 (8), 1909-20.
330. Waters, S. B., D. Chen, A. W. Kao, S. Okada, K. H. Holt, and J. E. Pessin (1996), "Insulin and epidermal growth factor receptors regulate distinct pools of Grb2-SOS in the control of Ras activation," *J Biol Chem*, 271 (30), 18224-30.
331. Weeks, G. and G. B. Spiegelman (2003), "Roles played by Ras subfamily proteins in the cell and developmental biology of microorganisms," *Cell Signal*, 15 (10), 901-9.
332. Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (1996), "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways," *J Mol Med*, 74 (10), 589-607.
333. WHO-Arbeitsgruppe zur Echinokokkose (1997), "Richtlinien zur Behandlung der zystischen und alveolären Echinokokkose beim Menschen," *Chemotherapie Journal*, 6. Jahrgang, Heft 3, 111-19.
334. Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson (1999), "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human," *Physiol Rev*, 79 (1), 143-80.
335. Wiggin, G. R., A. Soloaga, J. M. Foster, V. Murray-Tait, P. Cohen, and J. S. Arthur (2002), "MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts," *Mol Cell Biol*, 22 (8), 2871-81.
336. Wojnowski, L., A. M. Zimmer, T. W. Beck, H. Hahn, R. Bernal, U. R. Rapp, and A. Zimmer (1997), "Endothelial apoptosis in B-Raf-deficient mice," *Nat Genet*, 16 (3), 293-7.
337. Wolthuis, R. M. and J. L. Bos (1999), "Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral," *Curr Opin Genet Dev*, 9 (1), 112-7.
338. Wu, C., C. F. Lai, and W. C. Mobley (2001), "Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes," *J Neurosci*, 21 (15), 5406-16.
339. Xiang, X., M. Zang, C. A. Waelde, R. Wen, and Z. Luo (2002), "Phosphorylation of 338SSYY341 regulates specific interaction between Raf-1 and MEK1," *J Biol Chem*, 277 (47), 44996-5003.
340. Xiao, N., J. Qiu, M. Nakao, T. Li, W. Yang, X. Chen, P. M. Schantz, P. S. Craig, and A. Ito (2005), "Echinococcus shiquicus n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China," *Int J Parasitol*, 35 (6), 693-701.
341. Xing, H. R. and R. Kolesnick (2001), "Kinase suppressor of Ras signals through Thr269 of c-Raf-1," *J Biol Chem*, 276 (13), 9733-41.
342. Xing, J., D. D. Ginty, and M. E. Greenberg (1996), "Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase," *Science*, 273 (5277), 959-63.

343. Xu, G. F., B. Lin, K. Tanaka, D. Dunn, D. Wood, R. Gesteland, R. White, R. Weiss, and F. Tamanoi (1990), "The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*," *Cell*, 63 (4), 835-41.
344. Yaffe, M. B., K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, and L. C. Cantley (1997), "The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity," *Cell*, 91 (7), 961-71.
345. Yan, J., S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, and J. F. Hancock (1998), "Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase," *J Biol Chem*, 273 (37), 24052-6.
346. Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L. H. Boise, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer (1995), "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death," *Cell*, 80 (2), 285-91.
347. Yang, S. H., A. J. Whitmarsh, R. J. Davis, and A. D. Sharrocks (1998), "Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1," *Embo J*, 17 (6), 1740-9.
348. Yang, S. H., E. Jaffray, R. T. Hay, and A. D. Sharrocks (2003), "Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity," *Mol Cell*, 12 (1), 63-74.
349. Yang, S. H., P. R. Yates, A. J. Whitmarsh, R. J. Davis, and A. D. Sharrocks (1998), "The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif," *Mol Cell Biol*, 18 (2), 710-20.
350. Yimam, A. E., N. Nonaka, Y. Oku, and M. Kamiya (2002), "Prevalence and intensity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes schrencki*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides albus*) in Otaru City, Hokkaido, Japan," *Jpn J Vet Res*, 49 (4), 287-96.
351. Yin, Y., Y. X. Liu, Y. J. Jin, E. J. Hall, and J. C. Barrett (2003), "PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression," *Nature*, 422 (6931), 527-31.
352. York, R. D., D. C. Molliver, S. S. Grewal, P. E. Stenberg, E. W. McCleskey, and P. J. Stork (2000), "Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1," *Mol Cell Biol*, 20 (21), 8069-83.
353. Yung, Y., Z. Yao, T. Hanoch, and R. Seger (2000), "ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK," *J Biol Chem*, 275 (21), 15799-808.
354. Zang, M., C. Hayne, and Z. Luo (2002), "Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1," *J Biol Chem*, 277 (6), 4395-405.
355. Zavala-Gongora, R., A. Kroner, B. Wittek, P. Knaus, and K. Brehm (2003), "Identification and characterisation of two distinct Smad proteins from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*," *Int J Parasitol*, 33 (14), 1665-77.
356. Zavala-Gongora, R., A. Kroner, P. Bernthaler, P. Knaus, and K. Brehm (2006), "A member of the transforming growth factor-beta receptor family from *Echinococcus multilocularis* is activated by human bone morphogenetic protein 2," *Mol Biochem Parasitol*.
357. Zhang, F. L. and P. J. Casey (1996), "Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences," *Annu Rev Biochem*, 65, 241-69.
358. Zheng, C. F. and K. L. Guan (1993), "Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2," *J Biol Chem*, 268 (15), 11435-9.
359. Zhou, B., Z. X. Wang, Y. Zhao, D. L. Brautigam, and Z. Y. Zhang (2002), "The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases," *J Biol Chem*, 277 (35), 31818-25.
360. Zhu, Y., D. Pak, Y. Qin, S. G. McCormack, M. J. Kim, J. P. Baumgart, V. Velamoor, Y. P. Auberson, P. Osten, L. van Aelst, M. Sheng, and J. J. Zhu (2005), "Rap2-JNK Removes Synaptic AMPA Receptors during Dependentiation," *Neuron*, 46 (6), 905-16.
361. Zimmermann, S. and K. Moelling (1999), "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)," *Science*, 286 (5445), 1741-4.
362. Zwartkruis, F. J. and J. L. Bos (1999), "Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function," *Exp Cell Res*, 253 (1), 157-65.
363. Zwick, E., P. O. Hackel, N. Prenzel, and A. Ullrich (1999), "The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems," *Trends Pharmacol Sci*, 20 (10), 408-12.

---

## 7 Publikationen

---

### 7.1 Originalarbeiten in Peer Review Journalen

**Spiliotis, M.**, Konrad, C., Gelmedin, V., Tappe, D., Brückner, S., Mösch, H.U. & Brehm, K., 2006  
 "Characterization of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from *Echinococcus multilocularis* which is activated in response to host epidermal growth factor.", *INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY*, 36: 1097 - 1112.

**Spiliotis, M.**, Tappe, D., Brückner, S., Mösch, H.U. & Brehm, K., 2005  
 "Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*.", *MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY*, 193: 225-237.

**Spiliotis, M.** & Brehm, K., 2004  
 "*Echinococcus multilocularis*: Identification and molecular characterization of a Ral-like small GTP binding protein.", *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*, 107: 163-172

**Spiliotis, M.**, Tappe, D., Sesterhenn, L. & Brehm, K., 2004  
 "Long-term *in vitro* cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions.", *PARASITOLOGY RESEARCH*, 92: 430-432

**Spiliotis, M.**, Kroner, A. & Brehm, K., 2003  
 "Identification, characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*.", *GENE*, 323: 57-65

Konrad, C., Kroner, A., **Spiliotis, M.**, Zavala-Góngora, R. & Brehm, K., 2003  
 "Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*.", *INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY*, 33: 301-312

### 7.2 Übersichtsartikel in Peer Review Journalen

Brehm, K., **Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R., Konrad, C., Frosch, M., 2006  
 The molecular mechanisms of larval cestode development: first steps into an unknown world.  
*PARASITOLOGY INTERNATIONAL*, in Druck.

### 7.3 Kongreßbeiträge

Brehm, K., **Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R., Konrad, C., Bernthaler, B.

"Do evolutionary conserved molecules mediate an interaction between *Echinococcus multilocularis* and its mammalian host?", Hydra-Meeting on Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites, Hydra, Greece, 06.09.-11.09. 2005

**Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R., Konrad, C., Caballero-Gamiz, R., Kroner, A., Gelmedin, V. & Brehm, K.

"Receptor kinases and the MAP-kinase cascade of *Echinococcus multilocularis* as possible targets for chemotherapy.", 6th Drug Development Seminar on Antiparasitic Chemotherapy; Bernhardt-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, Germany, 28.04.-29.04.2005

Konrad, C., **Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R., Kroner, A., Tappe, D. & Brehm, K.

"Functional characterization of insulin-, EGF- and TGF- $\beta$  signaling systems in *Echinococcus multilocularis* and their role in host-parasite-interplay.", 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Münster, Germany, 26.09-29.09.2004

Konrad, C., **Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R., Kroner, A. & Brehm, K.

"Signal transduction systems of *Echinococcus multilocularis* and their role in parasite development and host-parasite interaction.", XXIst International Congress of Hydatidology, Nairobi, Kenia, 16.08.-21.08.2004

**Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R., Konrad, C., Kroner, A. & Brehm, K.

"Molecular characterization of the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis* and the host-parasite interplay in alveolar echinococcosis.", International Symposium „Threat of Infection“, Würzburg, Germany, 25.07.-28.07.2004

**Spiliotis, M.**, Tappe, D., Sesterhenn, L. & Brehm, K.

"Development of an axenic in vitro cultivation system for *Echinococcus multilocularis* larvae.", 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie; Würzburg, Germany, 17.03.-20.03.2004. International Journal of Medical Microbiology (2004) 293 (Suppl. No. 38) 112

Konrad, C., Kroner, A., Tappe, D., **Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R. & Brehm, K.

"Identification and characterization of an insulin receptor homologue from *Echinococcus multilocularis*.", 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie; Würzburg, Germany, 17.03.-20.03.2004. International Journal of Medical Microbiology (2004) 293 (Suppl. No. 38) 113

**Spiliotis, M.**, Kroner, A., & Brehm, K.

"Funktionale Charakterisierung von EGF – Signaltransduktions-Systemen in *Echinococcus multilocularis*.", Statusworkshop der Fachgruppe „Eukaryonte Krankheitserreger“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Erlangen, Germany, 14.-15.02.2003

**Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R., Konrad, C., Kroner, A., Frosch, M. & Brehm, K.

"Signal transduction systems of *Echinococcus multilocularis* and their possible role in host-parasite communication.", 54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie; Heidelberg, Germany, 06.-10.10.2002; International Journal of Medical Microbiology (2002) 292: 257.

Brehm, K., **Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R., Kroner, A., Konrad, C., Günthel, D. & Frosch, M.

"Towards a characterization of the hormone-based interaction between the cestode *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host.", International Meeting on „Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites“, Hydra, Greece, 14-19.09.2002

Konrad, C., **Spiliotis, M.**, Kroner, A., Frosch, M. & Brehm, K.

"The *Echinococcus multilocularis* larval stage expresses surface receptor tyrosine kinases with high homology to mammalian EGF- and IGF-receptors.", Joint annual Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology; Lübeck-Travemünde, Germany, 20-23.03.2002

**Spiliotis, M.**, Frosch, M. & Brehm K.

"Identification and molecular characterization of small G proteins and MAP-kinase cascade factors of the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*.", Joint annual Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology; Lübeck-Travemünde, Germany, 20-23.03.2002

Brehm, K., **Spiliotis, M.**, Zavala-Gongora, R., Kroner, A. & Frosch, M.

"Molekulare Charakterisierung von Signaltransduktionssystemen des Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis*.", Statusworkshop der Fachgruppe „Eukaryontische Krankheitserreger“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie; Hannover, Germany, 08.-09.02.2002

**Spiliotis, M.**, Kroner, A., Konrad, C., Frosch, M. & Brehm, K.

"Characterization of receptor tyrosine kinases and Ras/MAPK cascade signal transduction elements of the fox – tapeworm *Echinococcus multilocularis*.", 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie; Aachen, Germany, 30.09.-04.10.2001; International Journal of Medical Microbiology (2001) 291: P193.