

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

**Klonierung und Charakterisierung von Rezeptorkinasen der EGF-
und TGF β - Familie des kleinen Fuchsbandwurmes, *Echinococcus
multilocularis***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Antje Kroner
aus Würzburg

Würzburg, August 2002

Referent: Professor Dr. med. M. Frosch

Koreferent: Professor Dr. rer. nat. M. Leippe

Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.2003

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Allgemeine Biologie der Echinokokken | 1 |
| 1.2 Der Lebenszyklus von <i>Echinococcus multilocularis</i> | 2 |
| 1.3 Molekularbiologie von <i>E. multilocularis</i> | 4 |
| 1.4 Krankheitsbild und Diagnostik der alveolären Echinokokkose | 5 |
| 1.5 Therapie der alveolären Echinokokkose | 7 |
| 1.6 Wirt- Parasit Interaktion | 7 |
| 1.7 Tyrosinkinasen der EGF- Rezeptorfamilie | 8 |
| 1.8 Serin- Threoninkinasen der TGF β - Rezeptorfamilie | 12 |
| 1.9 Smad- Signaltransduktionsfaktoren | 13 |
| 1.10 Ziele dieser Arbeit | 15 |
| 2 Material und Methoden | 16 |
| 2.1 Geräte | 16 |
| 2.2 Verbrauchsmaterial | 17 |
| 2.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme | 17 |
| 2.4 Lösungen und Puffer | 19 |
| 2.5 Parasitenmaterial | 20 |
| 2.6 Bakterienstämme | 20 |
| 2.7 Plasmide | 20 |
| 2.8 Medien und Platten | 21 |
| 2.9 Oligonukleotide (Primer) | 21 |
| 2.10 Techniken zur Arbeit mit Parasitenmaterial | 26 |
| 2.10.1 Kultivierung von <i>E. multilocularis</i> Metazestoden | 26 |
| 2.10.2 Isolierung und Aufbereitung von Larvengewebe | 26 |
| 2.11 Techniken zum Umgang mit RNA | 27 |
| 2.11.1 RNA Präparation aus Larvengewebe von <i>E. multilocularis</i> | 27 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.11.2 | Präparation von Zysten-RNA | 28 |
| 2.11.3 | Präparation von Protoskolex-RNA | 28 |
| 2.11.4 | Denaturierende Agarose- Gelelektrophorese für RNA | 29 |
| 2.12 | Techniken zum Umgang mit DNA | 29 |
| 2.12.1 | Präparation chromosomaler DNA aus Echinokokken | 29 |
| 2.12.2 | Phenolisierung und Ethanolfällung von DNA | 30 |
| 2.12.3 | Photometrische Nucleinsäure- Konzentrationsbestimmung | 31 |
| 2.12.4 | Restriktionsenzymverdau von DNA | 31 |
| 2.12.5 | DNA Ligation | 32 |
| 2.13 | cDNA Synthese mit SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit | 32 |
| 2.14 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 34 |
| 2.14.1 | PCR mit degenerierten Primern | 35 |
| 2.14.2 | Nested PCR | 36 |
| 2.14.3 | 5' / 3' RACE | 36 |
| 2.14.4 | Inverse PCR | 37 |
| 2.15 | Gelelektrophorese | 37 |
| 2.15.1 | Agarose-Gelelektrophorese für DNA | 37 |
| 2.15.2 | Isolierung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen | 38 |
| 2.15.3 | Polyacrylamid- Gelelektrophorese | 38 |
| 2.15.4 | Silberfärbung der PAA-Gele | 39 |
| 2.15.5 | Isolierung von DNA aus PAA-Gelen | 40 |
| 2.15.6 | Marker für die Gelelektrophorese | 40 |
| 2.16 | Klonierung | 41 |
| 2.16.1 | Transformation in CaCl ₂ kompetente Zellen | 41 |
| 2.16.2 | Kulturbedingungen | 42 |
| 2.16.3 | Transformanden- Kontrolle mittels PCR | 42 |
| 2.16.4 | Mini- Präparation von Plasmid- DNA | 43 |

| | |
|--|------------|
| 2.17 Automatisierte DNA Sequenzierung | 43 |
| 2.17.1 Sequenzanalysen | 44 |
| 3 Ergebnisse | 45 |
| 3.1 Identifizierung von cDNAs, die für Rezeptorhomologe aus der EGF- und TGF β Rezeptorfamilie in <i>E.multilocularis</i> kodieren | 45 |
| 3.2 Charakterisierung und Strukturmerkmale von EmRTK1 | 51 |
| 3.3 Charakterisierung und Strukturmerkmale von EmRSK1 | 60 |
| 3.4 Charakterisierung und Strukturmerkmale von EmSmadA | 68 |
| 3.5 Experimente zum Nachweis der Parasiten- Spezifität der identifizierten Faktoren | 77 |
| 3.6 Experimente zur Prozessierung der identifizierten Transkripte über den Mechanismus des Transspleißens | 79 |
| 3.7 Vergleich der Expression in Metacestode und Protoskolex | 81 |
| 4 Diskussion | 83 |
| 5 Zusammenfassung | 91 |
| 6 Literaturverzeichnis | 93 |
| 7 Anhang | 108 |
| 7.1 Abkürzungen | 108 |
| 7.2 EmRTK1 Genomische DNA Sequenz | 110 |
| 7.3 EmRSK1 Genomische DNA Sequenz | 116 |
| 7.4 EmSmadA Genomische DNA Sequenz | 116 |