

1. Einleitung:

1.1 Allgemeine Biologie der Echinokokken:

Der Genus *Echinococcus* gehört phylogenetisch dem Stamm der *Plathelminthes* (Plattwürmer), der Klasse der *Cestoda* (Bandwürmer) und der Unterklasse der *Eucestoda* (echte Bandwürmer) an.

Man unterscheidet derzeit vier Echinokokken- Arten anhand von morphologischen Unterschieden ihrer Adult- und Larvenstadien: *E. multilocularis*, *E. granulosus*,

E. oligarthrus und *E. vogeli* (Rausch et al., 1984).

Alle *Echinococcus*- Arten sind durch einen komplexen Lebenszyklus gekennzeichnet, der neben dem strobilären Adultstadium stets die drei Larvenstadien Oncosphäre (=Sechshakenlarve), Metacestode (=Finne) und Protoskolex beinhaltet. Eindeutige Unterschiede finden sich vor allem bezüglich des Wirtsspektrums der *Echinococcus*- Arten: *E. multilocularis* und *E. granulosus* unterscheiden sich beispielsweise sowohl im Bezug auf ihre bevorzugten Endwirte (Fuchs im Gegensatz zu Hund), als auch im Hinblick auf ihre Zwischenwirte (kleine Nager gegenüber domestizierten Nutztieren). Die unterschiedlichen Wirtsspektren bedingen eine geographisch unterschiedliche Verteilung der *Echinococcus*- Arten. *E. granulosus* ist weltweit verbreitet (überall dort, wo Nutztiere und Hunde durch den Menschen gehalten werden), wohingegen

E. multilocularis beschränkt auf das Verbreitungsgebiet des Rot- und Polar-Fuchses anzutreffen ist (Nördliche Hemisphäre). *E. vogeli* und *E. oligarthrus* sind aufgrund ihres engeren Zwischenwirts- Spektrums fast ausschließlich in Süd- und Mittelamerika beheimatet (Thompson et al., 1995).

Morphologisch wird das Adultstadium der Echinokokken in drei Abschnitte gegliedert: Den Skolex (Kopf), der stets mit einem Hakenkranz (Rostellum) und vier Saugnäpfen versehen ist; eine Proliferationszone, in der die Neubildung von Bandwurmgliedern (Proglottiden) erfolgt und eine Strobila (Gliederkette), die charakteristischerweise aus drei bis fünf Proglottiden besteht. Echinokokken

sind lediglich bis zu 5 mm lang, wesentlich kürzer als die nahe verwandten Bandwürmer des Genus *Taenia*, die eine Länge von bis zu 10 m erreichen können.

Das erste Larvenstadium, die Oncosphäre, ist ein mehrzelliger, mit Haken ausgestatteter Organismus, dessen Beweglichkeit durch Muskelzellen ermöglicht wird. Das zweite Larvenstadium, die Metacestode, hingegen, ist morphologisch eine flüssigkeitsgefüllte Blase, deren distale Oberfläche von einer azellulären Laminatschicht aus Proteinen und Polysacchariden gebildet wird. Diese Schicht verleiht der Metacestode strukturelle Festigkeit und ist am Schutz des Parasiten vor dem Wirts-Immunsystem beteiligt (Ewald et al., 1992). Unterhalb dieser Schicht befindet sich die zelluläre Keimschicht, die ein mit Zellfortsätzen (Microtriches) ausgestattetes, synzytiales Tegument umfaßt, welches wiederum über Plasmabrücken mit ein bis zwei Lagen darunter befindlicher Zellen verbunden ist.

Der Protoskolex, das dritte Larvenstadium, ist als Vorform des Adultstadiums anzusehen, da er einen mit Haken und Saugnäpfen ausgestatteten Skolex darstellt, der noch keine Proliferationszone gebildet hat.

1.2 Der Lebenszyklus von *Echinococcus multilocularis* (Abbildung 1):

Wie eingangs bereits erwähnt, fungiert der Fuchs als Haupt- Endwirt von *E. multilocularis* und beherbergt das strobiläre Adultstadium, welches sich über das Rostellum und die Saugnäpfe im Dünndarm festsetzt. Als Endwirte für *E. multilocularis* können jedoch neben Füchsen auch andere Karnivore wie z.B. Kojoten, Hunde oder Katzen dienen.

Sowohl nach Selbst- als auch nach Fremdinsemination der hermaphroditischen Adultwürmer kommt in der endständigen, graviden Proglottide zur Bildung sogenannter „infektiöser Eier“, welche die Oncosphäre enthalten. Diese Eier werden mit der Fuchslosung in die Umgebung abgegeben (Thompson & Eckert, 1982). Die Oncosphäre schlüpft nach Aufnahme durch den Zwischenwirt aus der Eihülle, penetriert aktiv das Darmepithel und gelangt so über das Pfortadersystem in die inneren Organe des Zwischenwirts (Swiderski, 1983).

Das bevorzugte Zielorgan stellt hierbei die Leber dar, die in über 90% der Fälle befallen wird. In der Leber wandelt sich die Oncosphäre zur Metacestode um, welche zunächst eine Volumenvergrößerung durchläuft und sich anschließend durch Sprossung von Tochterzysten asexuell vermehrt. So entsteht die typische, multivesikuläre Erscheinungsform der *E. multilocularis* - Finne, welche, ähnlich einem malignen Tumor, das umliegende Wirtsgewebe infiltriert. Ausgehend von der Keimschicht der Metacestode kommt es in natürlichen Zwischenwirten schließlich zur Bildung von Protoskolizes. Deren Entwicklungsdauer beträgt zwischen zwei und vier Monaten, und ist vermutlich der kurzen Lebensdauer des Wirts angepaßt (Rausch, 1975).

Wenn der Zwischenwirt durch einen Endwirt gerissen wird, gelangen die Protoskolizes wieder in ein geeignetes Milieu (den Dünndarm des Endwirtes), um zum Adultwurm heranzuwachsen. Der Fuchsbandwurm ist also zur Vollendung seines Lebenszyklus auf ein natürliches Räuber- Beute- Verhältnis zweier Säuger angewiesen.

Durch Aufnahme infektiöser Eier kann auch der Mensch an die Stelle natürlicher Zwischenwirte treten. Auch in diesem Fall kommt es zu einer Entwicklung der Metacestode in der Leber. Interessanterweise bleibt bei Humaninfektionen die Bildung von Protoscolizes (anders als bei Infektionen mit *E. granulosus*) aus noch unbekanntem Gründen in der Regel aus, wobei möglicherweise das Fehlen essentieller Differenzierungsfaktoren eine Rolle spielt. Für *E. multilocularis* ist der Mensch also als Fehlwirt anzusehen (Seitz & Frosch 1994). Bei Übertragung von Metacestoden aus infizierten Menschen auf natürliche Zwischenwirte setzt die

Differenzierung zum Protoskolexstadium jedoch wieder ein (K. Brehm, persönliche Mitteilung).

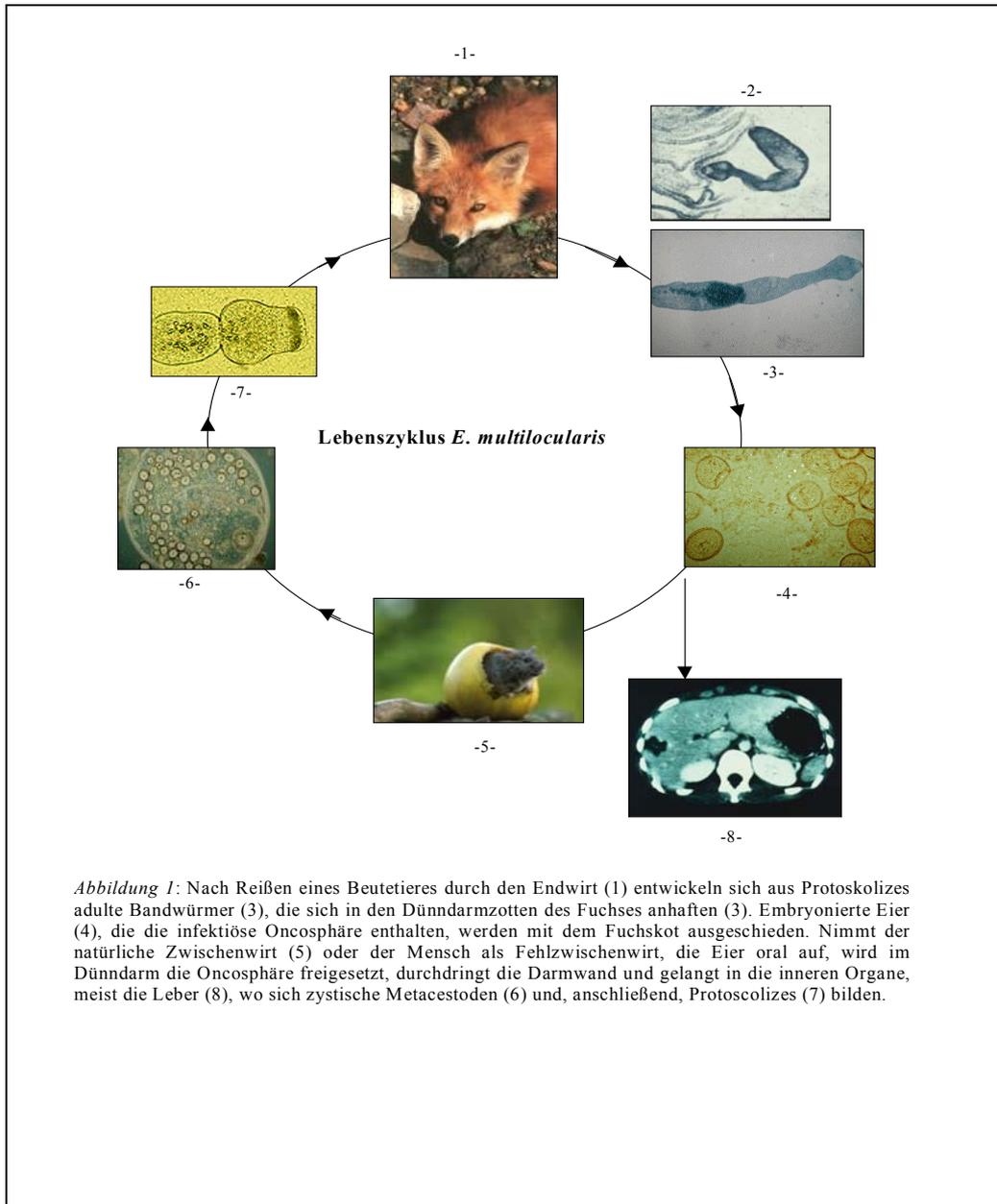


Abbildung 1: Nach Reißen eines Beutetieres durch den Endwirt (1) entwickeln sich aus Protoskolizes adulte Bandwürmer (3), die sich in den Dünndarmzotten des Fuchses anhaften (3). Embryonierte Eier (4), die die infektiöse Oncosphäre enthalten, werden mit dem Fuchskot ausgeschieden. Nimmt der natürliche Zwischenwirt (5) oder der Mensch als Fehlwirt, die Eier oral auf, wird im Dünndarm die Oncosphäre freigesetzt, durchdringt die Darmwand und gelangt in die inneren Organe, meist die Leber (8), wo sich zystische Metacestoden (6) und, anschließend, Protoscolizes (7) bilden.

1.3 Molekularbiologie von *E. multilocularis*:

Die Differenzierung der Echinokokkenspezies beruhte lange lediglich auf epidemiologischen und ultrastrukturellen Studien, bis Mitte der 1980er Jahre waren nur wenige molekularbiologische Grundlagen von *E. multilocularis* bekannt. Damals wurden erste cDNA Banken mit dem Ziel angelegt, Antigene

zur serologischen Diagnostik zu entwickeln. Die Antigene EM10 (Elp) (Frosch et al., 1991) und EM2a (Gottstein, 1985) konnten dabei beschrieben werden.

Für *E. multilocularis* gelang 1999 der Nachweis des Transsplicing. Dabei wird ein 36 Basenpaare langes Mini- Exon, der Spliced Leader, an die 5' Enden von ca. 30% aller Primärtranskripte gespleißt (Brehm et al., 2000). Die Tatsache, daß ein großer Teil der *E. multilocularis* cDNAs eine identische Leadersequenz am 5' Ende hat, konnte bereits ausgenutzt werden, um über PCR basierte Methoden sogenannte SL- cDNA Bibliotheken anzulegen (Brehm et al., 1999). Eine Grundlage zur weiteren Erforschung beschriebener Gene bildete ein System zur Kokultivierung von Hepatozyten und Echinokokkenlarven, an dem *in vitro* die Situation eines infizierten Organs nachgestellt werden kann (Jura et al., 1996; Hemphil & Gottstein 1995; Gottstein et al., 1992).

1.4 Krankheitsbild und Diagnostik der alveolären Echinokokkose:

Durch das vom Immunsystem des Wirts nicht zu kontrollierende Wachstum der Metacestode in der Leber des Zwischenwirts kommt es zum Krankheitsbild der alveolären Echinokokkose, der gefährlichsten Parasitose der nördlichen Hemisphäre (Rausch, 1995). In den Endemiegebieten Süddeutschland, Schweiz und Österreich sind bis zu 60% der Füchse Träger von *E. multilocularis* (Gottstein, 2000). Die Zahl der befallenen Füchse korreliert mit der Inzidenz der alveolären Echinokokkose (Gottstein et al., 2001), welche in den Endemiegebieten 0,14- 0,7 Infektionen pro 100000 Personen pro Jahr beträgt (WHO 1997).

Die Humaninfektion äußert sich in Form von Parasitenwachstum in verschiedenen Organen, bevorzugt der Leber. Nach langer Inkubationszeit von 10- 15 Jahren, weshalb der Infektionsweg oft nicht mehr zurückverfolgt werden kann, wächst der Parasit, einem Malignom ähnlich, invasiv und destruiierend (Vogel, 1978). Die Symptome gleichen einer Leberneoplasie: Meist bleiben die Beschwerden uncharakteristisch, gelegentlich kommt es zu Cholestase oder Hepatomegalie (Ammann, 1995).

Später können sich metastatische Absiedelungen in Lunge, Knochen und Gehirn bilden. Der Wirt ist nicht in der Lage, eine echte Wirts- Parasit - Barriere im Sinne einer Lamina adventitia, wie bei der cystischen Echinokokkose, auszubilden. Im histologischen Bild umgibt den Parasiten ein lymphozyten- und histiozytenreiches Infiltrat (Miguet & Bresson- Hadni, 1989), das später einer chronischen Entzündungsreaktion weicht (Ammann & Eckert, 1995).

Die zur Verfügung stehenden diagnostischen Mittel sind außer anamnestischen und klinischen Untersuchungen bildgebende und serologische Verfahren: Als Screeningmethode wird die Sonographie verwendet, Computertomographie und Magnetresonanztomographie bestätigen die Diagnose. Gelegentlich kann sich die Differentialdiagnose zur Neoplasie schwierig gestalten (Haertel et al., 1980; Choji et al., 1992).

Da im Routinelabor keine spezifischen Veränderungen nachweisbar sind (Bub et al., 1975; Bresson- Hadni et al., 1988), stützt sich die serologische Diagnostik auf antigenspezifische ELISA Tests, mit deren Hilfe zwischen alveolärer und cystischer Echinokokkose differenziert werden kann, Immunfluoreszenztest (IFT) und indirekte Hämagglutination (IHA) (Kern et al, 1994). Darüber hinaus stehen monoklonale Antikörper gegen parasitische Antigene im Serum zur Verfügung. So wird EM10 (Frosch et al., 1991) als GST Fusionsprotein als Antigen zur Detektion der alveolären Echinokokkose (AE) mit einer Spezifität von 99% und einer Sensitivität von 89% verwendet (Siles Lucas & Gottstein 2001).

Daneben existieren weitere Antigene zur Serodiagnostik z.B. EM2 als Bestandteil der Laminatschicht (Gottstein et al., 1992), EM18 und EM16 (Ito et al., 1995) und EM13 (Frosch et al., 1993).

PCR Methoden kommt bei der Diagnostik der AE lediglich eine untergeordneter Bedeutung zu (Brehm et al., 1999a).

1.5 Therapie der alveolären Echinokokkose:

Unbehandelt führt die AE innerhalb von zehn Jahren mit 90% Wahrscheinlichkeit zum Tod (Schicker, 1976; Ammann et al., 1999).

Die Therapie der Wahl bei alveolärer Echinokokkose ist die Radikaloperation, die bei früher Diagnosestellung zur Heilung führt, allerdings nur in 20- 30% der Fälle durchführbar ist. Palliativoperationen mit Teilresektionen haben sich nicht bewährt (Ammann et al., 1994).

Adjuvant oder bei nicht vollständig resezierbaren Tumoren werden parasitostatische Benzimidazolpräparate (Mebendazol und Albendazol) verwendet (Amman et al., 1988), die an helminthenspezifische Regionen in β -Tubulinen binden (Brehm et al., 1999; Jura et al., 1998).

Lebertransplantationen haben sich nicht ausreichend bewährt, da durch die immunsuppressive Therapie oftmals Metastasenbildung und Reinfektion des Transplantats auftraten (Brehm et al, 1999 a).

Unter Therapie kann die 10- Jahresüberlebesrate auf 90% verbessert werden (Amman et al., 1999).

1.6 Wirt- Parasit Interaktion:

Für eine erfolgreiche Entwicklung benötigt *E. multilocularis* hochkomplexe Zell-Zell Kommunikationssysteme, die sicherstellen, daß die Differenzierung zum jeweils folgenden Larvenstadium zum richtigen Zeitpunkt und am richtigen Ort innerhalb des Wirtsorganismus initiiert wird. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß der Zeitpunkt der Echinokokken- Morphogenese vom Erhalt eines vom Wirt gesendeten Signals abhängt. Dies kann aus den Tatsachen geschlossen werden, daß die Metacestode sich nahezu ausschließlich in der Leber des Wirts entwickelt und daß für die Entstehung von Protoscolizes ein natürlicher Zwischenwirt, wie z.B. ein Nagetier, erforderlich ist während sie bei Humaninfektionen meist ausbleibt (Gottstein & Hemphill, 1997). Signifikante Einflüsse des Wirts konnten durch *in vitro* Kulturstudien bewiesen werden: Es wurde gezeigt, daß die Entwicklung sowohl der Oncosphäre zur Metacestode

(Gottstein et al., 1992) als auch die asexuelle Proliferation der Metacestode in den Zielorganen (Jura et al., 1996; Hemphill & Gottstein, 1995) stark von löslichen Wachstumsfaktoren mit einem niedrigen Molekulargewicht bis 15 kDa abhängt, die von Säugerhepatozyten sezerniert werden (Jura et al., 1996).

Diese Beschreibung trifft unter anderem auf Wachstumsfaktoren der Epidermal Growth Factor (EGF) - Familie (EGF und TGF α), sowie der Transforming Growth Factor (TGF) β - Familie (TGF β , Activin und Bone Morphogenetic Protein) zu. Während der Leberregeneration nach Schädigungen unterschiedlicher Ursache werden diese vermehrt sezerniert und zeigen einen deutlichen Einfluß auf das Leberwachstum (Fausto et al., 1995). Durch RT-PCR konnte gezeigt werden, daß Leberzellen tatsächlich auch in der *in vitro* Kultur die genannten Wachstumsfaktoren exprimieren (K. Brehm, persönliche Mitteilung).

Bis jetzt sind die molekularen Mechanismen der Echinokokken Entwicklung und ihrer Interaktion mit dem Zwischenwirt nicht vollständig aufgeklärt, sie können jedoch, unter Verwendung der etablierten *in vitro* Systeme (Gottstein et al., 1992; Jura et al., 1996 ; Hemphill et al., 1995) für die Larvenentwicklung, experimentell untersucht werden.

Um diese Studien zu vereinfachen war es notwendig, zunächst noch unbekannte Wachstumsregulationsfaktoren des Parasiten zu charakterisieren.

Ein Grundmechanismus, der von den Metazoen zur Regulation von Zellwachstum und Differenzierung verwendet wird, beinhaltet die Bindung hormonaler Wachstumsfaktoren an Rezeptorkinasen die an der Oberfläche von Zielzellen exprimiert werden. Diese Rezeptorkinasen bestehen üblicherweise aus einer extrazellulären Domäne welche die Liganden bindet, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Kinasedomäne, die für die intrazelluläre Signalweiterleitung erforderlich ist.

1.7 Tyrosinkinasen der EGF- Rezeptorfamilie:

Rezeptortyrosinkinasen werden an der Zelloberfläche exprimiert und bestehen aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einer membranspannenden

Domäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität, die für die intrazelluläre Signalweiterleitung verantwortlich ist (Hubbard & Till, 2000; Van der Geer et al., 1994). Diese Rezeptorkinasen sind an Schlüsselprozesse der Zelle, wie Metabolismus und Wachstum maßgeblich beteiligt (Schlessinger & Ullrich, 1992).

Die Bindung eines Liganden führt normalerweise zu einer Dimerisierung des Rezeptors, gefolgt von Autophosphorylierung an Tyrosinresten in der TK Domäne und Bindung und Phosphorylierung von Downstreamfaktoren wie Molekülen, die eine Src- homologe Domäne (Sh₂) enthalten (Hubbard & Till, 2000; Van der Geer et al., 1994). Anhand der typischen extrazellulären Domänenstruktur können verschiedene Untergruppen von RTK identifiziert werden, zwei davon werden hochkonserviert von den meisten, wenn nicht sogar von allen, Metazoen exprimiert: Faktoren der Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) Familie und der Insulin Rezeptor (IR) Familie (Hubbard & Till, 2000). Im Falle der EGFR konnten bereits Homologe in vielen Organismen identifiziert werden, wie Chordaten (Hubbard & Till, 2000; Van der Geer et al., 1994), Insekten (Klambt, 2000; Casci & Freeman, 1999), Nematoden (Greenwald 1990; Dissanayake, 2000) und Trematoden (Ramachandran et al., 1996).

Am besten erforscht ist der humane EGF- Rezeptor. Dieser Rezeptor beinhaltet eine Signalsequenz („Secretory Leader“), eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne, eine hydrophobe Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität, an der Autophosphorylierung und Phosphorylierung von Folgeproteinen stattfindet (Ullrich & Schlessinger, 1990). An die extrazelluläre Bindungsdomäne dieser integralen Membranproteine können sowohl EGF als auch TGF α binden, die als monomere, wachstumsregulierende Hormone von ca. 6 kDa wirken. Die Bindung eines Liganden an die cysteinreiche Domäne aktiviert die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne und initiiert so den intrazellulären Ablauf einer Signaltransduktionskaskade. Die Tyrosinkinasedomänen der EGF Rezeptorfamilie von Organismen unterschiedlichen phylogenetischen

Ursprungs weisen eine deutliche Homologie auf, wohingegen die Homologie der extrazellulären cysteinreichen Domäne gering ist (Schlessinger, 1988).

In Abwesenheit des Wachstumsfaktors liegt der Rezeptor als Monomer vor. Bei Bindung von EGF oder TGF α erfolgt eine Dimerisierung (Yarden & Schlessinger, 1987) und Autophosphorylierung des Rezeptors. Der genaue Mechanismus ist bis heute nicht bekannt, man geht von einer ligandeninduzierten Konformationsänderung des Rezeptors aus (Greenfield et al., 1989). Möglicherweise liegt der Liganden- Rezeptor Komplex als Tetramer aus je zwei Liganden und Rezeptoren vor. Dieses Modell erklärt, warum Heterodimerisation nur innerhalb einer und nicht zwischen verschiedenen Rezeptortyrosinkinasefamilien stattfinden kann (Lemmon et al., 1997). Das katalytische Zentrum eines Monomers phosphoryliert fünf Tyrosinreste, die nahe dem carboxyterminalen Ende auf dem anderen Monomer liegen. Im weiteren Verlauf werden im Rahmen einer Signalkaskade Folgeproteine durch Phosphorylierung aktiviert.

Der am besten erforschte stromabwärts gelegene Signaltransduktionsweg ist der MAPkinase- Pathway (Abbildung 2), der eine Schlüsselrolle in der Signalübermittlung von der Zelloberfläche in den Zellkern einnimmt und somit Zellwachstum und Zelldifferenzierung beeinflusst (Liebmann, 2001).

Der EGF Rezeptor steuert nach Dimerisierung eine Komplexbildung der Proteine Shc, Grb-2 und SOS, welche dann kleine GTP bindende Proteine (sGTP- BPs) der Ras Familie, wie Ras, Rap oder Ral, aktivieren. Solche aktivierten sGTP-BPs stimulieren die MAPkinase- Kaskade über MAPKKs (MAPkinasekinase), wie z.B. Raf, welches über 14-3-3 Proteine an die Zellmembran assoziiert wird. Alle Proteine der MAPkinase- Kaskade sind Serin/Threoninkinasen, die im Folgenden MAPKKs (MAPkinasekinase) phosphorylieren und damit aktivieren können. MAPKKs aktivieren wiederum MAPKs (MAPkinase), die dann schließlich die Expression von Zielgenen im Zellkern beeinflussen, meist durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, welcher aus Homo- und Heterodimeren der Oncogene c-Jun und c-Fos besteht (Karin et al., 1997).

Obwohl die Ras- MAP Kinase Signalkaskade vielfach von Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) verwendet wird, um Gentranskription zu aktivieren, können RTKs auch direkt cytoplasmatische Transkriptionsfaktoren aktivieren. Es handelt sich hier um STATs (Signal transducers and activators of transcription) (David et al., 1996). Im Gegensatz zu den mitogenen Ras-MAPkinase Signalen könnten STATs eine antimitogene Rolle in der Kontrolle von Proliferation durch RTKs spielen. (Hackel et al., 1999).

Jeder Rezeptor hat eine Anzahl verschiedener Tyrosinautophosphorylierungsstellen, die als Andockpositionen für Sh₂- Proteine dienen und so eine Signaltransduktion auf spezifischen Wegen ermöglichen. So kann beispielsweise bei Stimulation durch einen Liganden die Reaktion auf Wachstum und Chemotaxis, bei Einsatz eines anderen Liganden nur in Chemotaxis bestehen (Elenius et al., 1997). Verschiedene oder auch gleiche Liganden können also verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren, z.B. Ras/ MAP Kinase abhängige und unabhängige Wege.

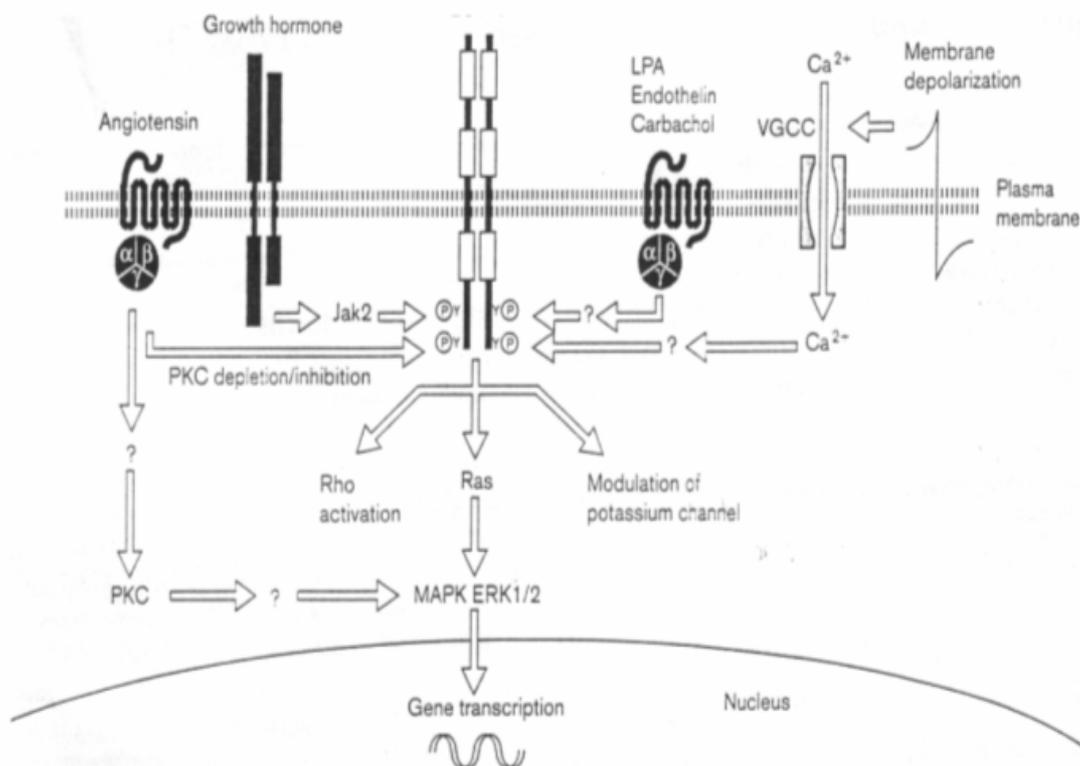


Abbildung 2: Funktion von Rezeptortyrosinkinase und MAPKinase Signaltransduktionsweg (Hackel et al., 1999)

1.8 Serin- Threoninkinasen der TGF- β - Rezeptorfamilie:

Die Mehrheit der Wachstumsfaktoren aus der TGF- β Superfamilie wie TGF- β , Activin, Inhibin und BMP (Bone morphogenetic Protein) übermitteln ihre Signale über Oberflächenrezeptoren mit Serin/ Threoninkinaseaktivität (Lin & Lodish, 1993; Massague et al., 1994; Miyazono, 1994), wobei die Wachstumsfaktoren als Homo- oder Heterodimere aktiv sind, so etwa TGF β als Homodimer von 2x 15 kDa. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Zellen. Verschiedene Mitglieder der TGF- β Rezeptorengruppe wurden in Vertebraten (Boyd et al., 1990), Insekten (Hogan, 1994; Wharton, 1995) und Helminthen wie *S. mansoni* (Davies et al., 1995) und *Brugia pahangi* (Gomez- Escobar et al., 1997) charakterisiert.

TGF- β Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären, einer Transmembran - und einer intrazellulären Domäne. Die intrazelluläre Domäne besitzt Serin/ Threoninkinaseaktivität .

Der TGF- β Rezeptorfamilie gehören die Subfamilien der TGF β -, Activin- und BMP- Rezeptoren an. Innerhalb dieser Subfamilien zeigen Rezeptoren unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft starke strukturelle und funktionelle Konservierung (Graff et al., 1994). Diese ist so ausgeprägt, daß der *C. elegans* Rezeptor, für den *daf-4* codiert, humanes BMP 2 und 4 binden kann (Estevez et al., 1993). Vergleichbar binden die *D. melanogaster* Homologen Sax und Tkv humanes BMP 2 (Brummel et al., 1994), der Drosophila- Activin Rezeptor kann humanes Activin binden (Childs et al., 1993), obwohl in der extrazellulären Domäne, außer hochkonservierten Cysteinen, nur geringe Sequenzhomologien bestehen.

Man unterscheidet Typ I und Typ II Rezeptoren, die beide Kinaseaktivität besitzen und als Komplex reagieren (Kingsley, 1994).

Der Typ I Rezeptor ist durch eine Glycin- Serin reiche Domäne, das sogenannte GS-Motiv, im membrannahen Anteil der intrazellulären Domäne gekennzeichnet (Wrana et al., 1994 a, b). Die Bindung des Liganden an den Typ II Rezeptor führt zur Bildung eines heterodimeren Komplexes von Typ II mit dem Typ I Rezeptor. Dieser Komplex ist für die Signalübermittlung essentiell. Der Typ II

Rezeptor phosphoryliert die SG- Domäne des Typ I Rezeptors und macht so die Signalweitergabe an die Folgeproteine möglich (Wrana et al., 1994 a) (Abbildung 3).

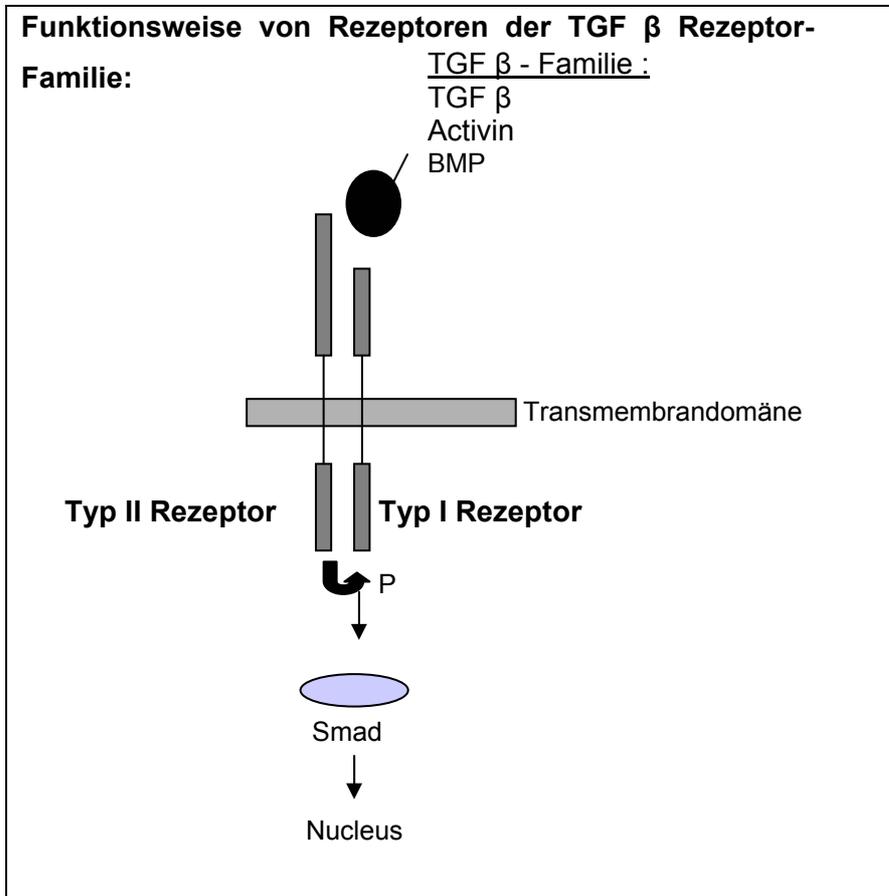


Abbildung 3: Funktionsweise von Rezeptoren der TGF β Rezeptor- Familie

1.9 Smad- Signaltransduktionsfaktoren:

Die Signalweiterleitung der TGF β - Rezeptoren zwischen Membran und Nucleus wird über sogenannte Smad- Faktoren vermittelt (Abbildung 4) (Kretschmar & Massague, 1998). Die Smad- Familie lässt sich in drei Untergruppen aufteilen:

Rezeptorregulierte Smads (R- Smads), die durch Typ I Rezeptoren der TGF- β -, Activin-(Untergruppe AR Smads), und BMP Familie (BR- Smads) aktiviert werden, Smads, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (Co- Smads) und

sogenannte Anti- Smads (Miyazono et al., 2001), welche die Signaltransduktion aktiv durch Assoziation an den Rezeptor hemmen (Nakao et al., 1997).

Rezeptorregulierte Smads werden nach Aktivierung in den Kern transloziert, wo sie Komplexe mit DNA- bindenden Proteinen bilden und so die Transkription von Zielgenen beeinflussenden. Diese Signalübermittlung ist abhängig von der Anwesenheit eines Co- Smads (in Vertebraten z.B. Smad 4), das nicht von Rezeptorkinasen phosphoryliert wird.

Smads bestehen aus drei Domänen, der hochkonservierten aminoterminalen MH1 (Dwarfin A) und der carboxyterminalen MH2 (Dwarfin B) Domäne, die von einer variablen, prolinreichen Linkerregion verknüpft werden (Beall et al., 2000; Massague et al., 1997).

Co- Smads und Anti- Smads unterscheiden sich von R- Smads durch das Fehlen eines carboxyterminalen SSXS Motivs (Kretschmar & Massague, 1998), dessen Serinreste den Ort der Phosphorylierung durch den Typ I Rezeptor bilden (Kretschmar et al., 1997).

Die MH 2- Domäne enthält die Regionen für die rezeptorregulierte Phosphorylierung und Aktivierung und kann als Effektor- Domäne betrachtet werden, da sie zudem für Interaktionen zwischen R- und Co- Smads notwendig ist.

Die Aufgabe der MH1 Domäne ist vom Aktivierungszustand abhängig: Im nicht-phosphorylierten Zustand hemmt die MH1 Domäne die biologische Aktivität der MH2 Domäne durch intramolekulare Interaktion (Liu et al., 1996; Baker & Harland, 1996). Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung, die diese Hemmung aufhebt. Außerdem zeigt die MH1 Domäne spezifische, DNA- bindende Aktivität, die wiederum von der MH2 Domäne inhibiert wird.

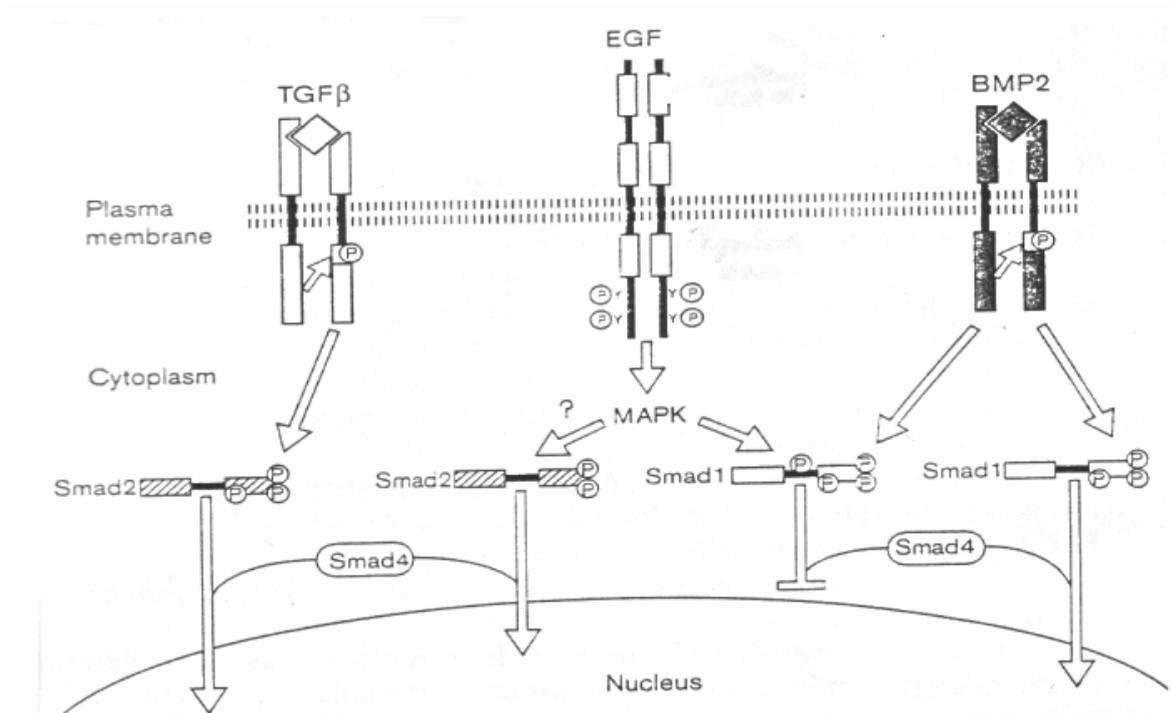


Abbildung 4: Aktivierung von Smads als Downstreamfaktoren (Hackel et al., 1999)

1.10 Ziele dieser Arbeit:

Da im gesamten Tierreich Rezeptorkinasen unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft in konservierter Form vorkommen, lag die Annahme nahe, daß auch *E. multilocularis* genetisch entsprechende Rezeptoren besitzt. Da sich zudem in dem beschriebenen *in vitro* System gezeigt hatte, daß Wirtsfaktoren, die auf Larvenstadien wirken, biologische Eigenschaften besitzen, die Wachstumshormonen entsprechen, wurde in dieser Arbeit versucht, durch degenerative PCR homologe Faktoren dieser Familien aus *E. multilocularis* zu identifizieren und charakterisieren. Dieser Nachweis ist in der vorliegenden Arbeit gelungen, wobei unter Ausnutzung der degenerativen PCR eine Rezeptor Tyrosinkinase der EGF Rezeptorfamilie, eine Rezeptor- Serin/ Threoninkinase der TGF- β Rezeptorfamilie sowie ein Smad- Homologes identifiziert und charakterisiert werden konnten, welche vom Larvenstadium des Fuchsbandwurms exprimiert werden.

2. Material und Methoden:

2.1 Geräte:

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Autoklav Brutschränke (verschiedene Fabrikate) Zentrifugen: Biofuge 15, Biofuge 15R, Omnifuge 2.0 RS	Heraeus	Hanau
DNA- Elektrophoresekammern für horizontale Gele in verschiedenen Ausführungen	BioRad	München
DNA- Elektrophoresekammern für vertikale PAA-Gele Spannungsgeräte: Power Pack P24, P25 Thermocycler Trio-Thermoblock™	Biometra	Göttingen
Gel-Dokumentationssystem Midi-Doc	Herolab	Wiesloch
Heizblock: Dri-Block, DB3	Techne	Cambridge,UK
pH- Meter	WTW	Weilheim
Schüttelinkubatoren TH 30, KS 10	Bühler	Tübingen
Sequenziergerät: ABI Prism™ Sequencer 377	Perkin Elmer	Weierstadt
Speed Vac®Plus SC110A	Savant	New York USA
Spectrophotometer U-2000	Hitachi	San José USA
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel	Staufen
Tisch-Ultrazentrifuge TL-100, Ultrazentrifuge L7	Beckman	München

Tabelle 1

2.2 Verbrauchsmaterial:

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Spritzen und Kanülen	Braun AG	Melsungen
Reaktionsgefäße, 0.5, 1.5 und 2.0 ml	Sarstedt	Nümbrecht
15 und 50 ml Zentrifugengefäße	Falcon	Heidelberg
15 ml Röhrchen (steril)	Greiner	Nürtingen
Quickseal™ Zentrifugengefäße 25 × 89 mm	Beckman	München

Tabelle 2

2.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme:

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Agar- Agar Glucose Agarose NEE0 dNTPs lyophilisiert	Roth	Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS) Tween® 20 TEMED EDTA Ethidiumbromid Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
Acrylamid 40 Ampuwa DEPC Dimethylformamid (DMF) Orange G Paraffinmineralöl	Sigma	Deisenhofen
Ampicillin Binotal®	Bayer	Leverkusen
Big Dye Terminator Cycle Sequencing	Perkin Elmer	Weiterstadt

2. Material und Methoden

Ready-Reaction Mix		
Cäsiumchlorid ultraPure™ LB Agar „Lennox L Agar“ LB Broth Base “Lennox L Broth Base” RNA Längenstandard (0,24- 9,5 kB)	Life Technologies	Karlsruhe
Goldstar <i>Taq</i> DNA Polymerase Smart- <i>Ladder</i>	Eurogentech	Seraing, Belgien
Isopropyl-β- Thiogalaktosid (IPTG) X-Gal Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem	Heidelberg
Klenow Enzym Expand™ High Fidelity PCR System Expand 20kb long Expand 20 kb ^{Plus} PCR System (Taq+ Pwo Polymerase) Superscript II (MMLV Reverse Transcriptase) <i>Titan™ One Tube RT-PCR System</i>	Boehringer	Mannheim
MMLV Reverse Transkriptase Deoxynucleotide Mix 100mM (25mM je dNTP) Pfu Turbo®DNA Polymerase (PCR Produkte bis 15kB)	Stratagene	Heidelberg
PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom	Berlin
QIAprep Spin Miniprep Kit QIAquick QIAquick PCR Purification Kit Qiagen Gel Extraction Kit QIAquick Gel Extraction Kit RNeasy® Mini Kit One-Step RT PCR Kit,	Qiagen	Hilden

<i>Taq</i> - Polymerase		
Restriktions- und DNA modifizierende Enzyme	New England Biolabs (NEB)	Schwalbach
SMART RACE cDNA Amplification Kit Advantage® 2 Polymerase Kit	Clontech	Heidelberg
Triple Master® PCR System	Eppendorf	Hamburg
Topo- TA Cloning® Kit	Invitrogen	Groningen, Niederlande

Tabelle 3

Alle Puffer und Lösungen, die autoklaviert werden, wurden mit einmal destilliertem Wasser angesetzt. Für alle enzymatischen Reaktionen wurde autoklaviertes, doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet. Zum Lösen von DNA wurde der pH- Wert des autoklavierten Wassers auf pH 8 eingestellt. Da sich der pH- Wert durch Reaktion mit Kohlendioxid bereits nach einer Woche auf pH 5-6 verringert, mußte der Wert ggf. korrigiert werden. Für Arbeiten mit RNA wurde das Wasser zusätzlich mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt. Sämtliche Produkte wurden nach Herstellerempfehlung gehandhabt.

2.4 Lösungen und Puffer:

Ethidiumbromid Stammlösung (10 mg/ml): 1 g Ethidiumbromid, ad 100 ml H₂O

PBS: 10 mM Natriumacetat, 140 mM NaCl, pH 8.0

20 × SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat, pH 7.0

10 × TAE: 40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

10 × TBE: 100 mM Tris-HCl, 100 mM Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8.3

6x Probenauftragspuffer: 6g Saccharose, ad 10ml H₂O, 0.05 % Bromphenol,
0,05% Xylencyanol

PAA- Auftragspuffer: 10ml Formamid, 200µl 0,5M EDTA pH8,
Xylencyanol, Bromphenolblau

2.5 Parasitenmaterial:

Larvenmaterial von *E. multilocularis* entstammt verschiedenen Isolaten. So wurden T1- und K188- Material aus humanem Operationsmaterial isoliert, wohingegen H95 ein Wildisolat aus Hohenheim (1995) ist. Das Larvenmaterial wurde durch fortlaufende Passage in Wüstenspringmäusen, *Meriones unguiculatus* erhalten.

2.6 Bakterienstämme:

E. coli TOP10 (Invitrogen) :

F⁻ mcrA (Δ mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 rec A1 deo R araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

E.coli DH5 α (Hanahan, 1983):

F⁻ end A1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁻) supE 44 thi-1 \square recA1 gyrA relA1 Δ (lac IZYA-arg F) U169, deoR1. Φ 80d/lacZ Δ M15

2.7 Plasmide:

pPCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen):

Linearisierter Vektor mit 3' Thymidin- Überhängen zur Klonierung von PCR-Produkten mit 3' Adenosin- Überhängen.

FI *ori*, ColE1 *ori*, *lacZ*, multiple Klonierungsregionen (MCS) flankiert von T7-RNA-Promotor, Amp^R, Kan^R

2.8 Medien und Platten:

Luria- Broth- Medium (LB-Medium): 1%Bacto Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7.5

LB-Agar: LB-Medium mit 1.5% Bacto Agar: 12 g Agar wurden mit 1 l Medium gemischt, autoklaviert und bei ca. 40°C in Platten gegossen.

Bei Zusatz von Antibiotika werden folgende Konzentrationen verwendet:

Ampicillin 100 µg/ml in H₂O gelöst, Kanamycin 30 µg/ml in H₂O gelöst.

SOB Medium: 2% Bacto- Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl

SOC Medium: SOB- Medium + 20mM Glucose, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄

2.9 Oligonukleotide (Primer):

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma- ARK GmbH (Darmstadt) bezogen. Abkürzungen: M= (A,C); R= (A,G); W= (A,T); S= (C,G); Y= (C,T); K= (G,T); V= (A,C,G); H= (A,C,T); D= (A,G,T); B= (C,G,T); N= (A,C,G,T)

Aufzeichnungen jeweils von 5' > 3'

cDNA Synthese- Primer:	
G 20:	CCG ATG GCT GGC ATG CAC CA
A 37	GGC CGC ATG CCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T
G 34	CCG ATG GCT GGC ATG CAC CAC CCC CCC CCC CCC C
CD 5 RT	TAT AAG CTG CAG ACA CGG ATC CAA CGC GGG
CD 3 RT	ATC TCT TGA AAG GAT CCT GCA GGA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT VX
CD5	CCG ATG GCT GGC ATG CAC CA
CD3	ATC TCT TGA AAG GAT CCT GCA GG
Vektor-Primer:	
TOPO-T7	TACGACTCACTATAGGGCGA
TOPO-M13	CAGGAAACAGCTATGACCAT
M13 Forward	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M 13 Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
PJG-4-5-5PR	GAT GCC TCC TAC CCT TAT GAT G
PJG-4-5-3PR	TTG GAG ACT TGA CCA AAC CT
SL- Repeat- Primer:	
EM10-SL	TCC TTA CCT TGC AGT TTT GT
SL-ATG	ACC TTG CAG TTT TGT ATG
SL5PR	CAC CGT TAA TCG GTC CTT AC

2. Material und Methoden

EM 10- SL Bam	TAA TGG ATC CTT ACC TTG CAG TTT TGT
Elp (<i>em10</i>)- Primer :	
EM 10-15	TCC TTA CCT TGC AGT TTT GT
EM 10-16	TTG CTG GTA ATC AGT CGA TC
Primer für <i>emrk 1</i>:	
EGR DVW	AC ACC GTA ACT CCA XAC RTC
EGR DGM	GAG CAG ATT GCX GAY GGX ATG
EGR LAA	ATT CAC AGT GAY YTX GCX GC
EGR CWM	TC GTA RTC YTC CAT CCA RCA
EGR RC	AGT TGC AGG GTT GAC AGA GCT TCT G
EGR RCN	TTC GAG CAG CGC TTG ACA CAA GTG
EGR 5 RACE	CAA CTC CGG CGA GGA GGC ATC CAA ATC G
EGR UP	GTT GGC GGC TCG AAG GTC WC
EGR UP 2	GCA CCA TCA CCA TGT AGG TG
EGR UP 3	CGC TGT CCT CGT TGT TGG TG
EGR UP 4	CGA TGA ATA ATC CCA CGT TC
EGR UP 5	CCA CGT TCC TCT AGG TAG GC
EGR UP 6	TGG GAT TGT TGG CAT CGT CG
EGR UP 7	GGC CTG ATT TCG AGC ACG CG
EGR UP 8	CAT TCG CCT AGA CAC TGA TC
EGR UP 9	TGC AGT GCA CGA CTC CGC GC
EGR UP 10	ATC ATC ACG CTG CAC TTG TG
EGR UP 11	CTT GGC GCA GGT GAG AGA AG
EGR UP 12	TCA CCA CCT GTG CTG ATT GG
EGR UP 13	CCG GTG CTT TGG TAT TAG TG
EGR UP 14	GAT GTC GCG TTG CCG AAG TG
EGR UP 15	TCG TGC ACA GTT CGC TGC AG
EGR UP 16	CCA GCT GAG AGC TTG CAA CG
EGR UP 17	CAC ATT GCT CAT GAC ATC GTA G
EGR UP 18	CAT TCC TGA AGA TCC GCA TTT G
EGR UP 19	GTC ATC TGG AGG GAA TTT GG
EGR UP 20	TTT AGG GGC ATG TAC TAC TAA T
EGR UP 21	CAG GGA ACG CAT TCC TGA AGA TCC G
EGR UP 22	ACA TCC CCC AAG TCC GAG GTA ATC G
EGR UP 23	AAG ACA CAC TGG CTC ATC CG
EGR UP 24	CTT CTC CAG AGC GCT TGT ATA G
EGR UP 25	CAC CGT CCA TAG ACA TCT CG
EGR UP 26	AGA AGC TCA CAC AGG TGT CG
EGR UP 27	TGG GAC CTG ACC GTC TCA AG
EGR UP 28	ATT CCT CTT GGA TCG ACA CG
EGR UP 29	AAC TGC CAT TCA CTG GTA TG
EGR UP 30	CAT CAC CGA CAT TTC CAA CG
EGR UP 31	TCC TCT AGT CGT TTT AAG TTG
EGR UP P	AAG TAG CAG AAA GCA CAT CC
EGR UP Triple 1	GAC TCG TCG GGT TCA CAT G
EGR UP Triple 2	ATA TCC AGG CAC TGG TAC TTG

2. Material und Methoden

EGR UP Triple 3	GAC GAG AAG GGG CAC TGC TG
EGR UP Triple 4	TCC TCA GCG TAC TGC TCC TTC GAG
EGR UP Triple 5	CAG GTG TCG CCA TTC CTC TTG
EGR UP Triple 6	GGG TTG TCT AAA CGG CAG TAC G
EGR UP Triple 7	TCT AAA CGG CAG TAC GTG GTG G
EGR T UP 1	CAC GGC AAG ACT ACG AAG
EGR T UP 2	GGT CGT GTT GCG ACG GAT TTG
EGR DW	GWG ACC TTC GAG CCG CCA AC
EGR DW 2	GCC TAC CTA GAG GAA CGT GG
EGR DW 3	GTG CGG CTG AGT CAG CCA GA
EGR DW 4	AGA ATG CGA CAA AGC GGG CG
EGR DW 5	GTC AAC CCT GCA ACT CCA AG
EGR DW 6	ACG ATG CCA ACA ATC CCA TCG
EGR DW 7	GCA CAA GTG GAG CGT GAT GA
EGR DW 8	AGT ACG CTG AGG AGA AGC AG
EGR DW 9	CCT GGA CGA GGA GCA GTA CG
EGR DW 10	CAC TAA TAC CAA AGC ACC GG
EGR DW 11	TGC GGA TCT TCA GGA ATG CG
EGR DW 12	CAG ATG TTG GAG AGG CGG GAA TG
EGR DW 13	GAT GTA CCG GTC GGA GTG TG
EGR DW 14	CCT CGG ACT TGG GGG ATG TG
EGR DW 15	AAG TAC CAG TGC CTG GAT ATG
EGR DW 16	TGC ACT GCA CCT GGG CCG GAT CAG TG
EGR DW 17	TTC GAA GCC AAC GGT GTC TG
EGR DW 18	CTT GAT GAC ATC TGC GGC TG
EGR DW 19	CTG CCT ATT TGG AGG CGC TG
EGR DW 20	GAG GAA TGG CGA CAC CTG TG
EGR DW 21	TTG AAC TCT GCC AGT CCA GG
EGR DW 22	CAC GGT GTG CGT GAT TGA ATG
EGR DW 23	CGT TGG AAA TGT CGG TGA TG
EGR DW 24	GCA CGA TGT CAC GAA GAA TGC GCG G
EGR DW Triple 1	CAT TAC GGA TCA TTC GTG GAC G
EGR DW Triple 2	AGA CAC TTG TGT CAA GCG CTG
EGR DW Triple 3	GCA GTA CGT GGT GGA TTC CTT G
EGR DW Triple 5	ATC TTC GTA GTC TTG CCG TG
EGR DW Triple 6	ACG ATA CTG ACT CGC CAA TGC G
EGR DW Triple 7	CAA GGA ATC CAC CAC GTA CTG
EGR DW Triple 8	GGA TCT TCG TAG TCT TGC CGT G
EGR DW Triple 9	GTA GTC TTG CCG TGA TAC AGG A
EGR T DW 1	CGG ATA CCA CTC ATC TCA TTA CG
EGR UP CH 1	AAC GCA CCT TCA CCA AAG TG
EGR UP CH 2	CGG GCC TCC TTA ATT ACA AAG
EGR UP CH 3	CGA CGA CGA AGC ATC AAC AG
EGR UP CH 4	GAG CTG TCG AGG GGA GTT AG
EGR UP CH 5	CCA CCT ACA GCT GCT CTT CA
EGR UP CH 6	AGT GTG CAT GAT GGC GTG AC

2. Material und Methoden

EGR UP CH 7	ATG GAG ATA TCT AGA GCC AG
EGR UP CH 8	CTG GAG TGA CAC CTG ACA CG
EGR UP CH 9	ATC TCA TAT AAA CCA AGG GAA ATT C
EGR I 19 UP	GGC ACG GAG AGA GCC ATG
EGR I 19 UP 2	GTT GTG CAA GAA AGC TGA TG
EGR I 19 UP 3	GCA GCA GAT CAC ATT TGG TG
EGR 19 UP 4	ACA TCA CCG AGC CTA GAC AG
EGR I 20 UP	AGA TTG AAC TTT GAA GGC AG
EGR I 20 UP 2	AAG AAG TTA ACG GCA AAC TTG
EGR I 21 UP	GTA ACG CTT TAT AAG GAG TGG
EGR DW CH 1	GAC CAT TCT GCA TGC ACA G
EGR DW CH 2	CAA GAG CCG CAA GAG TTC ACA AG
EGR DW CH 3	ACA GTA CGG TTC ATG ACT AG
EGR DW CH 4	AGT ACG GTT CAT GAC TAG TAG
EGR DW CH 5	CCA TGT TAC GCT TCC TGC TG
EGR DW CH 6	GCA TCT TCA GAG GCA GGA TAG
EGR DW CH 7	GCA ATA ACA CAC CGC CAA ATG
EGR DW CH 8	CCA GGA CAG GGC AAT G
EGR DW CH 9	GGG AGC AAC AAC AGC AGA TG
EGR DW CH 10	TAG TTG GTC GTC ACA ACT TAG
EGR DW CH 11	CAT CAA GAT CTG AGG TGA CAG
EGR DW CH 12	TCA GGT GTC AAT CTT CTA CTG
EGR DW CH 13	GTG GTG AAT CTG CAG GTT CG
EGR DW CH 14	ATT TGT CTT CCC TCT GTT CG
EGR DW CH 15	TCC TGT GAG AGC CAT TAA GG
EGR DW CH 16	GAT GTT AGG CCA TGA AAC CG
EGR DW CH 17	AAG ATC TAG ACG ATT ATG TGG
EGR DW CH 18	TCT TCA GCG ATC ATC CTT CG
EGR I 19 DW:	TCC CAC CGA TGG AAC AGC AG
EGR I 19 DW 2	CAG CCG ATA GAA CAC CTC GG
EGR I 19 DW 3	CAG AAG TGG CCG TTG GTA TG
EGR I 19 DW 4	ACA GGT GAT AGA TCC GTC TG
EGR I 20 DW	TCT CTT CAC TTC GTT GAA ATG
EGR I 20 DW 2	CAC AAC CTT GGA TAA TAT GTG
EGR I 21 DW	TGT CGT ATT TCA AGT CCC GG
ER- SEN 1	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGC CAA ACG CAG TCG
ER-UP ASEN 1	TAC TTC TAG CGG AGA TGC GAT CAA TGG TG
ER- ASEN 1	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAA GCG GAG ATG CGA TCA ATG
ER-DW SEN 1	CAA TTA CAA GGC CAA ACG CAG TCG TAT TAA G
ER-EcoR1	ACG GGT GAA TTC GGA CCG GCA GGT TGG AAG
E-BamH1	GGG AGA GGA TCC ACA TTG ATG ACT
E-EcoR1	TTG GAA GAA TTC TTG ATT ATC CAC C
EGR-Bam-Neu	AAG CAG GGA TCC AAA TAT GGG CCG TTG GGA G
EGR-Eco-Neu	GGG TCA GAA TTC GAA GGG AGT AGA GAT ACG C
EGR-Eco- long	AGA AAT GAA TTC GCT TGG CGC AGG TGA GAG
EXEGR-UP60°C	CTC GTC CAG GCA GAG ATT G

2. Material und Methoden

EXEGR-DW62°C	GCA CGA TGC CAC GAA GAA TG
EGR-KPN1-DW	GAT CGG GGT ACC TAA TGC TCC GGA TTT GGA CA
EGR-Not1-up	CCT CGA GCG GCC GCA ACG GGT TTA GTC GGA CCG
EGR-5	ATG CTC CGG ATT TGG ACA AAC G
EGR- 3	AAC GGG TTT AGT CGG ACC GG
EGR-up-TOPO	GGA TGA CAA GCT GGA AAA GG
EGR DW TOPO2	ATT GAT GAC TTG ACT TTC GAC G
Primer für emrsk 1:	
TGF IVQ	ACT AAT CAC GCT RTX RTX CA
TGFN	TGG GTT CGX CAY TAY TAY CC
TGF- TNH	TG AAC GAT XGC RTG RTT XGT
TGF CCV	AT CTC AGT XGG XAC RCA RCA
TGFC	CAT CTC AGT RGG XAC RCA RCA
TGFN2	CCT TGY TGY GTT CCX ACX SA
TGFN 1	GTT RRT TGG SAX GAY TGG AT
TGFC-S1	TA CTA TCG RCA XCC RCA XGA
TGFC-S2	TA CTA TCG RCA XCC RCA RCT
TGFC-G	TA CTA TCG RCA XCC RCA XCC
TGR FIA	AAC ATC CTC GGX TTY ATH GC
TGR MAP	TCT AGT ACY TCX GGX GCC AT
TGR UP	TCC TGC GAA GAG GCT AGC GG
TGR UP 2	AG GTA GAG CGT CAC CGC T
TGR UP 3 oben	ATT TGC CTC ATC GCT GGT CC
TGR UP 3 unten	ACG AGT CCC AGT GCG TAG AC
TGR UP 4	ATC TCC CAT AGA ACG AGT CC
TGR UP 5	GAG GAA TGC TTT GTA AGG GG
TGR UP 6	GTC GAC CAC ATA TCC TAA GG
TGR UP 7	CCG TTC CAC CCG TCA CAC TG
TGR UP 8	CAA TCA AAG ACG CGC ATT CCG
TGR UP 9	TTT GGG TCG GTG CGT ATG CA
TGR DW	CAT AGG GAT ATT AAA TCT AAG
TGR DW 2	AAG AAT ATT CTG GTT ATG GCT AAC
TGR DW 3	ACG AGT GGA AAG ATC ATC GG
TGR DW 4	GGA ACT TCA GCA AAC ATG AG
TGR DW 5	GTG GGA CCA TCA ACT TTC AG
TGR DW 6	GCA GTG TGA CGG GTG GAA CG
TGR DW 7	GTT GTA CAA AAC CTC CTG TTG
TGR 3 RACE	GGA ATT GTT AGA GTG CCG ACA TCC G
TGR CH1 UP	TTG GAT CCG ATG GCA CCG AG
TGR CH1 DW	GAT TTG GAG GCG TTG TAC AGG
TGR UP CHR	TGG GTC GGT GCG TAT GCA TTT A
TGR DW CHR	ATT ATG ACT CGG TGC CAT CG
Primer für emsmadA:	
SMAD-A-UP 1	CTA CAC TGC GAG AAG CTG AG
SMAD-A-UP 2	CAA CAG GGG GAC GCT AAT CG
SMAD-A-UP 3	TTG AGC GGC TCG TTC AGG TG

SMAD-A-UP 4	TTT GAC TTA AAA CAG TCA ATT TAT
SMAD-A-UP 5	GCA GGA TGC CAG TTG TTA AG
SMAD-A-UP 6	TAC TAT CCC CGA CTG GGC ATG
SMAD-A-UP 7	GTG TCA ACG GTA CGT TTG TG
SMAD-A-DW 1	CAG TCA CCC AGC TGC AAT CG
SMAD-A-DW 2	ACT CCG TGC ACC TCT GTC AG
SMAD-A-DW 3	CTC CCC GAT CAC GGC CAT ACG
SMAD-A-DW 4	GAT TTC GGT TTC GAG ACT TG
SMAD-A-DW 5	CAT CCC ACA AAC GTA CCG TTG
SMAD-A-DW 6	ACG ATC GCC AAC AGG TCA TG
SMAD UP:	TGC ACG GAG TCG AGG GAG AG
SMAD UP 2	GGA TGC CAG TTG TTA AGA CG
SMAD UP 3	TGC AGC TGG GTG ACT GGA CG
SMAD DW	ACT GGC ATC CTG CCA CCG TG
SMAD DW 2	AGT GTA GTT GCG CCT TCA CG
SMAD UPCH 1	AGC GTC ATA TGA ACA TCT TAC A
SMAD A DWCH 1	CAC CTT GGG TGA AAA TTC CAG
SMAD A DWCH 2	GTC ATT CTA GTT CCA TCA CCG

Tabelle 4

2.10 Techniken zur Arbeit mit Parasitenmaterial von *E. multilocularis*:

2.10.1 Kultivierung von *E. multilocularis* Metazestoden:

Metazestoden von *E. multilocularis* werden kontinuierlich in mongolischen Wüstenmäusen (*Meriones unguiculatus*) kultiviert. Acht bis zehn Wochen alte Mäuse werden durch intraperitoneale Injektion von 0.5 ml homogenisierten Parasitenmaterials in sterilem PBS infiziert. Das Heranreifen der Larven vollzieht sich über einen Zeitraum von 2 Monaten.

2.10.2 Isolierung und Aufbereitung von *E. multilocularis* Larvengewebe:

Das Larvengewebe wird aus der Bauchhöhle infizierter *M. unguiculatus* mit steriler Pinzette und Skalpell präpariert und entnommen. Eventuelle Rückstände von Blut oder Wirtsgewebe werden manuell und durch Spülung mit PBS entfernt. Man erreicht eine Homogenisierung des Larvengewebes durch Passieren durch ein autoklaviertes Küchensieb (Plastik oder Metall) mittels der Rückseite eines sterilen 10 ml Spritzenkolbens. Anschließend wird das gewonnene Homogenisat dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit 30 µl

Ciprobay® (Bayer), Konzentration 2 mg/ml, behandelt. Nach Inkubation über Nacht folgt eine weitere Wäsche mit 1x PBS.

2.11 Techniken zum Umgang mit RNA:

Lösungen und Puffer, die zu Arbeiten mit RNA verwendet werden, werden über Nacht mit 0.1% DEPC versetzt und anschließend autoklaviert.

Alle verwendeten Glas- und Metallgegenstände werden bei 240°C für 5 Stunden hitzesterilisiert, Eppendorfgefäße und Pipettenspitzen werden zweimal autoklaviert. Alle Einmalgebrauchsgegenstände werden nur aus ungeöffneten Verpackungen entnommen. Es wird ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet.

2.11.1 RNA Präparation aus dem Larvengewebe von *E. multilocularis*:

Lösungen:

GITC: 4 M Guanidiniumisothiocyanat, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA (pH 8)

CsCl: 5,7M CsCl, 20mM Tris HCl pH 7,5, 2mM EDTA pH 8

Mindestens 5 ml homogenisierter Parasit werden in einem 50 ml Gemisch von 4 M GITC mit 400 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen und anschließend im Ultraturrax dreimal für jeweils 15 Sekunden auf Eis zerkleinert. Vor Verwendung des Ultraturrax wird das autoklavierte Messer dreimal abwechselnd mit GITC-Puffer und DEPC- Wasser gereinigt. Zur Scherung genomischer DNA wird die Suspension anschließend dreimal durch eine 25 G und einmal durch eine 27 G Kanüle gezogen. Während der Zentrifugation für 5 Minuten bei 4000xg werden in zwölf Ultrazentrifugenröhrchen je 3,5 ml 5,7 mol Cäsiumchlorid vorgelegt. Auf dieses „Cäsiumchloridkissen“ wird der erhaltene Überstand vorsichtig aufgetragen. Die Ultrazentrifugation erfolgt bei 32.000 rpm und 18°C für mindestens 16 Stunden.

Zur Gewinnung des entstandenen RNA- Pellets werden unter sterilen Bedingungen mit einer Pasteurpipette ca. 5 ml des Überstandes abgenommen

und dann mit einer zweiten Pasteurpipette die Flüssigkeit bis ca. 1 cm vor Boden des Gefäßes entfernt. Das restliche Cäsiumchlorid wird aus dem Röhrchen dekantiert, der Boden des Zentrifugenröhrchens wird mittels eines in einer Flamme erhitzten Skalpell abgetrennt und auf Eis gelegt.

Das Pellet wird nun mit DEPC- Wasser resuspendiert und anschließend in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Volumina eiskalten 100%igem Ethanol wird die RNA über Nacht bei -80°C ausgefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4°C wird das RNA- Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 200 µl DEPC-ddH₂O aufgenommen.

Die quantitative und qualitative Überprüfung der RNA erfolgt photometrisch bzw. mittels denaturierender Agarose- Gelelektrophorese.

2.11.2 Präparation von Zysten-RNA:

Etwa 10 Zysten (Durchmesser im Durchschnitt 1mm) werden vorsichtig unter dem Lichtmikroskop aus der Zellkultur abpipettiert und mit PBS-Puffer dreimal gewaschen. Mittels einer sterilen Küvette werden sie in einem sterilen Einmalbehälter zerstoßen und anschließend zentrifugiert bei 15000 rpm für 5-10 Minuten zentrifugiert. Die RNA-Isolierung wird mit Hilfe des *Rneasy Mini Kits* (Qiagen) isoliert und am Ende in 30 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

2.11.3 Präparation von Protoskolex-RNA:

Das Parasitengewebe wird unter sterilen Bedingungen aus dem Zwischenwirt isoliert, über ein steriles Plastiksieb zerkleinert und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Suspension wird über einen Percollgradienten gereinigt und anschließend die Protoskolizes unter dem Lichtmikroskop selektiv mit einer Pipette angereichert. Die Lyse und RNA-Isolierung von jeweils etwa 50 Protoskolizes erfolgt mit dem *Rneasy Mini Kit* (Qiagen). Es wird ein finales RNA-Eluat von 30µl produziert.

2.11.4 Denaturierende Agarose- Gelelektrophorese für RNA:

10 × Running Buffer: 200 mM MOPS, 10 mM EDTA, 50 mM Natriumacetat, pH 6,7 - 7,0; mit NaOH eingestellt

Probenpuffer: 12 µl Formamid: Formaldehyd: 10 × Running buffer im Verhältnis 2:1:1, 2,5 µl 20% Ficoll- Orange G- Lösung

Für 50 ml eines 1% Agarosegels verwendet man 1x Laufpuffer, DEPC-H₂O, 0,65% Formaldehyd (etwa 0,9ml), Ethidiumbromid (2,5g Ethidiumbromid einer Konzentration von 1 mg/ml) und 0,5 g Agarose.

4 µl RNA werden mit dem Probenpuffer gemischt. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 65°C werden die Proben auf Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1x Laufpuffer bei 60V bis die Orange-G- Front circa 2/3 des Gels durchwandert hat.

2.12 Techniken zum Umgang mit DNA:

2.12.1 Präparation chromosomaler DNA aus Echinokokken: (Sambrook et al, 1989)

Reagenzien: Tris-Puffer (0.1 M, pH8)/ NaCl (0.5 M)/ EDTA (0.05 M), Proteinase K, 20% SDS, equilibriertes Phenol, Na- Acetat 3 M, pH 4.5, Chloroform, Isoamylalkohol

Das Larvenmaterial wie zur RNA Präparation aus dem Zwischenwirt isoliert und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen, weißlichem Pulver zermörsert. Dieses wird in acht Volumina Tris/ NaCl/ EDTA- Puffer aufgenommen und mehrmals durch eine Glaspipette gezogen. Anschließend wird dem Gemisch bis zu einer Konzentration von 0,5% tropfenweise 20%iges SDS zugegeben und die Suspension für 15 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach 30 minütiger Abkühlung auf Raumtemperatur werden 100 µg/ml Proteinase K hinzugefügt und das Gemisch über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag kann die wäßrige Phase in Zentrifugenröhrchen

überführt und die DNA zweimal mit Phenol, einmal mit 1:1 Phenol/ Chloroform und zweimal mit 24:1 Chloroform/ Isoamylalkohol extrahiert werden.

Der wäßrige Überstand wird mit 100% Ethanol für 30 Minuten bei -80°C gefällt und anschließend bei 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in H_2O resuspendiert. Die Konzentration wird photometrisch bei 260 und 280 nm kontrolliert. Eine weitere Kontrollmöglichkeit bietet sich auf DNA Ebene mittels einer PCR mit den bekannten Primern Em10-15 und Em10-16, die auf chromosomaler DNA ein PCR Fragment von ca. 525 bp ergeben.

Die Qualität kann durch elektrophoretische Auftrennung der nicht verdauten und der *EcoRI* verdauten DNA im 0.4%igem Agarosegel ermittelt werden.

2.12.2 Phenolisierung und Ethanolfällung von DNA:

Um aus DNA- haltigen Reaktionsansätzen für nachfolgende Reaktionen störende Proteine, Primer und Puffer zu entfernen, können die Proben phenolisiert und die DNA anschließend präzipitiert werden. Dazu füllt man das Ausgangsvolumen mit ddH₂O ad 100 µl auf und versetzt es mit dem gleichen Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol, mischt es gründlich und zentrifugiert das Gemisch für zwei Minuten bei 15000rpm bis zur Phasentrennung. Wird mit geringen DNA Mengen gearbeitet, kann die DNA-Konzentration in der wäßrigen Phase dadurch erhöht werden, daß man die organische Phase einmal mit 100 µl ddH₂O rückextrahiert.

Die wäßrige Phase wird abgenommen, mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und zwei Volumina Ethanol (100% v/v) versetzt und 30 Minuten bei -70°C gefällt. Es folgt eine zwanzigminütige Zentrifugation (15000 x g, 4°C), wonach der Überstand verworfen wird. Das entstandene DNA- Sediment wird mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und schließlich in ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.12.3 Photometrische Nucleinsäure- Konzentrationsbestimmung: (Sambrook et al., 1989)

Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Lösungen werden durch Extinktionsmessungen bei 260 und 280 nm in 1 ml Quarzküvetten im Photometer bestimmt. Die Quantifizierung erfolgt auf folgender Basis:

1 OD₂₆₀ entspricht bei dsDNA 50 µg/ ml

1 OD₂₆₀ entspricht bei ssDNA, ssRNA und dsRNA 40 µg/ ml

1 OD₂₆₀ entspricht bei Oligonukleotiden 30 µg/ ml

Die Reinheit der Präparation in Bezug auf Proteinkontaminationen kann anhand des Verhältnisses von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ ermittelt werden. Der Quotient liegt für reine Nucleinsäuren zwischen 1.8 und 2.0. Bei größeren Proteinverunreinigungen ergibt sich ein kleinerer Zahlenwert, da die OD₂₈₀ dann ansteigt.

2.12.4 Restriktionsenzymverdau von DNA:

In ein Reaktionsvolumen von 10-30 µl werden 1-2 Units Enzym pro µg DNA für den Verdau eingesetzt. Alle Restriktionsverdau erfolgen unter den vom Hersteller (NEB) empfohlenen Pufferbedingungen. Der Ansatz wird für 3 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei Inkubation über Nacht ist zu beachten, daß sich eine „Star-Activity“ entfalten kann, d.h. daß ein Enzym auch an unspezifischer Stelle schneidet, wenn an allen spezifischen Schnittstellen bereits Reaktionen erfolgt sind. Je nach Enzym muß die Reaktion durch Denaturierung im Heizblock für 10 Min bei 65°C beendet werden. Das gespaltene Produkt wird über den *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und mit 30 –50 µl Ampuwa- Wasser (pH 8) eluiert, anschließend wird das Produkt auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.12.5 DNA Ligation :

Die Ligation von DNA- Fragmenten in linearisierte Vektoren oder andere DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe einer T4- DNA Ligase unter Zuhilfenahme von ATP. Die Ligase katalysiert die Verknüpfung einer 3'Hydroxyl- mit einer 5'-Phosphatgruppe mittels einer Phosphodiesterbindung.

Für die DNA Ligation der restriktionsenzymgeschnittenen DNA werden 40 µl des verdauten, aufgereinigten Produktes folgende Reagenzien zugesetzt: 2µl T4-DNA-Ligase (1 U Ligase auf 20-50 µl), 4µl 10 × Ligase- Puffer (NEB), 4µl Ampuwa- Wasser . Die Ligation der überlappenden Enden („sticky ends“) erfolgt über Nacht bei 16°C im Wasserbad. Ein großes Reaktionsvolumen fördert hierbei die Ligation mit den eigenen Enden. Sollen verschiedene Fragmente miteinander ligiert werden, empfiehlt es sich, ein kleineres Reaktionsvolumen zu wählen.

2.13 cDNA Synthese mit SMART™RACE cDNA Amplification Kit (Clontech):

Enthaltene Primer:

UPM-Long (0,2 µM): CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA
ACA ACG CAG AGT

UPM- Short: (1 µM) CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C

SMART Oligonucleotide: (10 µM) AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA
CGC GGG

3'RACE cDNA Synthesis Primer (3'CDS, 10 µM): AAG CAG TGG TAA CAA
CGC AGA GTA C (T)₃₀ N₋₁ N (N=A,C,G oder T, N₋₁= A,G, oder C)

5'RACE cDNA Synthesis Primer (5'CDS, 10 µM): (T)₂₅ N₋₁N

Die SMART (Switching Mechanism at 5'end of RNA Transcripts) Methode bietet eine Möglichkeit, vollständige cDNA durch reverse Transkription, herzustellen (Frohman et al., 1988). Dies ergibt sich aus dem Zusammenwirken von MMLV RT (Reverse Transkriptase, Superscript II) und einem SMART

Oligonukleotid. Bei Erstellung der cDNA Abschrift von einem mRNA Strang zeigt MMLV RT eine „Terminale Transferase“ Aktivität, die an das 3'Ende der cDNA einige weitere Nukleotide anknüpft. In den meisten Fällen handelt es sich um 3-5 dCs. Diese Ergänzung wird durch das SMART Oligonukleotid genutzt, dessen endständige dGs an das dC reiche cDNA Ende binden können und so als verlängertes Template für die Reverse Transkriptase (RT) dienen. Nachdem die Reverse Transkriptase das Template von der Original-RNA zum SMART Oligonukleotid gewechselt hat, wird eine komplette cDNA gebildet, die zusätzlich die definierten SMART Sequenz am Ende trägt. Da die Ergänzung von dCs durch die RT am effektivsten am Ende des RNA Stranges stattfindet, wird das SMART Oligo typischerweise nur zu kompletten cDNAs hinzugefügt. Daraus ergibt sich eine hohe Ausbeute an vollständigen 5'Sequenzen. Die so hergestellte Erststrang cDNA wird direkt für 5' und 3'RACE PCRs verwendet. Dazu werden genspezifische Primer benötigt, die eine Länge von 23- 28 Basen und eine Annealingtemperatur von mehr als 70°C haben sollten. Als Gegenprimer wird ein zum Kit gehöriger UPM (Universal Primer Mix) verwendet.

Zur Erststrang cDNA Synthese werden folgende Inhaltsstoffe vermischt und mit ddH₂O ad 5 µl aufgefüllt:

5' RACE cDNA:

(1-) 3 µl RNA

1µl 5' CDS Primer

1µl SMART II Oligonucleotide

3' RACE cDNA:

(1-) 3µl RNA

1µl 3' CDS Primer

Das Gemisch wird zentrifugiert, 2 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend eisgekühlt. Folgende Reagenzien werden hinzugefügt: 2µl 5x First- Strand- Buffer, 1µl DTT (Dithiothreitol), 20 mM 1µl dNTP Mix (10 mM), 1µl MMLV Reverse Transkriptase (200 Units/µl): Superscript II

Die folgende Inkubation (1 Stunde, 42°C) sollte in einem Brutschrank durchgeführt werden, um eine optimale Wärmeeinwirkung zu erhalten. Die nun

fertige cDNA wird mit 50µl Tricine- EDTA Puffer verdünnt. Die Proben werden für 7 Minuten auf 72°C erhitzt und dann bei -20°C gelagert.

2.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR): (Saiki et al., 1988)

Die PCR dient zur Amplifikation definierter DNA- Abschnitte mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide („Primer“) und thermostabiler *Thermus aquaticus* Polymerase (*Taq*- Polymerase). Für diese Arbeit wurden *Taq*- Polymerasen der Hersteller Goldstar, Stratagene, Boehringer und Eppendorf verwendet. Die Primer werden so gewählt, daß sie den gewünschten DNA Bereich flankieren. Die *in vitro* Vervielfältigung der DNA wird im Thermocycler durchgeführt und gliedert sich in folgende Schritte:

1. Denaturierung der DNA 120-300 s bei 94- 95°C
2. Hybridisierung 60 s primerspezifische *Annealing*-Temperatur
3. Extension abhängig von der Fragmentgröße bei 72 °C
4. Denaturierung der DNA 40- 60 s bei 94° C
5. Hybridisierung 60 s bei der *Annealing*-Temperatur
6. Final Extension 600 s bei 72°C (abschließende Vervollständigung)

Die *Annealing*- Temperatur richtet sich nach dem A/T und G/C Gehalt des Primers. Sie wird 2-4°C unterhalb der nach der 2 + 4 Regel (2°C pro A/T- Basenpaar, 4°C pro GC- Basenpaar) berechneten Temperatur gewählt. So erfolgt die Anlagerung des Oligonukleotids nur an spezifische DNA- Abschnitte, wodurch unspezifische Amplifikation verhindert wird.

Die Dauer der Polymerase- Reaktion (Extension) richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Innerhalb einer Minute von ca.1000 Nukleotiden Länge eingebaut werden. Die Schritte 2.-5. werden je nach PCR 5 bis 40 mal durchlaufen. Die „Final Extension“ ermöglicht es der Polymerase, unvollständig gebliebene Enden aufzufüllen. Zum Schutz vor Verdunstung wird der Reaktionsansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die PCR-

Produkte werden vor ihrer weiteren Nutzung zur Klonierung oder Direktsequenzierung über den *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt, um Primerreste zu entfernen.

PCR-Standardansatz (Gesamtvolumen 100 µl) am Beispiel der Goldstar DNA Polymerase:

10 x PCR- Buffer: 750mM TRIS- HCl, pH 9,0; 200mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% (w/v)
Tween 20

- 10 – 20ng DNA- Template (cDNA, genomische DNA oder Plasmid- DNA)
- 10µl 10 PCR- Buffer
- 6 µl MgCl₂ (25 mM), Endkonzentration 1,5 mM
- 10µl dNTPs, Endkonzentration: je 20µM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 1µl Primer Nr.1, Endkonzentration 2 µM
- 1µl Primer Nr.2, Endkonzentration 2 µM
- 0,5µl *Taq*- DNA- Polymerase (5 U/ µl)
- ad 100 µl ddH₂O

2.14.1 PCR mit degenerierten Primern:

Um die Sequenz eines bislang unbekanntes Gens zu gewinnen, kann man degenerierte PCR-Primer aus den Sequenzdaten bereits bekannter Proteine verwandter Spezies konstruieren. Man wählt hierzu einen hochkonservierten Bereich aus, der möglichst geringe Unterschiede zwischen den bereits bekannten Sequenzen aufweist. Da die meisten Aminosäuren von mehr als einem Codon codiert werden, werden nach Möglichkeit Sequenzen verwendet, bei denen ein großer Teil der Aminosäuren von nur einem oder zwei Codons codiert werden.

Bei der Verwendung eines Pools aller möglichen degenerierter Primer wird die Konzentration des passenden Primers und somit die Effizienz der Amplifikation drastisch reduziert. Außerdem kommt es bei Konstruktion eines einzigen Primers nach der am höchsten konservierten Sequenz häufig zu Fehlbildungen. Es hat sich daher als günstig erwiesen, einen Primer zu konstruieren, der sowohl eine Region hoher Übereinstimmung, als auch einen degenerierten Abschnitt enthält. (Rose et al., 1998).

Die PCR wird nach dem Standard- PCR- Schema als 50 oder 100µl Ansatz mit der jeweils erforderlichen Annealingtemperatur durchgeführt. Anschließend wird das Resultat auf einem PAA- oder Agarosegel visualisiert und die Fragmente direkt aus dem Gel isoliert oder kloniert.

2.14.2 Nested PCR:

Als Spezifitätsnachweis für ein erhaltenes PCR-Produkt und zur Erhöhung der Produktausbeute sowie zum Anfügen von Linker- Primern für eine Klonierung kann dieses Produkt mit einer neuen Primerkombination nochmals über die sogenannte Nested PCR amplifiziert werden. Dadurch daß mindestens ein neuer, innerhalb der vorherigen Kombination gelegener Primer, für diese PCR eingesetzt wird, wird sichergestellt, daß nur spezifische Produkte der ersten PCR als Substrat der zweiten fungieren können.

2.14.3 5' / 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends):

Die SMART- cDNA dient als Template für 5' / 3'RACE:

2,5 µl cDNA, 1 µl genspezifischer Primer, 5 µl UPM, 5 µl 10x Advantage 2 PCR Buffer, 1 µl dNTP Mix (10mM), 1 µl 50x Advantage 2 Polymerase Mix

Zusätzlich werden zwei Negativkontrollen durchgeführt, indem jeweils nur ein einzelner Primer ohne Gegenprimer verwendet wird. Die PCR wird als Touchdown PCR durchgeführt, um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen. Hierbei wird mit einer sehr hohen Annealing- Temperatur begonnen (72°C) die

für fünf Zyklen beibehalten wird, dann für weitere fünf Zyklen auf 70°C gesenkt wird und in den letzten 25 Zyklen bei 68°C liegt.

2.14.4 Inverse PCR zur Amplifikation eines unbekanntes DNA-Abschnittes: (Huang et al., 1990; Sinclair & Aitken 1995)

Mit Hilfe der inversen PCR können unbekanntes DNA-Abschnitte amplifiziert werden, wenn geeignete Restriktionsenzymststellen vorhanden sowie ein Teil der DNA-Sequenz bekannt ist. Die Methode beruht darauf, daß lineare Restriktionsfragmente, die sowohl eine bekannte als auch die unbekanntes Sequenz beinhalten zu Ringen geschlossen werden. Diese können dann mit spezifischen Primern aus der bereits bekannten Region, die in Richtung der unbekanntes Region gerichtet sind, vervielfältigt werden.

In meiner Arbeit wurde diese Methode zur Vervollständigung von *smadA* genutzt. Dazu wurde nach dem SMART- Protokoll cDNA hergestellt, diese mehrmals mit *Pfu*- Polymerase und den Primern Em10-SL und CD3 mit langen Elongationszeiten amplifiziert. Anschließend wurde die cDNA mit dem Restriktionsenzym *BamH1* verdaut und anschließend religiert, so daß sich ringförmige Fragmente ergaben. Diese Ringstruktur wurde als Template für die Inverse PCR verwendet, indem die gewählten Primer in entgegengesetzte Richtung lasen. Zur näheren Spezifizierung wurde eine Nested- PCR angeschlossen.

2.15 Gelelektrophorese

2.15.1 Agarose-Gelelektrophorese für DNA (nicht denaturierend):

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten von ca. 0.5-15 kb kann abhängig von der Größe der Fragmente in unterschiedlich konzentrierten Agarosegelen (0.7-2 %) erfolgen. Je höher die Agarosekonzentration desto präziser werden kleinere DNA-Fragmente aufgetrennt und umgekehrt. „Standardagarosegele“ haben eine Agarosekonzentration von 1 %.

Für eine 1%iges Standard- Agarosegel werden 1.2 g Agarose mit 120 ml TAE-Puffer gemischt und bis zum Siedepunkt erhitzt. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wird die Flüssigkeit in einen vorher abgedichteten horizontalen Gelträger gegossen, wo sie erstarrt.

Die zu untersuchenden Proben werden zur Beurteilung der Lauffront mit einem 0.25% bromphenolhaltigen 6 × Laufpuffer gemischt. Als Marker dienen entweder 1-kb-DNA Ladder oder SMART- Ladder, ein Größenmarker anhand dessen definierter Bandenstärke die Quantität von DNA-Fragment-Banden abgeschätzt werden kann. Die Elektrophorese erfolgt bei ca. 100V und Raumtemperatur in einem 1 × TAE-Puffer- Bad. Zur Visualisierung der DNA-Banden wird das Gel für 10 Minuten in einer 2 mg/l Ethidiumbromidlösung entwickelt und anschließend unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und photographiert.

2.15.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen:

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen d.h. deren Reinigung von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen wird mit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) vorgenommen. Eine Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgt mit Hilfe des *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Beide Isolierungsverfahren basieren auf einer selektiven Bindung von DNA an Silikagel- Membranen in Anionenaustauschsäulen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Die DNA wird in pH 8 H₂O eluiert und ist anschließend für jede weitere Anwendung , wie z.B. Sequenzierung, Hybridisierung oder Transformation geeignet.

2.15.3 Polyacrylamid- Gelelektrophorese:

PAA- Gele eignen sich besonders zur Auftrennung von DNA-Fragmenten einer Größe von weniger als 1 kb. Zur Herstellung eines 6 %- igen Gels werden folgende Komponenten verwendet:

8g Harnstoff (8M), 8.5ml Ampuwa-H₂O, 2ml 10 × TBE- Puffer, 3ml PAA (40 %), 140µl APS = Ammoniumpersulfat (16 %)

Das Gemisch wird filtriert, durch Zugabe von 20 µl TEMED die Polymerisierung eingeleitet und luftblasenfrei in eine Vertikalapparatur mit einem Glasplattenabstand von 1 mm gegossen. Die Glasplatten müssen vor der Nutzung von beiden Seiten sorgfältig gereinigt, mit destilliertem Wasser gespült und mit 70 %igem Ethanol behandelt werden. Der Kamm wird zwischen die Glasplatten eingesetzt, das Gel benötigt zur Polymerisierung ca. 1 Stunde. Nach Entfernung des Kammes wird das Gel in eine Kammer, die 1 × TBE-Puffer enthält, eingebunden, die Taschen mit der Pufferlösung ausgespült und die Proben nach Mischung mit dem Bromphenolblau-haltigen Puffer aufgetragen. Die Bromphenolblaupufferfront läuft auf einer Höhe mit 50 bp-DNA-Fragmenten. Die Elektrophorese erfolgt bei Raumtemperatur und 200V.

2.15.4 Silberfärbung der PAA-Gele (Bassam et al, 1991):

Die Silberfärbung ermöglicht durch Reduktion von Silberionen in metallisches Silber unter alkalischen Bedingungen und Verwendung von Formaldehyd den hochsensitiven Nachweis von bis zu 1 pg/mm² DNA im PAA- Gel. Hierzu wird das Gel zunächst für 20 Minuten unter leichtem Schwenken in 20%iger Essigsäure fixiert, anschließend 3 × 2 Minuten mit Ampuwa-H₂O gewaschen und nach 30 minütiger Imprägnierung in einer Lösung aus AgNO₃ (1g/l) mit 1.5 ml Formaldehyd/l erneut für 20 Sekunden kurz mit Ampuwa-H₂O gewaschen. Die Entwicklung des Gels erfolgt in einer frisch angesetzten Lösung aus 30 g/l Na₂CO₃, 1.5 ml Formaldehyd/l und 2 mg/ml Na₂S₂O₃ × 5 H₂O. Zum Beenden der Reaktion nach 2-5 Minuten wird das Gel mit 10%iger Essigsäure behandelt. Zur genauen Beurteilung der Bandenmuster wird das Gel auf einem Lichtkasten betrachtet. Die Gele werden entweder auf Glasplatten abgedeckt mit Frischhaltefolie oder zwischen zwei Blättern Einmachfolie gelagert.

2.15.5 Isolierung von DNA aus PAA-Gelen:

Spezifische Banden können aus dem PAA- Gel mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und durch PCR mit spezifischen Primern erneut amplifiziert werden. Ungefähr die Hälfte einer mittelstarken Bandenbreite wird für die PCP eingesetzt. Die so isolierte Bande kann wieder auf einem Gel kontrolliert werden und anschließend die Bande hieraus isoliert oder die restliche PCR direkt (über den *QIAquick PCR Purification Kit*) aufgereinigt werden. Sollte diese Form der Bandenisolierung vermehrt eingesetzt werden, so empfiehlt sich die Verwendung niedrigprozentigerer PAA- Gele und die Verwendung möglichst kleiner Gelfragmente, da der Harnstoff den Ablauf der PCR stören kann.

2.15.6 Marker für die Gelelektrophorese:

Zur Beurteilung der Größe unbekannter DNA- Fragmente werden zusätzlich zu den Proben in der Gelelektrophorese Marker, die schon bekannte Fragmentgrößen beinhalten, aufgetragen. Für diese Arbeit wurden 1 kb-Marker und die Smart- Ladder (Eurogentec) eingesetzt. Anhand der Bandenintensität der Smart- Ladder kann nicht nur die Größe, sondern auch, bei Verwendung einer Standardmenge von 5 µl, (Konzentration nach Angaben des Herstellers eingestellt) die Quantität der Proben- DNA abgeschätzt werden. Für die Marker ergeben sich folgende Fragmentgrößen und Mengenverteilungen:

Bandengröße	Bandengröße ng/ Bande (bei 5 µl/ Bande)	
1kb-Marker: 3000 bp	Smart- Ladder: 10000 bp	100
2000 bp	8000 bp	80
1600 bp	6000 bp	60
1000 bp	5000 bp	50
519 bp	4000 bp	40
506 bp	3000 bp	30
396 bp	2500 bp	25
344 bp	2000 bp	20

298 bp	1500 bp	15
220 bp	1000 bp	100
201 bp	800 bp	80
154 bp	600 bp	60
134 bp	400 bp	40
	200 bp	20

2.16 Klonierung:

Die Klonierung von PCR- Produkten erfolgte mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden 0.5-2 µl PCR-Produkt, 1 µl PCR[®]-TOPO Vector, 1 µl Salt Solution und ddH₂O ad 6µl vermischt, für 5-10 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Diese Mischung wurde anschließend nach Vorschrift in kompetente *E. coli* TOP10- Zellen transformiert. Unter Transformationskompetenz versteht man die Fähigkeit, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen.

Kurz vor der Beimpfung LB+ Ampicillin Platten mit dem Versuchsansatz wurden 40 µl X-Gal (40 µg / ml Dimethylformamid) auf den Platten ausgestrichen.

Die Agarplatten wurden bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Dabei bilden sich weiße und blaue Kolonien. Die weißen Kolonien haben das gewünschte Fragment aufgenommen und können weiter verarbeitet werden. Zur Kontrolle und Sequenzierung der klonierten Fragmente eignen sich Insert-spezifische Primer oder Vektorprimer.

2.16.1 Transformation in CaCl₂ kompetente Zellen (Hanahan 1983):

100 µl kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 100- 200 ng Plasmid-DNA bzw. mit einem Ligationsansatz versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Volumen des Ligationsansatzes sollte 1/10 des Volumens der kompetenten Zellen nicht überschreiten. Zellen und Plasmid- DNA gehen bei niedrigen Temperaturen (0-5°C) in Gegenwart von Ca²⁺- Ionen eine Wechselwirkung ein,

die DNA lagert sich der Zellwand an. Durch den im Anschluß folgenden „heatshock“ (40 Sekunden bei 42°C), wird die direkte Aufnahme der Plasmid-DNA durch die kompetenten Zellen gefördert. Nach einer weiteren, kurzen Inkubation auf Eis wird der Transformationsansatz in 3 ml LB- Medium überführt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Selektion der Transformanden werden die Zellen auf antibiotika- haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.16.2 Kulturbedingungen:

Alle Inkubationen von *E. coli* wurden bei 37 °C auf LB -Agar durchgeführt. Bei rekombinanten Bakterienstämmen wurden dem Medium die zur Selektion notwendigen Antibiotika zugesetzt.

2.16.3 Transformanden- Kontrolle mittels PCR:

Diese Kontrolle dient der schnellen Prüfung, ob ein Vektor das gewünschte DNA- Insert aufgenommen hat. Eine Kolonie wird mit einer Pipettenspitze vom Selektionsagar entnommen und in 50 µl Selektionsnährmedium eingebracht. Die Kolonie wird durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert. Anschließend werden 30 µl des Homogenisats in ein Glasgefäß mit 3 ml des gleichen Mediums eingebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die verbleibenden 20µl werden abzentrifugiert und das erhaltene Bakterienpellet als Template für die nachfolgende PCR im 25 µl Ansatz genutzt. Die PCR kann mit Insert- spezifischen Primern oder Vektorprimern erfolgen. Nach Überprüfung im Agarose- Gel kann mit den ausgewählten Klonen weitergearbeitet werden.

2.16.4 Mini- Präparation von Plasmid- DNA:

Für präparative Arbeiten und Sequenzierungen von Plasmid – DNA ist eine gewisse Reinheit und Gesamtmenge erforderlich, die am zuverlässigsten durch eine Präparationsmethode gewonnen wird, bei der die DNA nach alkalischer Lyse der plasmidtragenden Bakterienzellen über Silicagel- Anionenaustauschersäulen gereinigt wird. RNA, Proteine und Verunreinigungen konnten auf diese Weise von der Plasmid – DNA separiert werden. Für diese Plasmidpräparation wurde der Qiagen® Miniprep- Kit nach Empfehlung des Herstellers verwendet.

2.17 Automatisierte DNA Sequenzierung: (Sanger et al., 1977)

Sequenzieransatz:

0.4 µg gereinigte Plasmid-DNA oder 0.1µg gereinigtes PCR-Produkt
5pmol Sequenzierungsprimer, 2µl Sequenziergemisch, ddH₂O ad 10µl

Die DNA Sequenzierung erfolgt mit dem automatischen Sequenzierungsgerät „ABI Prism™ Sequencer 377“ (Perkin Elmer) nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode. Nach der Denaturierung der DNA bei 96°C für 10 Sekunden kommt es bei der für den Primer entsprechenden Annealingtemperatur zur Anlagerung des Primers an den zu sequenzierenden Einzelstrang. Dem Reaktionsansatz werden zusätzlich zu den dNTPs geringe Mengen an ddNTPs (2'3'-Didesoxynukleosidtriphosphate) zugefügt, welche als normales Substrat von der Taq- Polymerase verwendet, jedoch durch das Fehlen einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende zu einem Kettenabbruch bei der Strangsynthese führen. Durch diese vorzeitigen Terminierungen entstehen als Produkt der Sequenzierungs- PCR ein Gemisch aus DNA-Fragmenten, die alle dasselbe 5'-Ende besitzen aber aufgrund unterschiedlicher Abbrüche am 3'-Ende Variationen aufweisen. Parallel zu dem 4 Minuten dauernden Prozeß der DNA-Synthese erfolgt so bei 60°C auch die Markierung der DNA-Fragmente. Anschließend werden die Reaktionsansätze gefällt, in Probenpuffer

aufgenommen und bei 90°C für 2 Minuten denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzieransätze erfolgt im Polyacrylamidgel. Mittels eines in das Sequenziergerät integrierten Laserscanners können die so aufgetrennten DNA- Fragmente über Messung des von den Didesoxynukleotiden emittierten Fluoreszenzlichtes detektiert werden.

2.17.1 Sequenzanalysen:

Die ermittelten DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe der *Lasergene*- Sequenzanalyse- Software (DNAstar, Madison, USA) analysiert. Sequenzvergleiche erfolgten mit der Clustal- V- Methode des MegAlign- Programms (Higgins & Sharp, 1989). Sequenzvergleiche mit der GenBank- und SWISSPROT Datenbank erfolgten über den Server des *National Center for Biotechnology Information* (Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)

3. Ergebnisse:

3.1 Identifizierung von cDNAs, die für Rezeptorhomologe aus der EGF- und TGF β Rezeptorfamilie in *E. multilocularis* kodieren:

Die Rezeptorkinasen aus der Familie der EGF- und TGF- β Rezeptoren beinhalten eine extrazelluläre, eine intrazelluläre und eine Transmembrandomäne. Die Kinasedomänen liegen intrazellulär und besitzen bei Mitgliedern der EGF- Rezeptor- Familie Tyrosinkinase-, bei denen der TGF β Rezeptor- Familie Serin/ Threoninkinaseaktivität. Bislang charakterisierte Tyrosin- bzw. Serin/ Threoninkinasen der EGF- und TGF β Familie weisen im Bereich der jeweiligen Kinase- Domänen hohe strukturelle Homologien auf.

Um entsprechende Rezeptorkinasen aus *E. multilocularis* zu identifizieren, wurde die Methode der degenerativen PCR gewählt, d.h., aus der hochkonservierten Kinase- Domäne wurden Motive von ca. 6 - 7 Aminosäuren ausgewählt, welche einen besonders hohen Grad an Konservierung aufwiesen. Zur Identifizierung entsprechender cDNA aus *E. multilocularis* wurden degenerierte Primer ausgewählt, wie in Abbildung 5 und Abbildung 6 gezeigt.

3. Ergebnisse

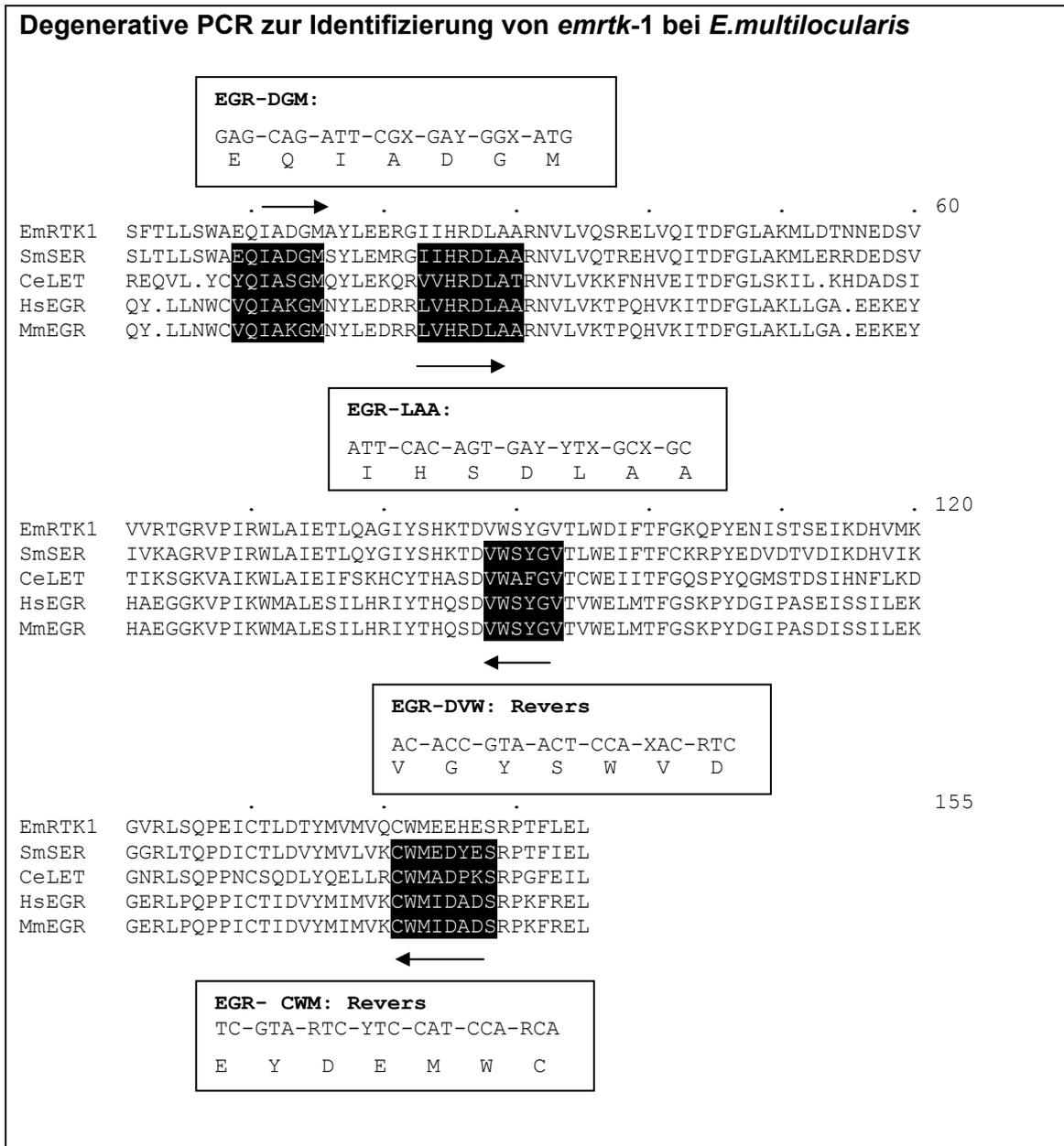


Abbildung 5: Die Abbildung zeigt Kinasedomänen von EGF- Rezeptorkinasen verschiedener Spezies im Vergleich. Sm= *S. mansoni*, Ce= *C. elegans*, Hs= *Homo sapiens*, Mm= *M. musculus*. Die schwarze Unterlegung bezeichnet Regionen, die zur Synthese der degenerierten Primer ausgewählt wurden. Die nach der PCR resultierende Sequenz des *E. multilocularis* EGF Rezeptorhomologen ist oberhalb der Sequenzen dargestellt. Die Leserichtung der Oligonukleotide ist mit Pfeilen markiert. In den Kästen ist die Aminosäuresequenz der Primer sowie ihre Nukleotidsequenz dargestellt.

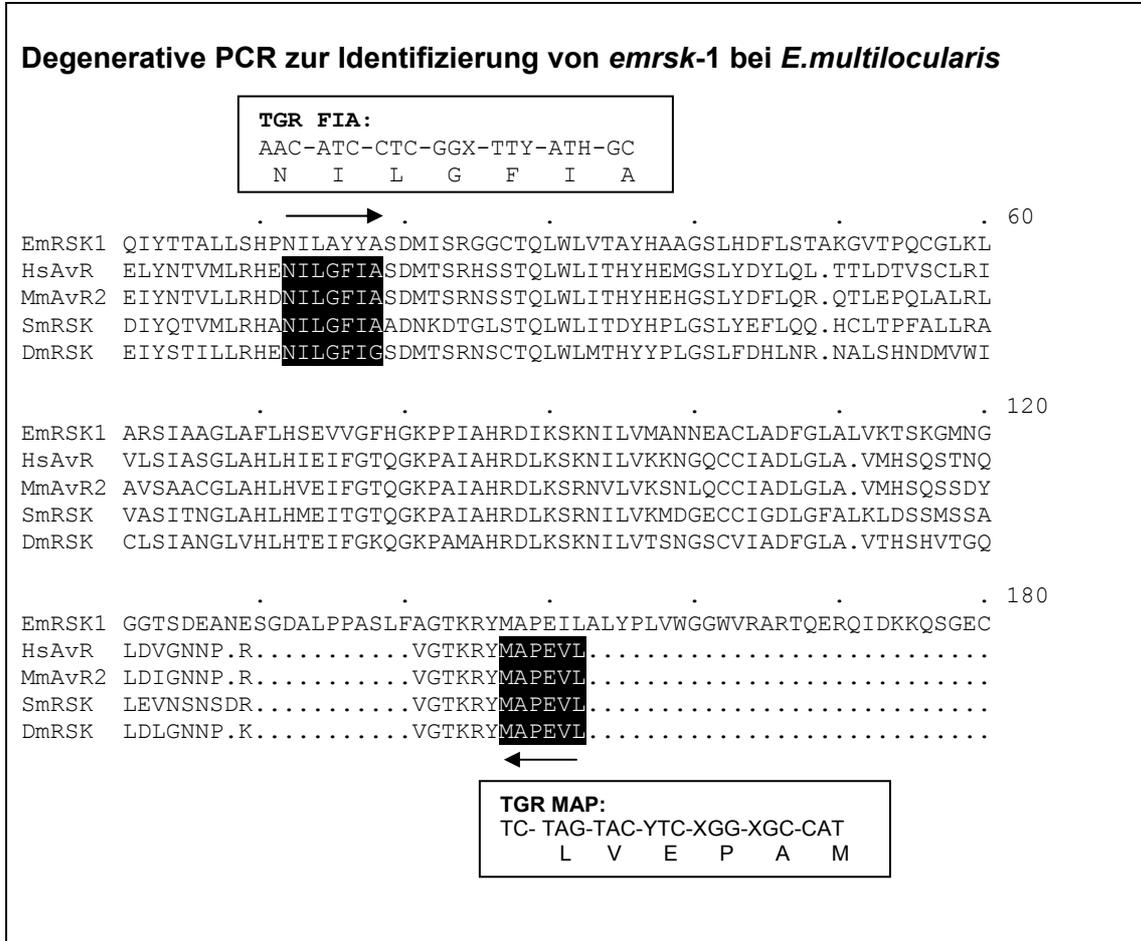


Abbildung 6: Die Abbildung zeigt Kinasedomänen von TGFβ- Rezeptorkinasen verschiedener Spezies im Vergleich. Sm= *S. mansoni*, Dm= *D.melanogaster*, Hs= *Homo sapiens*, Mm= *M.musculus*. Die schwarze Unterlegung bezeichnet Regionen, die zur Synthese der degenerierten Primer ausgewählt wurden. Die nach der PCR resultierende Sequenz des *E. multilocularis* TGFβ Rezeptorhomologen ist oberhalb der Sequenzen dargestellt. Die Leserichtung der Oligonukleotide ist mit Pfeilen markiert. In den Kästen ist die Aminosäuresequenz der Primer sowie ihre Nukleotidsequenz dargestellt.

Die degenerative PCR bei Niedrigstringenzbedingungen (Annealingtemperatur 45- 50°C) ergab zunächst weder für genomische DNA, noch für sscDNA als Template, Banden in der erwarteten Größe von 250- 300 Basenpaaren. Bei PCR mit genomischer DNA lagen viele Banden unterschiedlicher Größe vor, die auf unspezifische Bindungen schließen ließen. Bei Verwendung

diverser cDNA Präparationen wurde kein Ergebnis erhalten, vermutlich war die Expression der gesuchten Rezeptorkinasegene zu gering, oder die Überlagerung durch DNA von *M. unguiculatus*, die nie völlig zu vermeiden ist, zu stark.

Kürzlich konnte Transsplicing bei *E. multilocularis* beschrieben und die Sequenz eines Spliced Leaders identifiziert werden (Brehm et al., 2000b). Dieser Mechanismus eignet sich hervorragend, um aus cDNA Präparationen Transkripte, die über Transsplicing prozessiert werden, anzureichern. cDNA, die mit dem „Spliced Leader“- Primern Em10-SL und einem Oligo- dT Primer amplifiziert worden war, wurde in der degenerativen PCR eingesetzt und ergab schließlich, sowohl für das EGF-, als auch für das TGF β - Rezeptor- Homologe, Fragmente in der erwarteten Größe von ~ 200 Basenpaare bzw. ~ 450 Basenpaare.

Bei den Experimenten zur Isolierung des *E. multilocularis* TGF- β Rezeptorhomologen ergab sich im Agarosegel eine klare Bande, die ausgeschnitten, kloniert und sequenziert wurde (Abbildung 7).

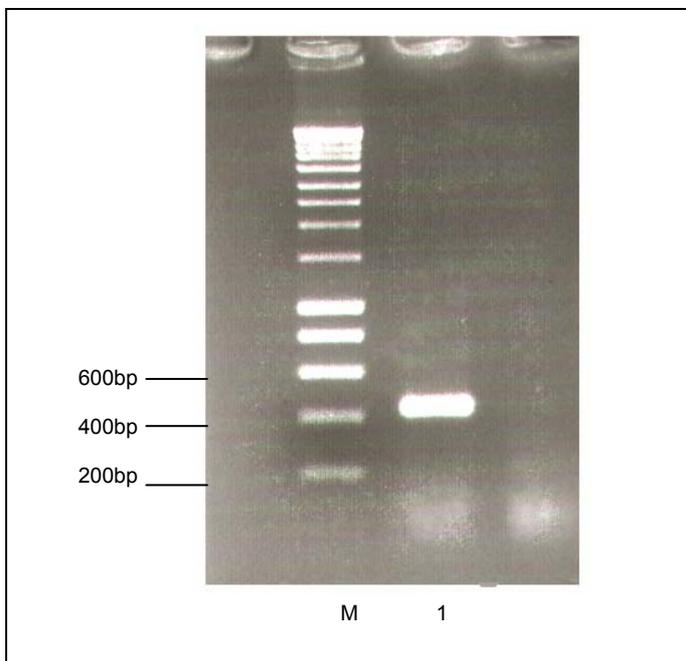


Abbildung 7: Degenerative PCR für *emrsk-1*. M= Marker, 1: PCR TGR TIA x TGR MAP

Die degenerative PCR für das EGF- Rezeptorhomologe ergab mehrere Banden (Abbildung 8). Der Gesamtansatz wurde kloniert und erhaltene Teilkclone mit Inserts der erwarteten Größe wurden sequenziert. Einer dieser Klone ergab die erwartete Teilsequenz.

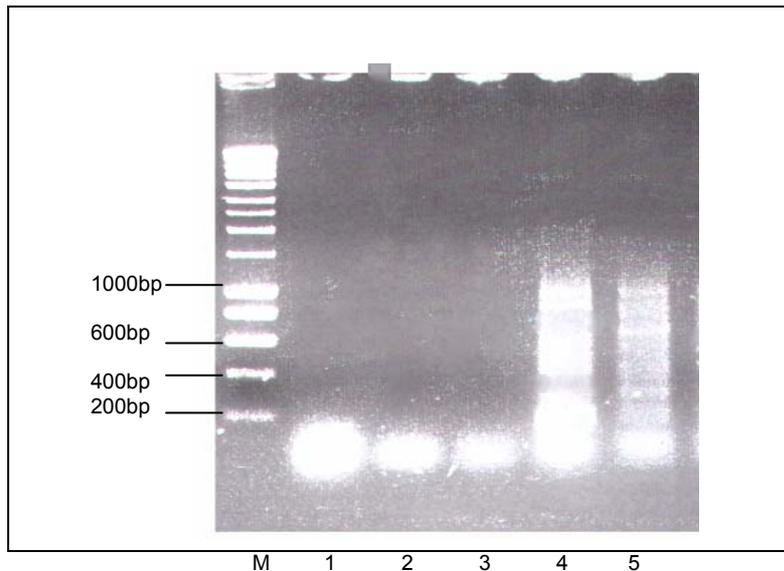


Abbildung 8: Degenerative PCR für *emrtk-1*. M= Marker, 1,2,3: kein Ergebnis, 4: PCR mit Primern EGR DGMx EGR DVW revers, 5: EGR LAA x EGR CWM revers

Aminosäuresequenzvergleiche mit in Protein- Datenbanken (BLAST; FASTA etc.) gespeicherten Daten ergaben, daß es bei den untersuchten Sequenzen tatsächlich um Mitglieder der EGF- bzw. TGF- β Rezeptorkinasefamilie handelte. Das für den Rezeptor der EGF Familie kodierende Gen wurde *emrtk-1* (*Echinococcus multilocularis* Rezeptor Tyrosinkinase 1), das für den TGF- β Rezeptor kodierende Gen entsprechend *emrsk-1* (*Echinococcus multilocularis* Rezeptor Serin/ Threoninkinase 1) benannt. Die Zahl 1 wurde in den Namen integriert, da aufgrund der Erfahrungen bei anderen Spezies zu erwarten war, daß noch weitere in Rezeptorkinasen *E. multilocularis* vorliegen.

Um die vollständige cDNA von *emrtk-1* zu erhalten, wurde zunächst auf eine bereits erstellte cDNA Bibliothek des *E. multilocularis* Larvenstadiums (K.Hubert, 2000) eine 3' RACE durchgeführt, mit deren Hilfe das 3' Ende

vollständig charakterisiert werden konnte. Dazu wurden die Primer PJG4-5-3PR, ein Vektorprimer, der dort auf dem Vektor bindet, wo sich die 3' Enden der klonierten Fragmente befinden, und EGR-DW4 (Nukleotidposition 4225 - 4242, Abbildung 9), ein in 3' Richtung lesender Primer, verwendet.

Das 5' Ende von *emrtk-1* konnte mit den Primern PJG4-5-5PR, einem Vektorprimer zur Identifizierung der klonierten 5' Enden, und EGR-UP23 (Nukleotidposition 1232- 1213, Abbildung 9) der in 5' Richtung liest, bis zur Aminosäureposition 277 charakterisiert werden. Die Bibliothek enthielt die gesuchte cDNA also nicht in voller Länge.

Eine PCR mit einem Spliced- Leader Primer (Em10-SL) mit EGR-UP23 ergab keine Bande. Die noch fehlende Sequenz konnte schließlich jedoch durch 5' RACE unter Verwendung des Smart Race Kits (Clontech) gewonnen werden. Als Primer wurden EGR 5'RACE (Nukleotidposition 1383- 1356, Abbildung 9) und UPM (Clontech) verwendet. Zusammengenommen resultierte das Experiment in einer Reihe sich überlappender Fragmente, deren Sequenz in voller Länge bestimmt werden konnte.

Um *emrsk-1* zu charakterisieren, wurde ähnlich vorgegangen. Für *emrsk-1* wurde zunächst ebenfalls eine 5' RACE mit dem Primerpaar Em10-SL und TGR-UP6 gegen den Spliced Leader und eine Teilsequenz durchgeführt. Im Gegensatz zu *emrtk-1* konnte hier ein spezifisches Fragment erhalten werden. Mit den Primern PJG4-5-5PR und TGR-UP6 (Nukleotidposition 189- 170, Abbildung 13) wurde ebenfalls auf die bereits erwähnte cDNA Bibliothek eine 5' RACE durchgeführt, die ebenso eine vollständige 5' Sequenz ergab, welche das bereits bekannte 5' Ende bestätigte.

Mit dem Primerpaar PJG4-5-3PR und TGR-DW2 (Nukleotidposition 931- 954, Abbildung 13) wurde eine 3' RACE durchgeführt, welche eine durchgehende Sequenz bis zur Aminosäure 419 ergab, das 3' Ende also nicht vollständig abbildete.

Zur Vervollständigung des 3' Endes wurde eine sscDNA mit OligodT Primer hergestellt (Clontech). Mit TGR 3'RACE (1223- 1248) und einem gegen den Poly A Schwanz gerichteten Primer wurde die vollständige Sequenz des 3'

Endes gewonnen. Auch für *emrsk-1* wurden mehrere überlappende Fragmente, mit deren Hilfe die vollständige Sequenz bestimmt werden konnte, erhalten.

Nach Bestimmung der vollständigen cDNA wurden für beide Gene Primer an den 5' bzw. 3' Enden ausgewählt, und die gesamte cDNA vollständig amplifiziert, was bestätigte, daß die Gesamtfragmente tatsächlich einer cDNA entsprachen.

3.2 Charakterisierung und Strukturmerkmale von EmRTK1:

Die charakterisierte *emrsk-1* cDNA ist vom Beginn der Sequenz bis zum Beginn des Poly A Schwanzes 5160 Basenpaare groß und enthält ein durchgehendes Leseraster für ein Protein von 1564 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 174,5 kDa. Vergleichsweise besteht der humane EGF-Rezeptor aus 1186 AS, mit einem Molekulargewicht von 170 kD. Bei *Schistosoma mansoni* ist ein Rezeptor von 200 kDa bekannt. Mit seinen 174,5 kDa bewegt sich EmRTK1 also in einer ähnlichen Dimension.

Das offene Leseraster endet an Position 4753- 4755 mit einem TGA Stopcodon, welches von 401 nicht kodierenden Nukleotiden bis zum Poly- A-Schwanz, dem eine potentielle Polyadenylierungsstelle vorausgeht, gefolgt wird.

Das wahrscheinlichste Startcodon befindet sich 61 Nukleotide vom cDNA 5' Ende entfernt, 18 Basenpaare stromaufwärts findet sich ein „in- frame“ TGA Stopcodon, das bestätigt, daß das komplette ORF charakterisiert wurde. Die Sequenz um das Startcodon (AGGAAUGC) entspricht nur ansatzweise dem „Kozak- Konsensus“ für erfolgreiche Translationsinitiation (RccAUGR) (Kozak, 1991). Weitere ATG Codons, innerhalb oder außerhalb des Leserasters, zeigen keine bessere Übereinstimmung, so daß davon ausgegangen werden muß, daß es sich bei dem erwähnten Startcodon tatsächlich um den korrekten Translationsstartpunkt handelt.

3. Ergebnisse

AAAAAAAAAACGTGCAGTTTGAACCTGCCAGTCCAGGGTGAATGTGGTTTTTCTAGGATGCTCCGGATTGGACAAACGCTTTTCATC	90
	* M L R W T N A F I 10
CCTTTATTGTTTTCTGGGGCCAATTTTGCATTTAAGCTATCCCTTGGCCCAAGATACGAGGATATAAAAAATGTGCAAGCAGGAATATT	180
P L L F 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	40
GATTGCCGCAACTCGATGAATGCTAAAACCTTACTTGCATACTATAAAAGACAGTATTCTCAGTGCACACATATTATAGGCAATCTTGGT	270
D C R N S M N A K T L L A Y Y K R Q Y S Q C T H I I G N L V	70
TTGTGCAACTTAAAACGACTAGAGGATGGTAGTGATCCTGATCTCTCCTTCTGAATTCAATTCGAGAAGTATCCGGCTATGTTTATATA	360
L C N L K R L E D G S D P D L S F L N S I R E V S G Y V Y I	100 (1)
GGTAATAATGAGGTGAAACGGATACCCTCATCTCATTACGGATCATTCTGGACGAGTACCATATCACGTTGGAATGTCGGTGATGGA	450
G N N E V K R I P L I S L R I I R G R V P Y H V G N V G D G	130
GCCCTAATGTGACTCGTAATGCCAAAAATTAACCTCATGGATTAGAAGTTTGGATCTTCGTAGTCTTGCCGTGATACAGGAGCACAAT	540
A L I V T R N A K N Y T H G L E V L D L R S L A V I Q E H N	160
ATAATAGCATGGGACAATCCAATGCTATGCCACTTCCAATACCCGTCGACTGTCCACAGCTCTTCGTGGATGTGAAGAATCAGAGACGA	630
I I A W D N P M L C H F Q Y T V D C P Q L F V D V K N Q R R	190
CTGAGTGTCTCTAAGGAGAATCTCATATCTGGCAGTGGCTGCGATTACGATACTGACTCGCCAATGCGTTCGCAACACGACCTGTCTAGT	720
L S V S K E N L I S G S G C D Y D T D S P M R R N T T C H S	220
GCCTGCTCCGAGAATGACGAGAAGGGGCACTGCTGGGACCAGAGAAGAATCAGTGTCAACTTCGTTCAAAATGTACCAAGGAATCCACC	810
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 E S T	250 (2)
ACGTACTGCGGTTTGTAGACAACCTTTCGAACGGATAAAGTGTGATGATGCCTGTATTGGCGGTTGCAATGGTAGCACCTCGAATTGTGG	900
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 (3)
GCGTGTGCATCCAAGAGGAATGGGACACCTGTGTGAGCTTCTGTCCCCACGCCACCATGTGAACCCGACGACGAGTGCACAGGAGCTG	990
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	310
AATCCGACTTCAAGTACGAGCTGCATGACATCTGTGTGAGACAGTGTCCAGAGCCGCTGTGAAGATGGACACGGTGTGCGTGATTGAA	1080
N P D F 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	340
TGTGACTTCAAACAACCATAACCAGTGAATGGCAGTGTGTCCCTGTGCAAAAACCCATGTGCTAATCATTGTGAACAGAAGGATATT	1170
C D F K T T I P V N G S C V P C A K T P C A N H C E Q K D I	370
TTTGGTTCGGGATTTCCTTGTATGACATCTGCGGCTGCAAGCGGATGAGCCAGTGTGCTTCTATTTCAGGCGCTATCTACATCAATAAG	1260
F G S R F P L M T S A A A K R M S Q C V F Y S G A I Y I N K	400
GATTCAATCAAGGTAACATTAAAGCGACCAGGCCCTCCAAATTGAAGATCTCTGGAATCTGCATAATATACGGCAAAATGTGGGCTACATT	1350
D S F K V T L K R P G L Q I E D L W N L H N I R E I V G Y I	430 (4)
TACCTCGATTGGATGCCTCCTCGCCGGAGTTGAGAAATTTGACATTTTTGGAGAACCCTCTACAAAGTTACTACTGAATTTTCTGATGGA	1440
Y L D L D A S S P E L R N L T F L E N L Y K V T T E F S D G	460
GTATCGTTGGATCAACCTCTGGTGATATATCATTCAAAGTATTTGGAGTTTTTGGGACTAAAAAGTCTTCGCTATATGGACATGACTGCC	1530
V S L D Q P L V I Y H S K Y L E F L G L K S L R Y M D M T A	490
TATTTGGAGGCGCTGCCATCTTTGTGCTATACAAGCGCTCTGGAGAAGATTCTTCCTGTTTGAACTAAGGGAGTCAAGGATCCAGCCACT	1620
Y I E A L P S L C Y T S A L E K I L P V R T K G V K D P A T	520
TGCATCCGGGAAGGCCACGTGTGTACAGTGAATGCCTCCCCGAAGCAGGTGTCTGGGGTCTGGGCCCGCAATGTGTGCCACTGTCTGC	1710
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 H C C	550 (5)
ACCTTCGAAGCCAACGGTGTCTGTGCTCCTCGATTGCTCTGAGGCACCCGGTTTCTACCTCCCCGAGCTCTGTGTCTCTACGCTCAGG	1800
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
TCGAAATTCGTTGTGCACTTTGCCACTTTCAATGAAACAAGTGGCACAAATGCAGGAGGAGGAGTGTAGCGGCTATCCGACCTGCA	1890
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	610
GTGAAGTGTGCACGATGTACGAAGAATGCGCGGAGTCTGTGCACTGCACCTGGGCCGGATCAGTGTCTAGGCGAATGTAAGCATTTCAG	1980
V K C A 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	640 (6)

3. Ergebnisse

TCAGGAGACACTTGTGTC	CAAGCGTGTCTCGAAGGAGCAGTACGCTGAGGAGAAGCAGAAGCTCTGTCAACCTGCAACTCCAAGTGT	TTA	2070
S	G D T	C V K R C S K E Q Y A E E K Q K L C Q P C N S K C L	670
GCGTCTCTGAAGTCCAAATTCCTCCAGATGACATCTCCGCGTGTCTGGACCCGGCGATTACCTCGGACTTGGGGATGTGCTTTCTGC			2160
A	S L K S K F P P D D I S A C S G P G D Y L G L G G C A F C		700 (7)
TACTTGTGAAAAAAGACAAAGCCACCTCCAAGTACCAGTGCCTGGATATGAAATGTCCACCCAAACACTTCGGCAACGCGACATCTTTG			2250
Y	F V K K D K A T S K Y Q C L D M K C P P K H F G N A T S L		730
ACGCATCTGAACTTGAAGAAAGAGGAATTTCCCTTAGTCAGTGTGCGGGCAGCAAATGCGGATCTCAGGAATGCGTTCCCTGCCATCCT			2340
T	H L N L K K E E F P L V S V R A A N A D L Q E C V P C H P		760
GAATGCGAGGTTTGTGTCGGTCCAGGAAATCACGTCTCCGTTTGTGAAAATGTGCAAAATGGATGTACCGTCCGGAGTGTGTCAATGCC			2430
E	C E V C V G P G N H V S V C R K C R N W M Y R S E C V N A		790 (8)
TGTCTCCTGACGACACCTATGTGCCAATGCAACGGCAACAGAACCTCTCAGAGAGAGAAAAACAGATGTTGGAGAGCGGGAATGC			2520
C	P P D D T Y V P N A T A T E H L S E R E K Q M L E R R E C		820
CTACGATGTATGAGCAATGTGCTGGAGGTGTACGGCCTACGGACCGGAGTTCTGCAACAACACTGTGCTATGCCAAAATCATGATTGAT			2610
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 M I D		850 (9)
GTGACGGCAATAAGTTTATCTGCAACTCAACATGCCACCAGAGCTCTACAAAATGGAAAAACCAATCTCTGCCGACGAGGAGCAG			2700
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
TACGAAAAATGTCCGGTGCAAAATGGCGCGTGTGCAAAATCAGGCCCTCATAGCGGCTGGGATGTCTCTCTTTCTCTCATCTTC			2790
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		910(10)
TCTCTGTACTTTTCTGTTTCTGCTTCAATTACAAGGCCAAACGAGTCTGATTAAGGAAGCCTTAAAATCTACCTACACTAATACAAA			2880
S	L V L 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		940
GCACCGGATATGAAGACGCAAAATCAAGCAGGGAACCAAAATATGGGCCGTTGGGAGATGATCAACATTGATGACTTGACTTTCGACGAT			2970
A	P D M K D A K S S R E P N M G R W E M I N I D D L T F D D		970(11)
GCCACAATCCCATCGGCAGAGGGGCATTTGGTGAGGTGTATCGAGGCAAGTGGCGAGTACCGAAGCGAGTGTGAATCAGTTCAATTGG			3060
A	N N P I G R G A F G E V Y R G K W R V P K R V L N Q F N W		1000
GCACGGAACACTTCGCTGGATGTGGCTATCAAAGTATTAGATCAGCTGCGCCACAGCTCAAGGTGGTGTGCGTCAAATCTCGGTGCC			3150
A	R N T S L D V A I K V I R S A A P T A Q G G A A S N L G A		1030
TCTGGATTAGACGGCAATGTCAGCACCGTTCGAAGCTCTCAGCTGGCGCCAACACCATTGATCGCATCTCCGCTAGAAGTAACTCCAG			3240
S	G L D G N V S T V A S S Q L G A N T I D R I S A R S N L Q		1060
GATATGCTTACGGAAGCCAAAGTAATGGCCTCGGTGCAGCATAAGAATTGCTGCCCCCTCATTTGGTGTCTGTTTGACCCGGAAAATGCAA			3330
D	M L T E A K V M A S V Q H K N C L P L I G V C L T R K M Q		1090
TGCATGGTGTGATGTTTGGGAGGAGGGCAGTCTGGATCGTTACCTACGCTCCACAGGGACGACTTGAATAGTTTACCTTGCTTTCA			3420
C	M V S M F V E E G S L D R Y L R L H R D D L N S F T L L S		1120
TGGCGGAACAGATTGCTGACGGGATGGCCTACCTAGAGGAACGTGGGATTATTCATCGTATTGGCTGCAAGAAACGTGCTTGTTCAA			3510
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 L V Q		1150
TCTCGGGAGCTGGTGCAAAATAACCGATTTCCGATTGGCTAAAATGTTGGACCAACAACAGGACAGCGTTGTAGTTCCGACTGGACGT			3600
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
GTTCCAATTCGTTGGTTGGCTATTGAGACGCTTCAAGCTGGCATCTACTCTCACAAAACCGATGTCTGGAGCTACGGTGTGACGCTGTGG			3690
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		1210
GAGATTTTACATTTGGCAACAACCTACGAAAATATAAGCACCTCGGAGATTAAGGATCATGTAATGAAGGGAGTGGGCTGAGTCAG			3780
E	I F T 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		1240
CCAGAAATTTGACGCTTGACACCTACATGGTGTGGTGAATGTGGATGGAAGAACACGAATCCAGACCGACTTCTTAGAGCTGATG			3870
P	E I C T L D T Y M V M V Q C W M E E H E S R P T F L E L M		1270
AAATGTTTCCACAAGTACTGTCAAACGCCGGGAGATACTTGTACATCGAGGGCGATGAGTATGCGATAACTCGTGCCTCTCCGTACACC			3960
K	C F H K Y C Q T P G R Y L Y I E G D E Y A I T R A S P Y T		1300
CCTTACCGGCTCCTTGGACCGAGATGAAGCCGCTGCCAGTAGTTTCCGGGGCGTACCAGACGGCACTTTGGGGCCACCAATGGGACG			4050
P	S P A P W T E M K P L P S S F R G V P D G T L G P P N G T		1330
GGGTGTGCCTTTAGTTCCCTGAAGAGCACTTCTTCGATGATCATCAACACCACCTTCTGGGAGAGACAATGGGAGGGGAGTGGCAAC			4140
G	C A F R F P E E H F F D D H Q H H L L G E T M G E G S G N		1360

3. Ergebnisse

CCGGAGGCAGAATCTCTTCTCCGAGAGAGTTGGCAACGATCATCATCATCATCGCCGATTTTCTCCCACTCAAATGAGACGAGAATG	4230
P E A E S L L P Q R V G N D H H H H R R F F S H S N E T R M	1390
CGACAAAGCGGGCGACAGGAGCGTCTCCGGCTGCTGGTGGTGGTGCATCGACAAACACTTCCGTGGTCTCGACGAATTTGGACTCGTGG	4320
R Q S G R Q E R A P A A G G G A S T N T S V V S T N L D S W	1420
CCAGCTGGAAGCGGGATGGGATTGAATGCCGCCTTCCCTGTCTTAGAGCATAGTGCAAACCAGCAACAACAACCGAAATACTACAACACC	4410
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 Y N T	1450
GCTTTTCTGGCCAGTGGCACTTACGGACCCCTTGTAGACCACCATCACCACCGCCAGCCACCACCCTTGCACAAGTGGAGCGTGAT	4500
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
GATGACTTAGACACGATGGGTAGTGGGATTAAGACGCTGAGATTAACCTCTCCACTCTCGAGATGTCTATGGACGGTGTGAGGGA	4590
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	1510
GCGGGTGGAGGGGAACAATCGTTGCAGCCAGAAGACTACCTGGAACCCAGAGCAAGTGCCGATGGCAAAAAACGGTCGAGAGGTTTCAAT	4680
A G G G 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	1540
GCCGTTGGAATCCCGATTACTTGGTGGATAATCAAGAATACTTCCAACCTGCCGGTCCGACTAAACCCGTTTAAAAATGCGTATCTCTA	4770
A V G N P D Y L V D N Q E Y F Q P A G P T K P V *	1564
CTCCCTTCCCCACCTGACCCCTTCCCTTACATCTGGTGTAATATCACCCAATCAGCACAGGTGGTGGAGAGATGGAAGAGCACATATC	4860
ATTCGTTATTTGTTTATACCCTCCACACATCCATCTTCAACGTACGTACCTGTGAATACCGTCAGCATTACAGAGGCCATGGTTAAT	4950
ATGGCTTCTCCGCGTCTTTCTACCCATCCTTCAGACTCTTCTTATTTGCTCCCGAGCCCTTTTCCAGCTTGTCATCCCGCGCCTAAC	5040
CGATGTTTACTGCGTTCATTGAAACTTGCCGCGCCATACACACCAGCTTACTTCTCTCACCTGCGCCAAGCAACTTCATTTCTACTGA	5130
CAAATAAATTAGTAGTACATGCCCTAAAAAATAAAAAAAAAA	5173

Abbildung 9: Vollständige cDNA und Aminosäuresequenz von EmRTK1.

Markierungen: **Potentielle Polyadenylierungsstelle** (5133- 5138), **In- Frame- Upstream Stopcodon** (43- 45), **Startcodon** (61- 63), **Stopcodon** (4753- 4755). **C** = Cysteine in Furinähnlichen Domänen, **G** = Funktionell Wichtige, hochkonservierte Domänen, **K** = basische AS des Transferstoppsignals. Domänen sind farbig markiert: 1: Rezeptor L- Domäne, 2, 3: Furinähnliche Domänen, 4: Rezeptor L- Domäne, 5-9: Furinähnliche Domänen, 10: Transmembrandomäne, 11: Tyrosinkinasedomäne
 Intronpositionen in chromosomaler DNA

Obwohl EmRTK1 vermutlich, wie die bekannten Vertreter aus Vertebraten und *Drosophila*, durch einen sekretorischen Mechanismus über den Golgi - Apparat an der Oberfläche exprimiert wird, ist mit herkömmlichen Computerprogrammen keine eindeutige Signalsequenz nachweisbar, eine mögliche Schnittstelle, nach der Methode von Heijne, befindet sich zwischen den Aminosäureresten 20 und 21 (<http://psort.nibb.ac.jp>, von Heijnes, 1986). Ungewöhnliche Signalsequenzen wurden jedoch bereits für Plathelminthen beschrieben (Davies & Pearce, 1999). In der Strukturanalyse nach der Methode von Schultz (Schultz et al., 1998) konnten für EmRTK1 typische Domänenstrukturen identifiziert werden: Das Protein enthält sieben Furin- ähnliche, cysteinreiche Regionen im

extrazellulären Bereich, deren Abfolge von zwei Rezeptor L- Domänen unterbrochen wird.

Zusammen dienen diese Bereiche als Liganden- Bindungsdomänen (Abbildungen 9, 10). Die zweite der beiden Rezeptor -L- Domäne besitzt zwar klare Homologien zu bereits beschriebenen Domänen, lag aber dennoch unterhalb des vom Suchprogramm erkannten Schwellenwertes. Weiterhin liegt eine klare Transmembrandomäne vor. Der Transmembrandomäne folgt ein typisches Transferstoppsignal, das aus basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin besteht (Abbildung 9). Die Kinasedomäne, welche strukturell aus zwei Hälften besteht, enthält die Mehrheit aller hochkonservierten Reste. Der N-terminale Lobus ist verantwortlich für die ATP/ Mg^{2+} Bindung, für die ein GxGxxG Motiv essentiell ist. Dieses Motiv wird von einem Valin gefolgt, welches für die korrekte Positionierung der konservierten Glycinreste und ihre Interaktion mit ATP notwendig ist (Van der Geer et al., 1994; Hanks et al., 1988).

In EmRTK1 konnte ein passendes Motiv (**GRGAPGEV**) zwischen Position 976 und 983 nachgewiesen werden (Abbildung 9). In C- terminaler Richtung lag ein konserviertes Lys¹⁰¹¹ vor, dem ein Glu¹⁰⁶⁵ Rest folgt. Diese Reste sind an der Phosphorylierungsreaktion beteiligt (Hanks et al., 1988). Wie bei beinahe allen Tyrosinkinase (Hanks et al., 1988), geht dem Lysin auch hier ein Alanin (A¹⁰⁰⁹) genau zwei Aminosäurereste in N- terminaler Richtung voraus.

Im zweiten Teil der Tyrosinkinasedomäne bildet das Motiv HRDLAARN den katalytischen Loop, dessen hochkonservierter Aspartatrest (D¹¹⁴¹) die katalytische Base darstellt (Van der Geer et al., 1994; Hanks et al., 1988). Ein vollständig konserviertes Motiv befindet sich bei EmRTK1 an Aminosäure-Position 1139- 1146 (Abbildung 9), die genannte Sequenz ist typisch für Tyrosinkinase aus Nicht- Vertebraten (Hanks et al., 1988).

Ein weiterer wichtiger Aminosäurerest für den katalytischen Prozeß von Tyrosin- und Serin/ Threonin- Kinasen ist ein Aspartat in einem DFG Motiv, das als Chelator für Mg^{2+} dient (Hanks et al., 1988). EmRTK1 zeigt dieses DFG- Motiv an Position 1159 - 1161.

Es wurde beschrieben, daß alle bisher bekannten Tyrosinkinase neun unveränderliche Aminosäurereste in ihrer Kinasedomäne aufweisen, und mit wenigen Abweichungen auch fünf weitere Reste als hochkonserviert nachgewiesen werden können (Hanks et al., 1988). Alle 14 Reste sind in EmRTK1 vorhanden: Bei den absolut unveränderlichen Aminosäuren handelt es sich um G⁹⁷⁸, K¹⁰¹¹, E¹⁰⁶⁵, D¹¹⁴¹, N¹¹⁴⁶, D¹¹⁵⁹, G¹¹⁶¹, E¹¹⁸⁹ und R¹²⁶³. Die geringfügig variablen Reste sind G⁹⁷⁶, V⁹⁸³, F¹¹⁶⁰, D¹²⁰¹ und G¹²⁰⁶ (Abbildung 9).

Viele dieser Reste, wie D¹¹⁴¹, N¹¹⁴⁶, D¹¹⁵⁹, F¹¹⁶⁰ und G¹¹⁶¹ nehmen vermutlich direkt an der ATP-Bindung und Phosphorylierung teil, wobei die beiden genannten Aspartate wahrscheinlich über Mg²⁺ Salzbrücken mit der Phosphatuntereinheit von ATP reagieren (Brenner, 1987). Das DFG-Motiv ist ein deutlich konservierter Abschnitt, der auf beiden Seiten von hydrophoben oder neutralen Aminosäuren begleitet wird. Für EmRTK1 wird diese Regel bestätigt: Auf der N-terminalen Seite liegt ein neutrales Threonin, auf der C-terminalen ein hydrophobes Leucin vor.

Für die katalytische Funktion scheint der Bereich Ala-Pro-Glu von Bedeutung zu sein (Hunter & Cooper, 1986), der bei EmRTK1 leicht verändert in Form von Ala-Ile-Glu an Position 1187 bis 1189 erscheint. Studien haben gezeigt, daß sich dieses Motiv nahe an der katalytischen Stelle befindet, sowie die Tatsache, daß Mutationen dieses Bereiches die Funktion der Kinase stören können (Bryant & Parsons, 1983).

Auch die Umgebung dieses Motivs ist hochkonserviert: Der Konsensus dieser Region ist P I/V K/R W T/M A P E. Hiermit stimmt EmRTK1 weitgehend überein mit der Sequenz **P I R W L A I E** an Aminosäureposition 1182-1189.

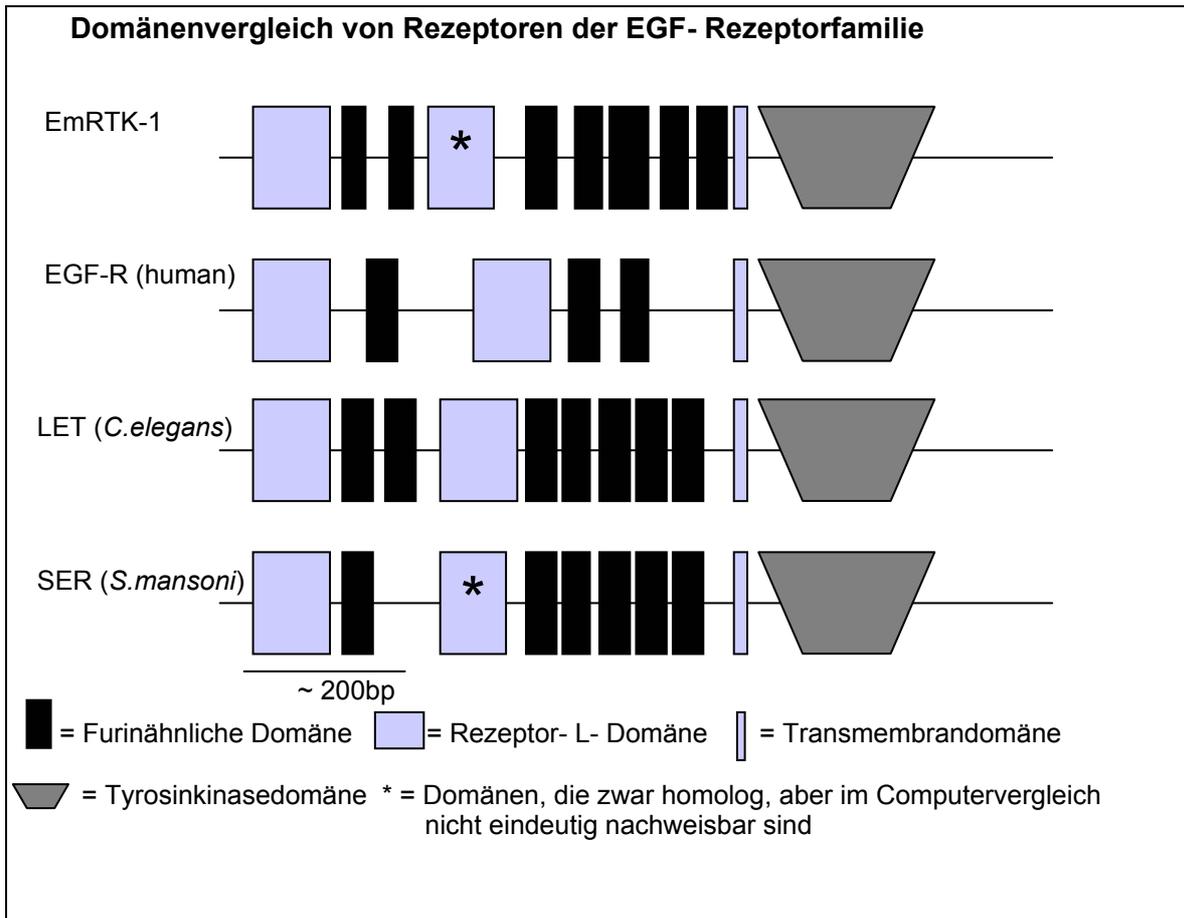


Abbildung 10: Vergleich der Domänenstruktur verschiedener Rezeptoren der EGF Rezeptorfamilie

3. Ergebnisse

Aminosäuresequenzvergleiche mit bekannten Proteinen in Sequenzdatenbanken ergaben höchste Homologien von EmRTK1 zu SmSER, einem EGF Rezeptorfamilien- Homologen, aus *S. mansoni*. Die Übereinstimmung zeigt 43% identische und 57% ähnliche Aminosäurereste. Ein Sequenzvergleich der Kinasedomänen von Mitgliedern der EGF-Rezeptorfamilie unterschiedlichen phylogenetischen Ursprungs ist in Abbildung 11 gezeigt. Die hohe Homologie zu SER, aus *S. mansoni*, geht aus der Abbildung hervor, zudem sind die katalytisch wichtigen Motive unter den verglichenen Rezeptorkinasen hoch homolog und in der Abbildung gekennzeichnet.

Der chromosomale Locus von EmRTK1 konnte unter Verwendung spezifischer Primer gegen die *emrtk-1* cDNA in Form mehrerer überlappender Fragmente amplifiziert und in voller Länge charakterisiert werden. Er umfaßt insgesamt 39103 Basenpaare. Er beinhaltet 23 Exons, von 54 bis 526 Basenpaaren Länge und 22 Introns, deren Größe zwischen 31 Basenpaaren und 5606 Basenpaaren liegt (Tabelle 5, Abbildung 12). Alle Introns besitzen an der 5' Spleiß- Donor-Sequenz bzw. der 3' Spleiß- Akzeptor- Stelle die kanonischen Dinukleotide 5'-GT-AG-3'.

Exon Nr.	Position	Exon Größe in bp	5' Spleiß- Donor Sequenz	3' Spleiß- Akzeptor Sequenz	Intron Größe in bp	Unterbrochene Aminosäure
1	1- 105	105	TCT G gtatat	atttag GG GCC	31	Gly (16)
2	137- 190	54	AAA A gtaata	gttttag TA TGT	34	Ile (14)
3	225- 356	132	CTA G gtatat	tccttag AG GAT	33	Glu (78)
4	390- 881	492	CTT C gtgagt	gtaaag GT TCA	1916	Arg (242)
5	2798- 2913	116	TGG gtcagt	ccgcag GCT	2411	Trp*(280)
6	5325- 5466	142	CCA G gttggt	tttcag AG CCG	2481	Glu (328)
7	7948- 8055	108	AAT C gtaaga	atatag AT TGT	1193	His (364)
8	9249- 9369	121	TTC AA gtgagt	tctaag G GTA	1118	Lys (404)
9	10488-10645	158	GAA T gtaatt	ttacag TT TCT	259	Phe (438)
10	10905-11099	195	TGC A gtgagt	ctgcag TC CGG	2756	Ile (522)
11	13856-14211	356	AAG gtgcgt	tttttag TCA	5605	Lys*(640)
12	19817-20012	196	AAA G gttggt	gatcag AC AAA	3650	Asp (706)
13	23663-23926	264	CCT G gtgagt	tttttag AC GAC	1551	Asp (796)
14	25478-25662	185	AAG gtttgt	aaacag TTT	3618	Lys*(855)
15	29281-29550	270	AAG gtgagc	ctgcag GAC	3322	Lys*(945)
16	32873-33238	366	AAA gtaact	ttgttag GTA	1798	Lys*(1067)
17	35037-35254	218	CAT CG gtgagt	ccgcag T GAT	1471	Arg (1140)
18	36726-36922	197	TAC G gtaatg	atgcag GT GTG	83	Gly (1206)
19	37006-37152	147	CAA T gtaagt	ctcttag GC TGG	87	Cys (1255)
20	37240-37337	98	GAG gtaatt	cttttag GGC	181	Glu*(1287)
21	37519-37963	445	TTA G gtgcgt	atgttag AG CAT	176	Glu (1436)
22	38140-38421	282	AGT G gtaggt	ttgaag CC GAT	156	Ala (1530)
23	38578-39103	526				

Tabelle 5

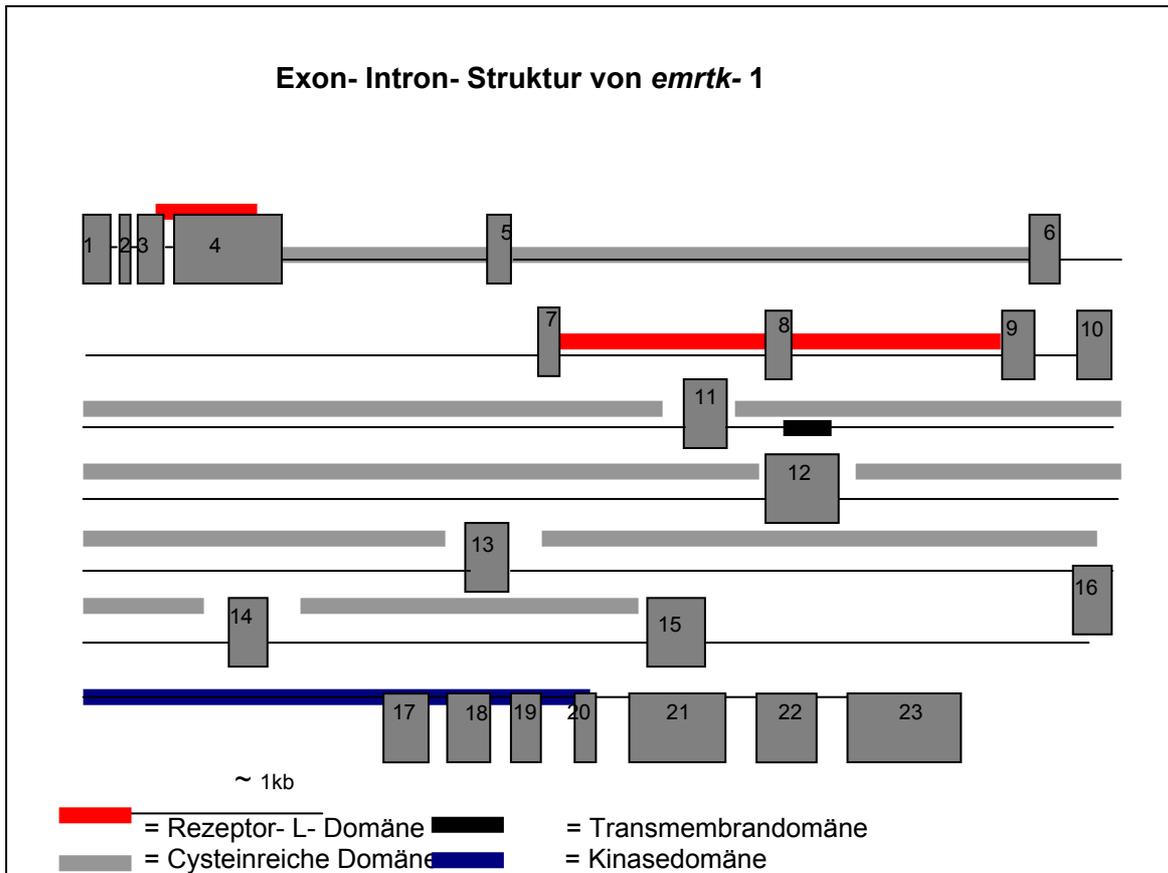


Abbildung 12: Chromosomaler Aufbau der *E. multilocularis emrtk-1* Locus. Die Exons (1-23) sind durch graue Boxen symbolisiert und nummeriert. Die Introns sind als Linie dargestellt. Die Darstellung ist maßstabsgetreu, genaue Größen können Tabelle 5 entnommen werden. Der Verlauf der Domänen ist durch Balken gekennzeichnet.

3.3 Charakterisierung und Strukturmerkmale von EmRSK1:

Die *emrsk-1* cDNA begann mit einer typischen *E. multilocularis* Spliced Leader Sequenz (Brehm et al., 2000b) und war von ihrem Beginn bis zum Beginn des Poly- A- Bereichs 1829 Basenpaare lang. Das offene Leseraster (ORF) von EmRSK1 umfaßte 543 Codons, die für ein Protein mit dem errechneten Molekulargewicht von 60 kDa kodieren. Damit entspricht EmRSK1 in der Größe den bereits bekannten Mitgliedern der TGF β - Rezeptorfamilie: Der humane Activinrezeptor beinhaltet z.B. 509 Aminosäuren (~ 57 kDa), ein TGF β

Homologes aus *S. mansoni* ist 780 Aminosäuren lang und besitzt ein Molekulargewicht von ~ 86 kDa.

Das offene Leseraster von *emrsk-1* endet an Nukleotidposition 1717- 1719 mit einem TGA Stopcodon, welches von 108 nicht kodierenden Nukleotiden bis zum Poly- A- Schwanz, dem eine potentielle Polyadenylierungsstelle (1806-1811) vorausgeht, gefolgt wird.

Das wahrscheinlichste Startcodon befindet sich 88 Nukleotide vom cDNA 5' Ende entfernt, 33 Basenpaare stromaufwärts findet sich ein „in- frame“ TGA Stopcodon, das bestätigt, daß das komplette ORF charakterisiert wurde. Die Sequenz um das Startcodon (CAAAUGT) zeigt wenig Übereinstimmung zum „Kozak“- Konsensus (RccAUGR) für gute Translationsinitiation. Dennoch muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem beschriebenen ATG um den tatsächlichen Translationsstartpunkt handelt, da es sich, abgesehen vom Spliced Leader, um das erste ATG handelt und weil andere ATGs keine bessere Übereinstimmung mit dem Konsensus aufweisen.

Die höchste Homologie von EmRSK1 bestand zu Rezeptoren der Activin-Subfamilie von Vertebraten. Die höchste Übereinstimmung zeigte sich naturgemäß im Bereich der Serin/ Threonin- Kinase- Domäne. Aber auch andere, typische Bereiche eines TGF- β Rezeptors waren in der Strukturanalyse nach der Methode von Schultz (Schultz et al., 1998) nachweisbar: Strukturell konnte eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne, eine mögliche Transmembran- Helix, der ein Transferstoppsignal folgt (Abbildung 13), eine GS- Box, die für Typ I Rezeptoren charakteristisch ist (Davies et al., 1998) und als Phosphorylierungsstelle dient (Wrana et al., 1994) sowie eine Serin/ Threoninkinasedomäne identifiziert werden (Abbildung 13 und 14).

Ähnlich wie bei EmRTK1 läßt sich auch für EmRSK1 keine eindeutige Signalsequenz feststellen. Es ist unklar, wie der Export eines Proteins ohne Signalsequenz in Echinokokken abläuft. Bei einem *S. mansoni* TGF- β Rezeptor- Homologen (Sm- RK1) konnte ebenfalls keine typische Signalsequenz identifiziert werden, trotz nachgewiesener Expression an der Oberfläche des Parasiten. Ein ungewöhnlicher Exportmechanismus wurde

3. Ergebnisse

vermutet (Davies & Pearce, 1999). möglicherweise gibt es auch für EmRSK1 alternative Exportmechanismen.

Die extrazelluläre, cysteinreiche Bindungsdomäne zeigte Abweichungen zu bereits bekannten Typ I Rezeptoren. Die typische Anordnung von Cysteinresten in der extrazellulären Domäne wurde folgendermaßen beschrieben: C x C_{x-3-5} C₄₋₂₅ C₄₋₅ C₁₃₋₁₆, GCX₇₋₁₉ C₁₁₋₁₃ und darauf folgend eine sogenannte Cystein- Box (C C X₄₋₅ C N) (Kingsley, 1994).

EmRSK1 zeigt ein abweichendes Muster: C x₅ C x₁₈ C x₁₀ C x₉ C C x₈ C N, an Position 14 bis 81. EmRSK1 weist also nur vier Cysteinreste außerhalb der Cystein- Box auf, die zudem größere Abstände aufweisen, als vorbeschrieben. Die Cystein- Box ist vollständig, aber von ungewöhnlich vielen variablen Aminosäureresten unterbrochen (Abbildung 13).

<p> CACCGTTAAATCGGTCCTTACCTTGCAGTTTTGTATGTTGTACAAAACCTCCTGTTGATTAAATGAAAAACATACCATTTTGTGCAAATG 90 * M 1 </p>
<p> TTTTCATCGGAAACTTGTGGGAAAGATCATCGGAATGCGCGTCTTTGATTGGATGCTTTTATTCTGTCCAAAAGGACGCCCTTAGGATAT 180 F S I G N L W E R S S E C A S L I G C F Y S V Q K D A L G Y 31 </p>
<p> GTGGTCGACGAGCATTTATGGTTGCCTTCTCAATAATTCCTTTTCCATAATCTCCTGCCTCAATTTCCGGTGGTACCAATACAACCTGTGTC 270 V V D E H Y G C L L N N S F S I I S C L N F R G T N T T C C 61 </p>
<p> TTTTCATCAAACCTCCTCGGACTATTGTAATGCGCATCTCCCTGTAACAACAAGAAATACCGGTGCCTTGTTTTTTCCACTCACATTTTTT 360 F S S N S S D Y C N A H L P V N K Q N T G A L F F P L T F F 91 (1) </p>
<p> ACCGTTACTCTGCATTTTGTGTTTTGTATTAGCCTTTGTGTATATCAAAGGAACTTCAGCAAACATGAGAAGCCCTTACAAGCATTCC 450 T V L C I L L F V L A F V Y I K G N F S K H E K P L T K H S 121 (2) </p>
<p> TCCCCTTATTTCCCGAATTTACTGATAGTGGCAGCGGGTCCGGGAAAGCCGTTCTTAGTTAGTCAAACAATTGCTCGTCAAACAACCCCTT 540 S P Y F P E F T D S G S G S G K P F L V S Q T I A R Q T T L 151 </p>
<p> CTGGTATGTATCGGAAAAGTTCGGTTCGGCGAAGTATGGCGAGCCGCTGCAATGGCGAAGTTGTTGCTGTGAAGATCTTTTCCAGCCGT 630 L V C I G K G R F G E V W R A V C N G E V V A V K I F S S R 181 (3) </p>
<p> GATGGCGCCAGTTGGACCCGTGAAACTCAGATATATACCCTGCTCTCCTTCTCACCCGAACATTCTCGCCTATTATGCCAGTGATATG 720 D G A S W T R E T Q I Y T T A L L S H P N I L A Y Y A S D M 211 </p>
<p> ATTTACGCGGGTGGATGTACTCAACTCTGGCTTGTACCAGCTACCACGCTGCCGGTCCCTGCACGATTTCCCTTTCCAGGCAAAAAGT 810 I S R G G C T Q L W L V T A Y H A A G S L H D F L S T A K G 241 </p>
<p> GTGACTCCGCAATGTGGACTCAAACCTAGCCGATCAATCGCTGCGGGTCTAGCCTTCTCCACAGCGAAGTAGTTGGATTTTCATGGCAA 900 V T P Q C G L K L A R S I A A G L A F L H S E V V G F H G K 271 </p>
<p> CCGCCGATTGCCATAGGGATATTAATCTAAGAATATTCTGGTTATGGCTAACAATGAGGCCTGTTGGCAGATTTTGGTCTCGCTCTG 990 P P I A H R D I K S K N I L V M A N N E A C L A D F G L A L 301 </p>
<p> GTAAAACTTCCAAAGGAATGAATGGTGGGGGACCAGCGATGAGGCAAATGAGAGCGGTGACGCTCTACCTCCCGCTAGCCTCTTCGCA 1080 V K T S K G M N G G G T S D E A N E S G D A L P P A S L F A 331 </p>
<p> GGAACCAACCGGTACATGGCTCCTGAGATATTGGCTCTTTATCCCTTGGTGTGGGGTGGCTGGGTGCGTGGCGGCACGCAGGAGAGGCAG 1170 G T K R Y M A P E I L A L Y P L V W G G W V R A R T Q E R Q 361 </p>

3. Ergebnisse

ATAGACAAGAAACAGTCTGGGGAGTGTGATGAAGACAATTTGTCTATTCCAGGGGAATTGTTAGAGTGCCGACATCCGCTGCTTTCTTTC	1260
I D K K Q S G E C D E D N L S I P G E L L E C R H P L L S F	391
GATGTCTATCTATCCACAGATGTCTACGCACTGGGACTCGTTCTATGGGAGATTTGGAGGCGTTGTACAGGCAAACAATACGAGCTTCT	1350
D V Y L S T D V Y A L G L V L W E I W R R C T G K Q Y E L P	421
TATTATGACTCGGTGCCATCGGATCCAAACTTCTTACAGATGTACAGAGTGGTAGTATTGGGGGAACCCCTATGATTCTCCTTGTAACACC	1440
Y Y D S V P S D P N F L Q M Y R V V V L G E P Y D S P C N T	451
CTGGTAGACCTGCCCTACCAATGCAGGTGTGCCACCTATGCAACCACATTCTGGTGGGTGGAATTGGTGAACCGCTGGAAGCTCACCGC	1530
L V D L P L P M Q V C H L C N H I L V G R I G A T L E A H R	481
CACCGCCGACACGGGGGAGCGGGGAGCGGCCCTCCCTGACAATGGAGCGGAGGGGGAGCAGTGATGAGGAGTGGCTGGTGGCGTGGGGC	1620
H R R H G G S G R R P S L T M E R R G S S D E E W L V R W A	511
GACGTCATTGCGGAGTGTGGCACCTCGTTACACACACCGCCTCTCGGCCCTGCGCGTGCGCAAACCCCTCACAGTCATCGAGGCGACT	1710
D V I A E C W H P R Y T H R L S A L R V R K T L T V I E A T	541
GTGAGCTGAATCGGACGCTGCGTTGGACACTTTTTATGCTCAGAACCTTGCAATTAATGTTCTCTCTTTTAAATGAAATTCCTGGTAAAT	1800
V S *	543
ATGGTATTAAATGCATACGCACCGACCCAAAAA	1842

Abbildung 13: Vollständige cDNA und Aminosäuresequenz von EmRSK1.

Markierungen: **Spliced Leader** Sequenz (1-36), **potentielle Polyadenylierungsstelle** (1806-1811), **In-Frame- Upstream Stopcodon** (55-58), **Startcodon** (88-90), **Stopcodon** (1717-1719). Domänen sind farbig markiert: 1:Transmembrandomäne, 2: GS Motiv, 3: Serin/Threoninkinasedomäne

Ⓢ = Cysteinreste der extrazellulären Domäne, □ = Leucin- Reste des Leucinzippers □ = Transferstoppsignal, DGA = αC, β4, L45 Loop und β5- Region (in dieser Reihenfolge)

↓ = Intronpositionen in chromosomaler DNA

Die cytoplasmatische Region von Mitgliedern der Typ I Rezeptoren der Rezeptorfamilie weist untereinander hohe Homologien auf. Sie umfaßt bei allen bisher untersuchten Faktoren ein GS- Motiv und eine Serin/ Threonin Kinasedomäne (Abbildungen 14 und 15).

Für die Interaktion von Typ I Rezeptoren mit Downstreamfaktoren, den Smad Proteinen, konnte die Region αC- β4- β5 mit dem L45 Loop, als wichtig identifiziert werden (Feng & Derynck, 1997).

Die verschiedenen Rezeptoren der TGF β Familie bevorzugen unterschiedliche Liganden, wie TGF β, Activin oder Bone Morphogenetic Protein (BMP), und unterschiedliche Smads als Downstreamfaktoren. Rezeptoren, deren Liganden TGF β oder Activin sind, verwenden als Downstream Faktoren vom Smad2 und Smad3-Typ, während BMP bindende Rezeptoren Smad1, Smad5 oder Smad8 zur Signalweiterleitung verwenden (Lo et al., 1998). Der Bereich, der diese Spezifität bedingt, ist der L45 Loop in TGF β Rezeptoren (Feng & Derynck, 1997) und, korrespondierend, der L3 Loop in Smads (siehe unten).

Tabelle 6 zeigt, daß EmRSK1 in diesem Bereich eine deutlich höhere Homologie zu BMP- Typ Rezeptoren als zu TGF β Typ Rezeptoren aufweist. Dies könnte einen Hinweis auf den möglichen Liganden von EmRSK1 darstellen. Vermutlich interagiert dieser Rezeptor nicht mit dem unten beschriebenen EmSmadA, da dies zur Gruppe der Smad2 - artigen zählt, während das von Ricardo Zavala- Gongora (unveröffentlichte Daten) identifizierte EmSmadC einen möglichen Downstreamfaktor zu EmRSK1 darstellen könnte.

Rezeptoren	α C - Region	B4 - Region	β 5 - Region	L 45 Loop
TGF β Typ	DE x SWFREAEI	ILGFIAA	TQLWLVSDYH	ADNKDNGTW
BMP Typ	DE x SWFRETEI	ILGFIAS	TQLWLIT H YH	SDMTSRHSS
EmRSK1	DGASWTRETQI	ILAYYAS	TQLWLVTAYH	SDMI S RGGC

Tabelle 6: Vergleich der α C- β 4- β 5 Regionen und des L 45 Loops bei Typ I Rezeptoren, die mit TGF β bzw. BMP reagieren und EmRSK1. Übereinstimmende Regionen sind hervorgehoben.

Wie bereits bei EmRTK1 erörtert, benötigt eine funktionelle Kinasedomäne verschiedene konservierte Aminosäurereste und Motive.

Auch hier lag ein GxGxxG (**GKGRFGEV**) Motiv an Position 156 - 163 vor, dessen Aufgabe die ATP/ Mg²⁺ Bindung ist (Van der Geer et al., 1994; Hanks et al., 1988), wobei das Valin für die Positionierung zuständig ist (Abbildung 13). Dem folgen auch hier ein Alanin¹⁷⁴ und ein invariantes Lys¹⁷⁶.

Die besonders hochkonservierten 14 Aminosäuren (Hanks et al., 1988) waren auch in EmRSK1 ausnahmslos vorhanden, es handelte sich hierbei um die Reste G¹⁵⁶, G¹⁵⁸, V¹⁶³, K¹⁷⁶, E¹⁸⁹, D²⁷⁸, N²⁸³, D²⁹⁶, F²⁹⁷, G²⁹⁸, E³⁴⁰, D³⁹⁸, G⁴⁰³ und R⁴¹¹(Abbildungen 13 und 15).

Ein Sequenzbereich um die katalytische Base Asp²⁷⁸ (Van der Geer et al., 1994; Hanks et al., 1988), der bei Säuger- Serin/ Threoninkinasen hoch konserviert ist und welcher zur Unterscheidung von Tyrosinkinasen herangezogen werden kann (D L K P E N) (Hanks et al., 1988), entspricht in EmRSK1 dem Konsensus der Säuger- Serin/ Threoninkinasen nur wenig: **D I K S K N** (278- 283). Es ist

also dennoch anhand des klar erkennbaren Sequenzkontextes davon auszugehen, daß D²⁷⁸ die entsprechende katalytische Base darstellt.

Weiterhin ist für EmRSK1 ein DFG- Motiv nachweisbar (Position 296 - 298), das, wie oben erwähnt, einen Mg²⁺ Chelator darstellt und von hydrophoben Resten (Alanin bzw. Leucin) begrenzt wird.

Für die katalytische Funktion scheint der Bereich Ala- Pro- Glu von Bedeutung zu sein (Hunter & Cooper, 1986), bei EmRSK1 findet sich dieses Motiv an Aminosäureposition 338- 340. Die Umgebung dieses Bereiches ist hochkonserviert, der Konsensus für Serin/ Threoninkinasen ist G T/S x x Y/F x A P E (Hanks et al., 1988), EmRSK1 zeigt mit **G T K R Y M A P E** eine völlige Übereinstimmung.

Auch eine Autophosphorylierungsstelle in Form eines Threoninrests (Shoji et al., 1983) ist als T³³² nachweisbar. Die Funktion dieser Stelle ist noch nicht völlig geklärt, es gibt allerdings Hinweise darauf, daß die Phosphorylierung zu gesteigerter katalytischer Aktivität führt (Weinmaster et al., 1984).

Als weitere interessante Struktur fand sich ein Leucin- Zipper in der intrazellulären Domäne an Aminosäureposition 381- 402 (Abbildung 13). Ein Leucin- Zipper ist eine Abfolge von, wie hier, mindestens vier Leucin Resten, die jeweils durch sechs variable Aminosäuren getrennt werden (Landschulz et al., 1988). Diese Leucinreste sind typischerweise sind an der Formation von Homo- oder Heterodimeren beteiligt, wobei sie eine Kontaktfläche für sequenzspezifische DNA Interaktion bilden (Landschulz et al., 1988). Der Nachweis eines Leucin- Zippers in einer Serin/ Threonin Rezeptorkinase ist ungewöhnlich. Ein solches Motiv wurde noch nie bei TGF- β Rezeptoren anderer Spezies beobachtet, tauchte aber außer bei EmRSK1 noch bei einer zweiten, von Ricardo Zavala- Gongora identifizierten Serin/ Threoninkinase (EmRSK2) auf (unveröffentlichte Daten).

Die Anwesenheit dieses zusätzlichen Motivs in zwei Rezeptoren könnte darauf hinweisen, daß diese auch an Signal Transduktionsmechanismen beteiligt sind, die sich von denen anderer Rezeptoren unterscheiden.

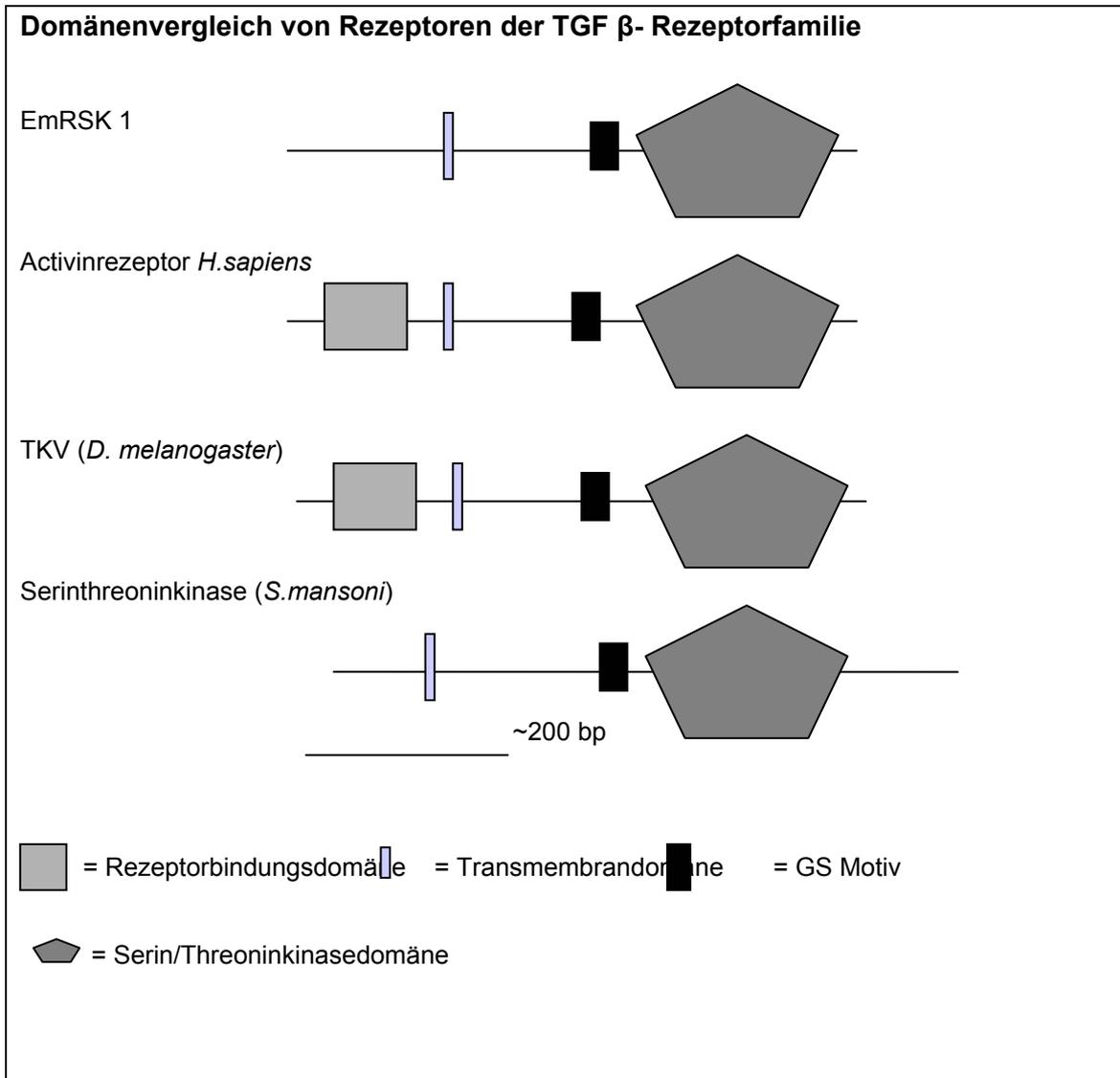


Abbildung 14: Domänenvergleich von Rezeptoren der TGF β - Rezeptorfamilie. Dargestellt sind Serin/ Threoninkinasen von *E. multilocularis*, *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *S. mansoni*

Sequenzvergleich der Kinasedomänen von Rezeptoren der TGF β Familie

3. Ergebnisse

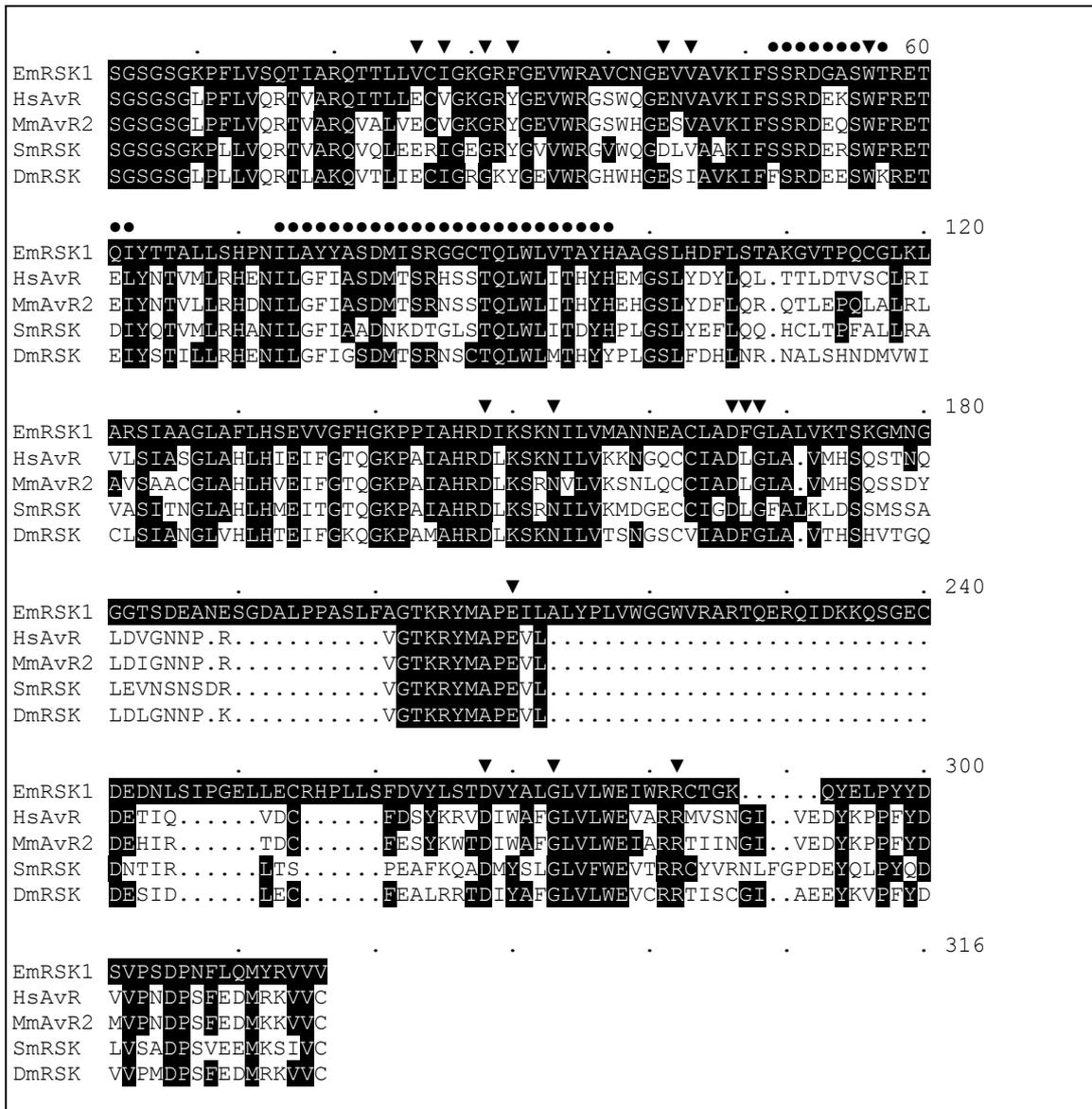


Abbildung 15: Sequenzvergleich der Kinasedomänen von EmRSK1 und anderen Rezeptoren der TGF β Rezeptorfamilie aus *S. mansoni* (AF031557), *D. melanogaster* (AY058363), *H. sapiens* (Q04771) und *M. musculus* (BC014291). Übereinstimmungen sind mit weißer Schrift auf schwarzem Untergrund markiert. Hochhomologe Aminosäurereste sind mit Pfeilen (▼) markiert. Die α C, β 4, L45 Loop und β 5-Region (in dieser Reihenfolge) sind mit Punkten (•), sowie mit Pfeilen markiert, die ihre genaue Länge angeben.

Auch der chromosomale Locus von *emrsk-1* konnte in voller Länge charakterisiert werden. Er war 2325 Basenpaare lang und beinhaltete im Gegensatz zu *emrtk-1* lediglich ein Intron von 484 Bp Länge, das die kanonischen Dinukleotide 5'-GT-AG-3' an der 5' Spleiß-Donor-Sequenz

bzw. der 3' Spleiß- Akzeptor- Stelle besaß. Die Exons maßen 1344 und 497 Bp (Tabelle 7, Abbildung 16).

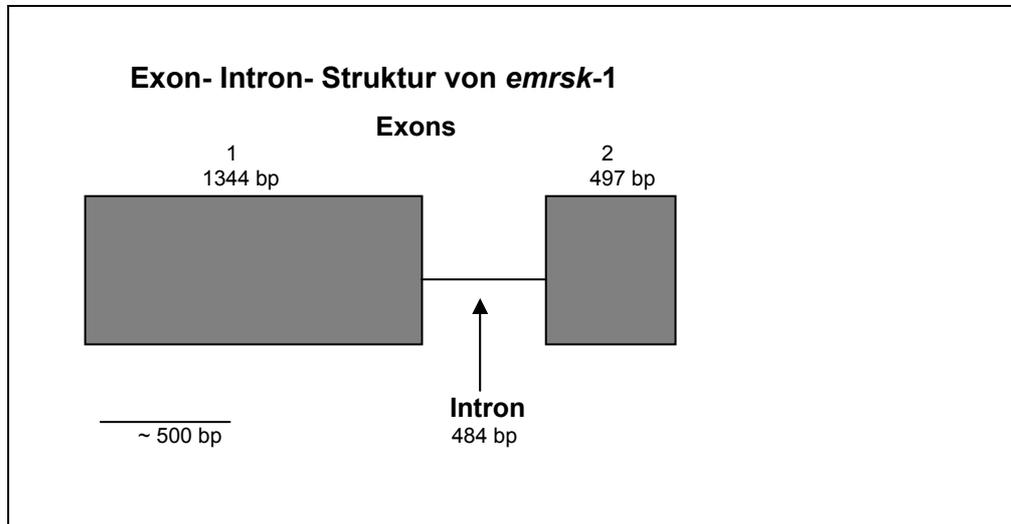


Abbildung 16: Chromosomaler Aufbau des *E. multilocularis emrsk-1* Locus. Die Exons (1-2) sind als graue Boxen dargestellt und die Größe jedes Exons (in Bp) angegeben. Das Intron ist als Linie dargestellt und mit einem schwarzen Pfeil markiert. Die Größe (in Bp) ist unterhalb der Numerierung dargestellt. Die Strukturen sind maßstabsgetreu dargestellt.

Exon Nr.	Position	Exon Größe in bp	5' Spleiß-Donor Sequenz	3' Spleiß-Akzeptor Sequenz	Intron Größe in bp	Unterbrochene Aminosäure
1	1- 1344	1344	GAG gtg gga	aca cag CTT	484	Glu* (419)
2	1829-2326	497				

Tabelle 7

3.4 Charakterisierung und Strukturmerkmale von EmSmadA:

Im Rahmen eines Sequenzierungsprojektes einer cDNA-Bibliothek für das Larvenstadium von *E. multilocularis* konnte eine unvollständige cDNA isoliert werden, welche, wie anhand von Sequenzvergleichen ermittelt wurde, für das C- terminale Ende eines Smad- Faktors kodierte (K. Brehm, persönliche Mitteilung). Das entsprechende *Echinococcus*- Gen wurde als *emsmadA* bezeichnet. Wie bereits erläutert, sind Smads direkte Substrate von TGF β Typl Rezeptoren, was die Möglichkeit eröffnete, entsprechende Signaltransduktionwege in *E. multilocularis* weiter zu verfolgen. *emsmadA*

wurde auf Ebene der cDNA und genomischen DNA vollständig sequenziert und charakterisiert. Die vollständige cDNA Sequenz wurde mit Hilfe von inverser PCR erhalten. Zu diesem Zweck wurde zunächst Einzelstrang - cDNA hergestellt und in der Annahme, daß der Faktor möglicherweise über Transsplicing prozessiert wird, dreimal über PCR amplifiziert, um eine bessere Mengenausbeute zu erhalten. Die dazu verwendeten Primer Em10-SL Bam, einem Spliced Leader Primer, und CD3, der sich gegen das 3' Ende richtete, wiesen beide eine *Bam*H1 Schnittstelle auf. Um eine vollständige Amplifikation auch der langen Transkripte zu erreichen, wurde *Pfu*- *Polymerase* (Stratagene) verwendet und PCRs mit Elongationszeiten von ca. 9 Minuten durchgeführt. Das Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*H1 verdaut, mit Hilfe des PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und schließlich mit der *T4 DNA Ligase* in großem Volumen religiert, um ringförmige DNA- Fragmente zu erhalten. Diese dienten als Templates für die inverse PCR. Als spezifische Primer, die in entgegengesetzter Richtung in 3' bzw. 5' Richtung der bekannten Sequenz binden, wurden Smad A DW 2 (Nukleotidposition 1022- 1043, Abbildung 17), und Smad A UP 3 (Nukleotidposition 983- 964, Abbildung 17), verwendet. Die Elongationszeit betrug fünf Minuten. Da das Ergebnis der ersten PCR noch kein klares Fragment ergab, wurde das Resultat mittels einer Nested- PCR mit den Primern Smad A UP 5 (Nukleotidposition 755-736, Abbildung 17), und Smad A DW 3 (Nukleotidposition 1437- 1458, Abbildung 17), weiter spezifiziert, woraus eine Bande in der erwarteten Größe von ~ 800 Basenpaaren resultierte. Dieses Fragment wurde in den Topo TA-Vektor (Invitrogen) kloniert und erwies sich als korrektes 3' und 5' Ende von *emsmadA*. Die Kartierung des 5' Endes konnte durch eine PCR mit den Primern SL-5-PR, welcher gegen das 5' Ende des Echinokokken- Spliced Leaders gerichtet ist, und Smad A UP1 (Nukleotidposition 1083- 1064, Abbildung 17) bestätigt werden, was zusätzlich zeigte, daß die *emsmadA* mRNA über Transsplicing prozessiert wird.

```
CACCGTTAATCGGTCCTTACCTTGCAGTTTGTATGGCTAGTTCGTGGGATTTCCGGTTTCGAGACC TGA AACCGTTCAGTTACAACAATA 90
*
```

3. Ergebnisse

ATGTC	CCAATATTGCTCTTCATTGTACCACATCCGACTATACATCCTCAAGTGACAGCAGCCGACTCGTGAGTCCGCCAGCGTAGCTAGC	180
M	S N I A L H C T T S D Y T S S S D S S R L V S P P S V A S	30
GGTAGTACCTTCTCAGACAGTTTGGCCCTTCTGCCTCCGAATTCGGGTGCGCTTTATGGAGACCCTTTAGTTACAGCCCTACGATCGCCAA	270	
G	S T F S D S L A L I P P N S G A L	60
CAGGTCATGCCAGTCGGGATAGTAATAATGGACGATGGAGTCACTTGGAGGGAGAATGTGAGCGTCAACAACATTGGCAGCATTATTCG	360	
Q	V M P V G D S N N G R W S H L E G E C E R Q Q H C D D Y S	90
ACCAACAACCTCAACGTCGGGAACACTCAGTCACCCAATCTAATCCCCGGTTCTCCTCATCCACAAACGTACCGTTGACACCTTCT	450	
T	N N L N V G N T Q S P N S N P P V P P H P T N V P L T P S	120
TTGAAGAATTGGTCTCTGTCTTCTACTACGAGTTGAACAACCGTGTGGTGACGTTTTTTCATGCCTCGAAACCCAAATTCACCGTGGAT	540	
L	K N W C S V F Y Y E L N N R V G D V F H A S K P K F T V D	150
GGGTTTACGGCGCGTCTTTGGGCACAGAAAGATTCAAGTTAGGCGGACTTAGTCACGTGAATCGTCCACCTCAAGTTGATATGACTCGC	630	
G	F T A P S L G T E G F S L G G L S H V N R P P Q V D M T R	180
CGCCACATTGGTTCGGCCCTCAATCTGCTTTACATATCAGGGGAGGTGTTTGTGAGTGTCTGAGCGATGGCGCCATTTTCGTCCAGTCA	720	
R	H I G R G L N L L Y I S G E V F V E C L S D A A I F V Q S	210
CCCAGCTGCAATCGTCTTAACTGGCATCCTGCCACCGTGGTCAAGGTCCCTCCGCGTTGCAATCTTCGTGTTTTCGATAACCGTGAA	810	
P	S C N R L N N W H P A T V V K V P P R C N L R V F D N R E	240
TTCCGGGAATTGCTGTCTCAGTCAGTCACCAGAACTACGAAACCGTATTCTCCCTCACCCATATGTGTTTCATTGCAATCAGCTTTGTG	900	
F	A E L L S Q S V T R N Y E T V F S L T H M C F I R I S F V	270
AAAGGATGGGGCGCGGATTACCGTCGTCAAACTATAACAGCACACCCTGTGGATTGAGCTTCACCTGACGAGCGCTCAAGTGCGCTT	990	
K	G W G A D Y R R Q T I T S T P C W I E L H L N E P L K W L	300
GACCGGGTCTTGAAGAGATGGGCTCTCCCTCGACTCCGTGCACCTCTGTGAGCTTAAAGTGAATCATTTGTCTCAGCTTCTCGCAGTG	1080	
D	R V L Q E M G S P S T P C T S V S *	318
TAGTTGCGCCTTCACGCCCTTTTCATGTTTTTCCCTTCTCTTCTTCTTCTTCTGGTTCATTCTCGCACCGGTAAATTCGCCATTTA	1170	
TTGCAATCACTCCATCGACTTCTTGAATCACCTTCTCTCCTTATTTCTCCACATCATCCATTGCGCTCCTCTTTTCGTCTAACTATCTCA	1260	
ATTGACGTTAGCAGCAGCCGAGCAACATTTTCATCACTGCTGCTATTACCGCCAATCAGTTCTGGTAACGACTTCGTTTTAATGCGCCAG	1350	
CACTACCCCTTCTCTCCTTTCGTGGTTTTATACATCCCCCTCCGCGCTTTTCTCCCGCATTACGCACGCACTTTGGACGTAATGTCTCC	1440	
CCGATCACGGCCATACGATTAGCGTCCCCTGTTGTTGTTACATGCATATATTGTGTTTGTGACTTTAAATAAATTGACTGTTTTAAGTC	1530	
AA	1575	

Abbildung 17: Vollständige cDNA und Aminosäuresequenz von EmSmadA.

Markierungen: **Spliced Leader Sequenz** (1-36), **potentielle Polyadenylierungsstelle** (1508- 1514), **In-Frame- Upstream Stopcodon** (69- 71), **Startcodon** (91- 93), **Stopcodon** (1045- 1047), **MH2-Domäne**, **L3-Loop**,

- (unterhalb der AS)= Spezifische Subtypen, • (unterhalb der AS)= "SARA" Bindungsstellen
- T S V S = C-terminales Phosphorylierungsmotiv, ↓ = Intronpositionen in chromosomaler DNA
- M = hydrophober Bereich

Wie bereits erwähnt, werden R-Smads (Rezeptorregulierte Smads) von Typ I Serin/ Threonin- Rezeptorkinasen gebunden und phosphoryliert. Die Phosphorylierung des Smad destabilisiert den Komplex, so daß das phosphorylierte R- Smad wieder freigesetzt wird und sich mit einem Co- Smad verbindet (Macias- Silva et al., 1996; Lagna et al., 1996; Zhang et al., 1997).

Dieser Komplex wird in den Kern transloziert (Liu et al., 1997), wo er über Partnerproteine an das Zielgen binden kann (Massague & Wotton, 2000).

Abbildung 17 zeigt die vollständige cDNA und Aminosäuresequenz von *emsmadA*. Die *emsmadA* mRNA weist an ihrem 5' Ende eine typische Echinokokken- Spliced Leader Sequenz (Brehm et al., 2000b) auf und besteht von dort bis zum Beginn des Poly- A- Schwanz aus 1530 Nukleotiden. Die mRNA kodiert für ein Protein von 318 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 35,3 kDa. SmSmad2 aus *S. mansoni* ist das größte bislang identifizierte Smad mit 649 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ~ 70 kDa (Osman et al., 2001). Humane Smads sind kleiner und messen zwischen 435 und 467 Aminosäureresten, bei einem Molekulargewicht von ~ 50 kDa. Damit ist EmSmadA sowohl bezogen auf Aminosäuresequenz, als auch auf das Molekulargewicht, deutlich kleiner als andere Smads, was sich durch Fehlen der MH1 Domäne (siehe unten) erklären läßt.

Das ATG Startcodon befindet sich an Position 91- 93. 24 Basenpaare stromaufwärts findet sich ein „in frame“, also im Leseraster, gelegenes TGA Stopcodon, was dafür spricht, daß das identifizierte ATG tatsächlich die korrekte Translationsinitiationsstelle darstellt, obwohl die Übereinstimmung zur „Kozak- Konsensus Sequenz“ für effektive Translationsinitiation, RccATGR, (Kozak, 1991) mit der Basenfolge ATAATGT (Übereinstimmungen unterstrichen) nur schwach ausgeprägt ist. Dies könnte bedeuten, daß möglicherweise nur schwach translatiert wird.

Das Stopcodon befindet sich in Position 1045, gefolgt von 482 nicht kodierenden Basenpaaren bis zum Poly- A- Schwanz. In Position 1508 befindet sich eine potentielle Polyadenylierungsstelle.

Das Protein beginnt mit einem hydrophoben Bereich (Abbildung 17), der nach der Methode von Schultz et al. (1998) sogar als Signalsequenz ausgewiesen wurde. EmSmadA besitzt, in Abweichung zu bereits bekannten Smads, keine MH1-, sondern lediglich eine hochkonservierte MH2 Domäne (Abbildungen 18 und 19). Innerhalb dieser Domäne befindet sich der L3- Loop, die Region, die für die Spezifität der Interaktion mit der korrespondierenden Region auf dem Typ I Rezeptor, L45, verantwortlich ist (Feng & Derynck, 1997; Lo et al., 1998). Der L3- Loop ist hochkonserviert und ist für R- Smads mit gleicher Bindungsspezifität unveränderlich. So interagieren z. B. humanes Smad2 und

Smad3 mit Rezeptoren des TGF β - oder Activin- Subtyps, während Smad1, Smad5 und Smad8 von BMP Typ I Rezeptoren aktiviert werden.

Der L3- Loop für die Smad2 Gruppe, zu der auch EmSmadA zählt, zeigt die Aminosäurereste Arginin (R²⁷⁸) und Threonin (T²⁸¹) während an dieser Stelle befindliches Histidin (H) oder Aspartat (D) zur Interaktion mit BMP -Typ Rezeptoren prädisponieren würden (Lo et al., 1998). Der Bindungspartner von EmSmad A ist also höchstwahrscheinlich ein Rezeptor der TGF β - oder Activin-Subfamilie. Dieser hohe Konservierungsgrad wird nochmals in Abbildung 19 dargestellt.

Weiterhin charakteristisch ist die Konservierung von vier von fünf subtypenspezifischen Resten, die zur Interaktion von Smad2 und Smad3 mit SARA benötigt werden (Wu et al., 2000). SARA (Smad Anchoring for Receptor Activation) ist ein Adaptor Protein, das mit Smad2 und Smad3 und Typ I Rezeptoren interagiert. Vier dieser Reste, Isoleucin (I¹⁹²), Phenylalanin (F¹⁹⁷), Tryptophan (W²¹⁹) und Asparagin (N²³²), befinden sich an entsprechender Position in EmSmadA, wohingegen an Position 217 kein Tyrosin sondern ein Asparaginrest vorhanden ist (Abbildung 19).

Ein weiterer hochkonservierter Bereich aller R- Smads ist das SSXS- Motiv, der C-terminale Phosphorylierungsbereich. Bei EmSmadA liegt mit TSVS eine geringfügige Abweichung vom Konsensus vor, welche auch für Smad2 aus *S.mansoni* beobachtet worden war (Osman et al., 2001). Die Konsequenz aus dieser Abweichung ist noch ungeklärt, allerdings konnten Studien zum C-terminalen Phosphorylierungsmotiv von Smads zeigen, daß Serinreste durch Threonin ersetzt werden können (Kretschmar et al., 1997).

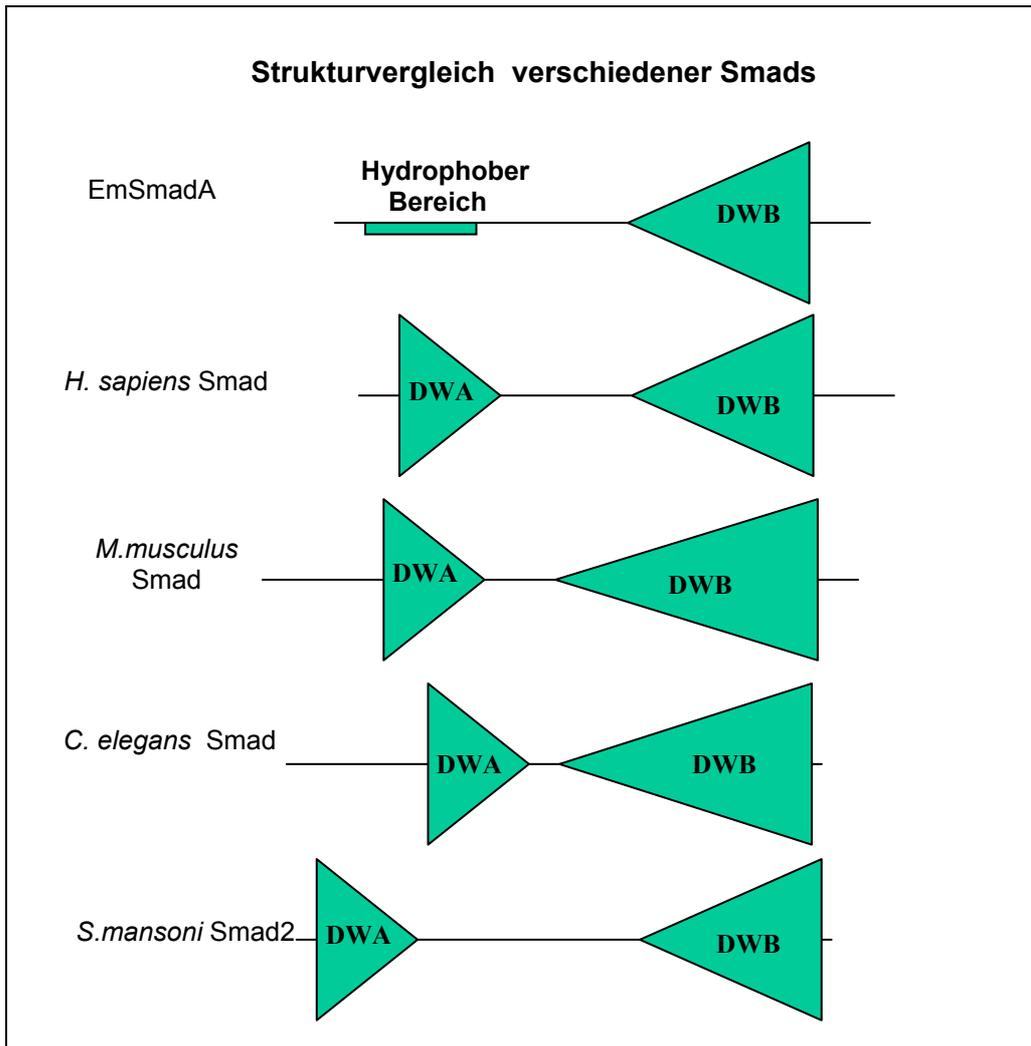


Abbildung 18: Graphischer Vergleich verschiedener Smads. DWA = Dwarf A Domäne (MH1), Dwarf B Domäne (MH2)

Sequenzvergleich verschiedener Smads

. 50

EmSmadA	M.....
SmSmad2	MS.....LFTSPPVVKRLISYIK.EGSDKEEKWKEKAVKSLVKRLK
SmSmad1	MSTPISSLNSLFSFTSPAVKRLLGWKQGDE...EEKWAEKAVDSL VKK LK
HsSmad1	M.....NVTSLFSFTSPAVKRLLGWKQGDE...EEKWAEKAVDALVKK LK
HsSmad3	MS.....SILFPTPIIVKRLLGWKKGEQNGQEEKWCEKAVKSLVKK LK
HsSmad5	MT.....SMASLFSFTSPAVKRLLGWKQGDE...EEKWAEKAVDALVKK LK

3. Ergebnisse

EmSmadASNIALHCTT.....	100
SmSmad2	NGTQLDELEERATVSDQPSTRCVTIPRSLDGRLQVAQKKGLPHVIFYCQLW	
SmSmad1	KKKGALEALEERALSNGPEPSECVTIPRSLDGRLQVSHRKGLPHVIYCRVW	
HsSmad1	KKKGAMEELEKALSCEFGQPSNVCVTIPRSLDGRLQVSHRKGLPHVIYCRVW	
HsSmad3	KTQLDELEKALTTQNVNTKCTIPRSLDGRLQVSHRKGLPHVIYCRLLW	
HsSmad5	KKKGAAMEELEKALSSPGQPSKCVTIPRSLDGRLQVSHRKGLPHVIYCRVW	
EmSmadASDYTSSSDSSRLVSP.....	150
SmSmad2	RWPDLHTQHELRPIATCEYSFQSKRDEVCINPYHYRRIENPVLPPIMVPR	
SmSmad1	RWPDLQSHHELKPLDFCRFPFSAKENEVCINPYHYQRVESPVLPVLPVPR	
HsSmad1	RWPDLQSHHELKPLDFCEFPFGSKQKEVCINPYHYKRVESPVLPVLPVPR	
HsSmad3	RWPDLHSHHELKAMELCEFAFNMKKDEVCINPYHYQRVETPVLPPVLPVPR	
HsSmad5	RWPDLQSHHELKPLDICEFPFGSKQKEVCINPYHYKRVESPVLPVLPVPR	
EmSmadA	200
SmSmad2	TVNNGTSGVTNDNNTHRGVTESSTERYGRGSSFGSHHSRYSSMHNQYQQG	
SmSmad1HSEYPLSLT.....	
HsSmad1HSEYNPOHSL.....	
HsSmad3HTEIPAE.....	
HsSmad5HNEFNPOHSL.....	
EmSmadAPSVASGSTFSDSLAL.....LPNS.....	250
SmSmad2	LQQQHHLNALQSHHPSTAGLSDSMILGDDCGSEPNSLAALLAPPKQPRQ	
SmSmad1	VTPSPGLSHCGS.....SGMSSSR.....SASNLMGFPMT.....D.	
HsSmad1	LAQFRNLGQNEPHMPLNATFPDSE.....QQPNSHFPFHSPNSSYPN.	
HsSmad3	...FPPLDDYSHSIPENTNFPAGI.....E.....PQ.	
HsSmad5	LQFRNLSHNEPHMPQATFPDSE.....HQPNNTFPFLSPNSPYF..	
EmSmadAGALYGDPLVQPY.....DRQQVMPVGDSSNCRWSH	300
SmSmad2	HLATDAVTAALARGDALDAYTVASRAIAGLENVGNVGGTHPPCVSLRE	
SmSmad1SAMPYNVNYPH	
HsSmad1SPGSSSSTYPH	
HsSmad3SNIPVGTWAA	
HsSmad5PSPASSSTYPN	
EmSmadALEGE.....	350
SmSmad2	AAENMTLGGPPNLVGTTPAPPHTGYQSSLMNVVSSLSGDGRDFARSLGVA	
SmSmad1	N.FSHSPSLP...FGNSGTSTDS.....	
HsSmad1	SPTSSDPGSPFQMPADTPPPAYL.....	
HsSmad3	QA.....GLTPPPGYL.....	
HsSmad5	SPASSGPGSPFQMPADTPPPAYM.....	
EmSmadACERQQ...HC...DDYSTNNLNLVGN	400
SmSmad2	NHIHNATTRSLSMSDYPIPVSACQEDRSNDSQCLGFNAENMSSSFMGOSS	
SmSmad1TVAGPIHSLN.SSNL	
HsSmad1PPEDPMTQDG.SQPM	
HsSmad3SEDGETSDHQMNHSM	
HsSmad5PPDDQMGQDN.SQPM	
EmSmadA	TQSENNSNPPVPPHPTNV.....LTPSL.	450
SmSmad2	SVSSSTTQKAPSIAGAGPSINSPGTLSSVEENCISEDDNMDLMDLSDVLI	
SmSmad1	QSGYQTQPN..QDPA.....S	
HsSmad1	DT.NMMAPP..LPSE.....I	
HsSmad3	DAGSPNLSPNMSPA.....H	
HsSmad5	DTSNNMIPQ..IMPS.....I	

3. Ergebnisse

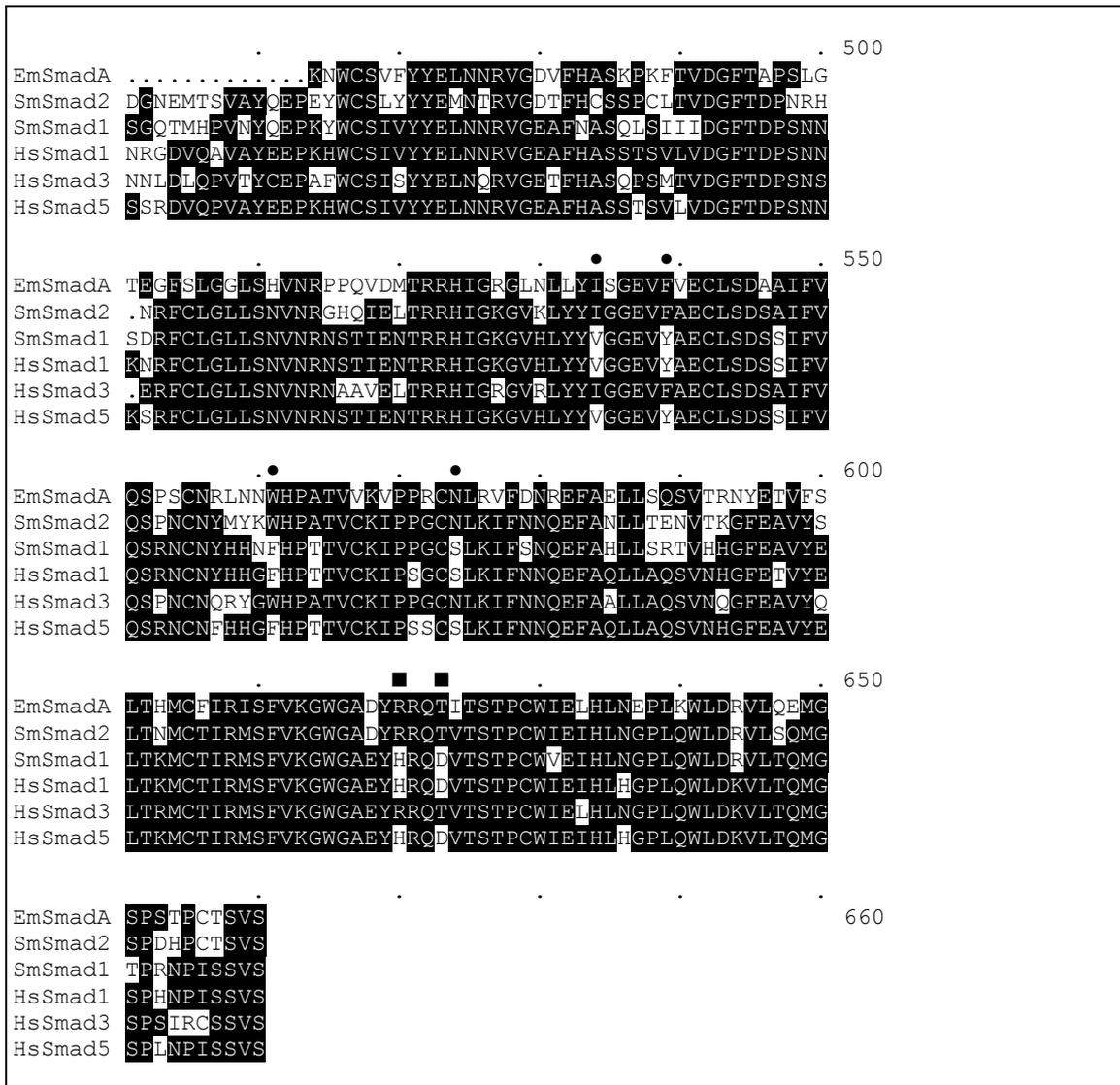


Abbildung 19: Sequenzvergleich von EmSmadA mit *S. mansoni* Smad1 (AF215933), Smad2 (AF215934), *H. sapiens* Smad1 (AF016189), Smad3 (AB004930), und Smad5 (AF010607). Übereinstimmende Aminosäurereste sind mit weißer Schrift auf schwarzem Grund gekennzeichnet.

■ = Spezifische Subtypen, ● = "SARA" Bindungsstellen

Abbildung 19 zeigt einen Aminosäuresequenzvergleich von EmSmadA mit drei humanen und zwei *S. mansoni* Smads. Der Vergleich zeigt, daß im vorderen Sequenzbereich (Aminosäurereste 1- 150) für EmSmadA keine Homologien bestehen, da es keine MH1 Domäne besitzt. Im mittleren Bereich (150- 450), der Linkerregion, sind die Homologien, bis auf das gehäufte Auftreten von Prolinresten, gering.

Ab Position 450 im gezeigten Sequenzvergleich, was Position 121 bei EmSmadA entspricht, bis zum Sequenzende bei Position 660, befindet sich die MH2 Domäne, für die deutliche Homologie aller gezeigten Proteine besteht. Die stärkste Homologie besteht zu *S. mansoni* Smad2 mit 72 % Übereinstimmung in der MH2 Domäne und einer Gesamthomologie von 20 %.

Unter Verwendung spezifischer Primern gegen die cDNA Sequenz, konnte der chromosomale Locus von *emsmad A* über PCR in Form mehrerer überlappender Fragmente amplifiziert und vollständig charakterisiert werden.

Der *emsmad A* Locus besitzt eine Gesamtlänge von 4429 Basenpaaren.

Wie in Tabelle 8 dargestellt, beinhaltet er vier Exons zwischen 301 und 609 Basenpaaren, die von drei Introns, zwischen 266 und 1461 bp, unterbrochen werden (Abbildung 20). Spleiß- Donor und Spleiß- Akzeptorsequenz aller Introns, bis auf Intron 1, besitzen die kanonische Dinukleotide GT- AG an den Spleiß- Donor und Akzeptor- Stellen.

Intron 1 enthält ein atypisches GC- Dinukleotid (Tabelle 8) an der 5' Spleißstelle, was durch wiederholte Amplifikationen des Fragments aus chromosomaler DNA verschiedener *E. multilocularis* Isolate bestätigt werden konnte.

Basierend auf der Analyse kanonischer und nicht- kanonischer Spleißstellen in Säugetiergenen wurde berichtet, daß GC Spleiß- Donor- Stellen Teil von ansonsten starken Konsensus Sequenzen sein müssen, um effektives Spleißen zu ermöglichen (Bursat et al., 2000). Im Einklang damit zeigt die Spleiß- Donor Stelle von Intron 1 die Sequenz 5'-GCAAGT- 3' die gut mit dem Spleiß- Donor- Konsensus 5'-GTRRGT-3' übereinstimmt, welche für die meisten *Echinococcus* Introns charakteristisch ist (Brehm et al., 1999b; Brehm et al., 2000a; Brehm et al., 2000b). Diese Normabweichung ist relativ selten, wurde aber bereits vereinzelt beschrieben (Barnum et al., 1989; Grassel et al., 1999; Lal et al., 1999).

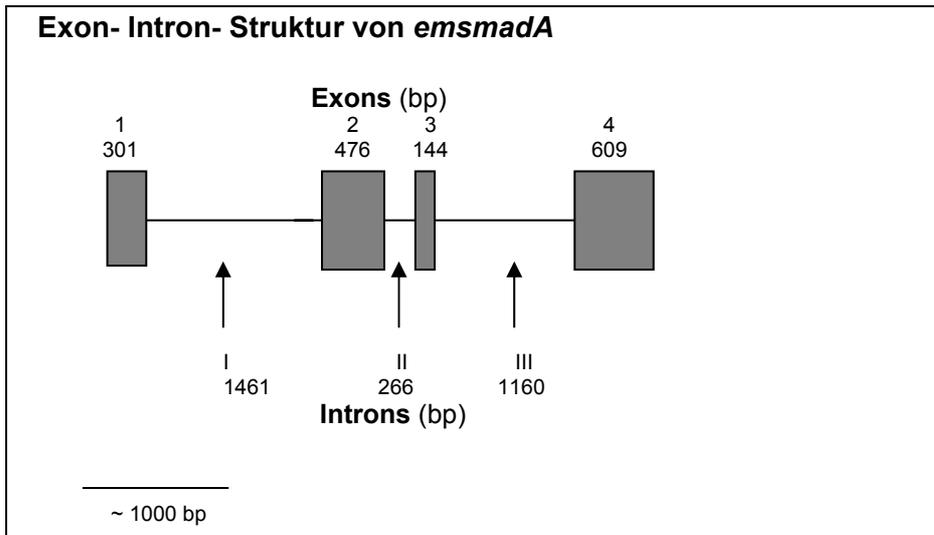


Abbildung 20: Chromosomaler Aufbau der *E. multilocularis emsmadA* Locus. Die Exons (1- 4) sind als graue Boxen dargestellt und die Größe jedes Exons (in Bp) angegeben. Die Introns (I- III) sind als Linie dargestellt und mit schwarzen Pfeilen markiert. Ihre Größe (in Bp) ist unterhalb der Numerierung dargestellt.

Exon Nr.	Position	Exon Größe in bp	5' Spleiß-Donor Sequenz	3' Spleiß-Akzeptor Sequenz	Intron Größe in bp	Unterbrochene Aminosäure
1	1-301	301	AAT G gcaagt	catcag GA CGA	1461	Gly (40)
2	1763-2239	476	CCG C gtaagc	ttttag GT TGC	266	Arg (230)
3	2506-2650	144	TAC CG gtaagt	ttgcag T CGT	1160	Arg (278)
4	3811-4420	609				

Tabelle 8

3.5 Experimente zum Nachweis der Parasiten- Spezifität der identifizierten Faktoren:

Da die ursprünglich zur Klonierung von *emr1k1*, *emrsk1* und *emsmadA* verwendete RNA aus Parasitengewebe stammte, das in Versuchstieren kultiviert wurde, war es möglich, daß die identifizierte cDNA nicht genetischem Material aus *E. multilocularis* sondern aus *Meriones* entsprach. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde Metacestoden Material ohne direkten Kontakt zu Wirtszellen in einem *in vitro* System (Jura et al., 1996) kultiviert.

Zusätzlich wurde RNA aus der Leber nicht- infizierter Labortiere isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Wie in Abbildung 21 zu sehen, konnten spezifische Fragmente für *emrsk1*, *emrsk1* und *emsmadA* in RT- PCR Experimenten mit verschiedenen Primer-Kombinationen nur bei Verwendung von RNA Präparation aus *in vitro* kultivierten Metacestoden, nicht aber für die Wirts- RNA als Template nachgewiesen werden. Das Experiment zeigte die Expression der untersuchten Fragmente in *E.multilocularis*, während sie in *M. unguiculatus* nicht nachweisbar sind. *elp*, als bekanntes Echinokokken- Gen, diente als Kontrolle für Echinokokken RNA. Als Kontrolle für die *Meriones* RNA wurden Primer gegen ein bereits beschriebenes, *Meriones* - spezifisches β - Tubulin- Gen verwendet (Brehm et al., 2000a). Dieses ergab für *Meriones* cDNA ein sehr starkes Signal und ein sehr viel schwächeres Signal für *in vitro* Echinokokken cDNA. Dies kann möglicherweise auf Kontamination der cDNA mit Wirtsmaterial zurückgeführt werden. Anhand dieser Ergebnisse konnte geschlossen werden, daß die identifizierten Gene aus *E. multilocularis* stammen. Gestützt wird dies dadurch, daß im die Sequenzvergleich gezeigte höchste Homologie von EmRTK1 zu einem EGF- Rezeptorhomologen des phylogenetisch nahe verwandten Plattwurms *S. mansoni* besteht (Abbildung 11).

Weiterhin stimmt dies mit dem Befund aus der cDNA Charakterisierung überein, bei der sowohl für *emrsk1*, als auch für *emsmadA*, die *Echinococcus*- Spliced Leader Sequenz am 5' Ende nachgewiesen werden konnte. Die Herkunft aus dem Parasiten wird dadurch bestätigt, daß die zugewiesene cDNA durch den Mechanismus des Transsplicing prozessiert wird (Abbildung 22), da dieser Mechanismus der Transkript- Prozessierung nicht bei Säugetieren verwendet wird (Blumenthal, 1993).

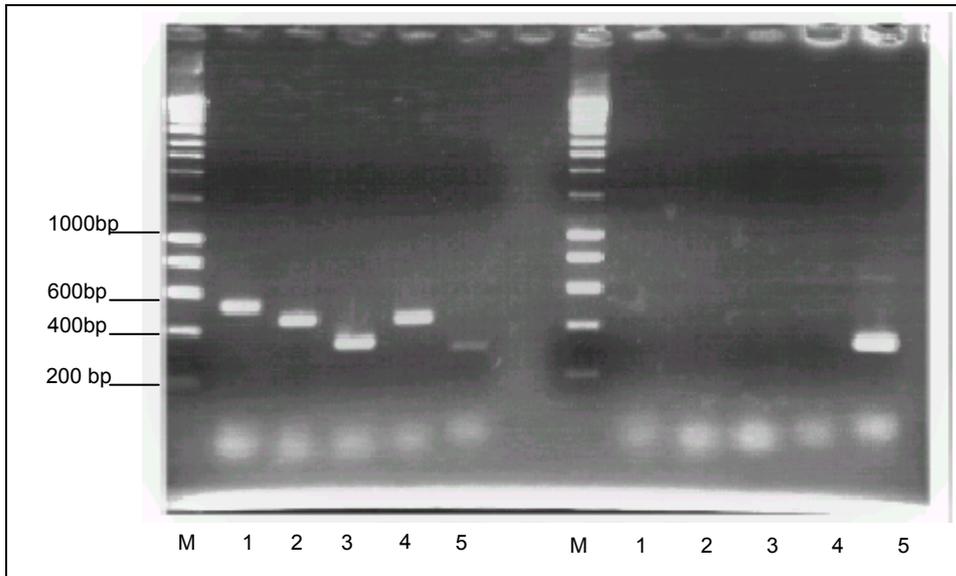


Abbildung 21: Überprüfung der Genexpression in *E. multilocularis* im Vergleich zu *M. unguiculatus*.
M:Marker-1: *elp*- 2:*emrtk1*- 3:*emrsk1*- 4:*emsmadA*- 5:*M. unguiculatus Tubulin*
links: *E. multilocularis* rechts: *M. unguiculatus*

3.6 Experimente zur Prozessierung der identifizierten Transkripte über den Mechanismus des Transsplicing:

Obwohl die vorangegangenen Experimente keine Hinweise lieferten, daß die *emrtk1*- mRNA über Transsplicing prozessiert wird, aber Spliced Leader an den 5' Enden von *emrsk1* und *emsmadA* identifiziert werden konnten, sollte der Transsplicing- Mechanismus in weiteren Experimenten näher untersucht werden. Es sollte zunächst geprüft werden, ob nicht verkürzte Transkripte von *emrtk1* vorlagen oder alternative, transgesplicing Transkripte von *emrsk1* und *emsmadA* nachgewiesen werden konnten.

Dazu wurde cDNA verwendet, die mehrmals mit einem SL-Primer (Em10- SL) und einem 3' OligodT- Primer amplifiziert worden war. Darauf wurde anschließend mit für *emrsk1*, *emrtk1* und *emsmadA* spezifischen Primern eine PCR durchgeführt. Als Kontrollen dienten die PCRs für die Faktoren *elp*, dessen mRNA nachgewiesenermaßen über den Mechanismus des Transsplicing prozessiert wird (Brehm et al., 2000b), und *tub-1*, für das dies nicht der Fall ist (Brehm et al., 2000a).

Wie in Abbildung 22 dargestellt, konnten mit diesen Experimenten spezifische Fragmente für *emrsk-1* und *emsmadA* erhalten werden, nicht jedoch für *emrtk-1*.

Die Tatsache, daß *emrtk-1* aus cDNA isoliert werden konnte, die mit dem Spliced Leader Primer amplifiziert wurde, ohne selbst über Transsplicing prozessiert zu werden, kann durch zufällige, unspezifische Bindungen des Spliced Leaders an cDNAs erklärt werden. Möglicherweise wurde durch eine gewisse Mengenanreicherung von *emrtk-1* cDNA während der Amplifikation mit SL- Primern das Template in ausreichender Menge gewonnen, um Banden der entsprechenden cDNA zu isolieren.

Eine weitere Rezeptor- Serin/ Threoninkinase (EmRSK2) und zwei weitere Smad- Homologe (EmSmadB und EmSmadC), welche von Ricardo Zavala-Gongora identifiziert worden waren (nichtveröffentlichte Daten), wurden in den Experimenten mit untersucht. Mit spezifischen Primern gegen die einzelnen Faktoren konnten spezifische Fragmente in den cDNA- Präparationen nachgewiesen werden. Dies deutet an, daß die entsprechenden Faktoren ebenfalls über den Mechanismus des Transsplicing exprimiert werden.

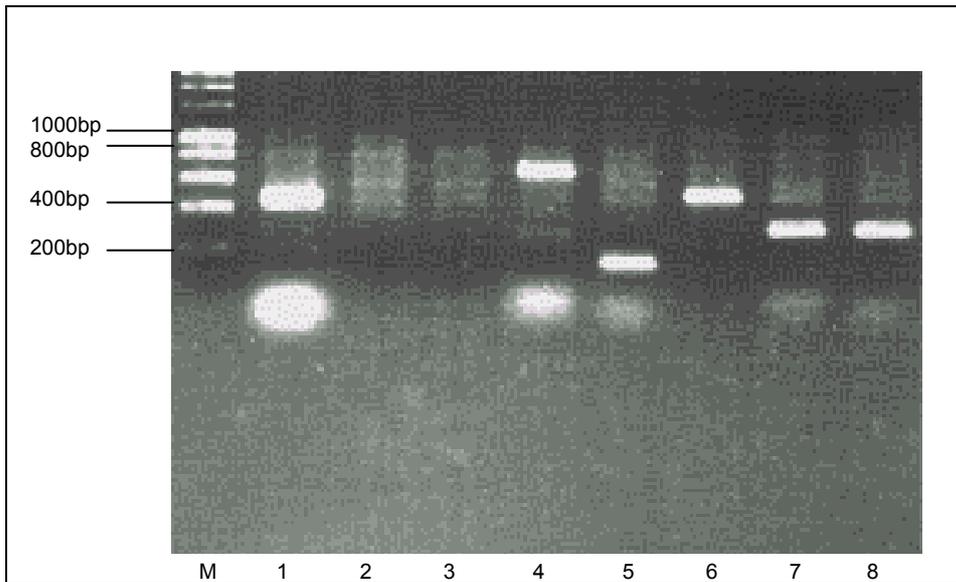


Abbildung 22: Überprüfung auf Transsplicing

M: Marker, 1: *em10*, 2: *tub-1*, 3: *emrtk1*, 4: *emrsk1*, 5: *emrsk2*, 6: *smad-A*, 7: *smad-B*, 8: *smad-C*

3.7 Vergleich der Expression in Metacestode und Protoskolex:

Um zu untersuchen, ob die identifizierten Gene nur im Metazestodenstadium oder auch in anderen Entwicklungsstadien exprimiert werden, oder ob stadienspezifische Unterschiede vorliegen, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Dazu wurde die mRNA *in vitro* kultivierter Metazestoden (ohne sichtbare Brutkapseln) und frisch isolierter Protoskolizes gewonnen und als Template für RT-PCR verwendet. Als Oligonukleotide dienten spezifische Primerpaare für die zu untersuchenden Gene. Diese Experimente ergaben, daß *emrsk1*, *emrtk1* und *smadA* in beiden Entwicklungsstadien exprimiert werden (Abbildung 23). *elp* wurde als Kontrolle der Expression in beiden Larvenstadien eingesetzt, *Meriones* Tubulin als Negativkontrolle. *elp*-Expression war in beiden cDNA Präparationen nachweisbar. In der Metacestoden cDNA war Wirts-Tubulin nicht nachweisbar, in der Protoskolex cDNA hingegen zeigte sich eine deutliche Bande. Dieses unerwartete Ergebnis läßt Kontamination mit *M. unguiculatus* DNA vermuten, da die Protoskolizes direkt aus im Wirt gewachsenen Parasitenmaterial isoliert wurde, während die Metacestoden nach

3. Ergebnisse

in vitro Kultivierung ohne direkten Kontakt zum Wirtstier reiften und daher einen deutlich geringeren Kontaminationsgrad aufwiesen.

Die Expression aller untersuchten Gene in beiden Larvenstadien weist darauf hin, daß die untersuchten Rezeptorkinasen und Downstreamfaktoren während der ablaufenden Infektion des Zwischenwirtes zumindest auf Transkriptionsebene exprimiert werden.

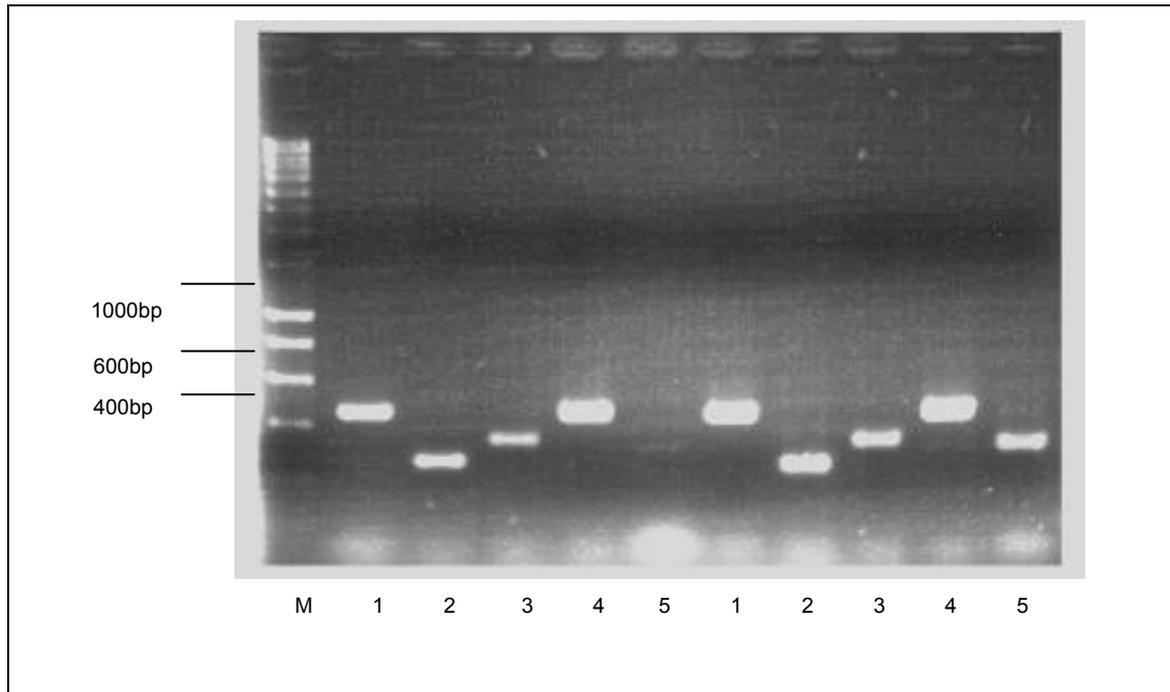


Abbildung 23 : Vergleichs -RT-PCR auf mRNA von Metacestoden und Protoskolizes

M: Marker, 1: *elp*, 2: *emrtk*, 3: *emrsk1* 4: *smad-A*, 5: *Meriones Tubulin*

Links: Metacestoden cDNA, Rechts: Protoskolizes cDNA

4. Diskussion:

Durch die besonders in den letzten zwanzig Jahren durchgeführten, intensiven Studien zur Entwicklungsbiologie der Modellorganismen *D. melanogaster* und *C. elegans* konnten umfangreiche Daten erlangt werden, die auf eine weitgehende Konservierung grundlegender Entwicklungsvorgänge in diesen Organismen im Vergleich zu Säugern hinweisen. Unter anderem konnte dabei beispielsweise gezeigt werden, daß Homologe zu den bei Säugern sehr wichtigen Wachstumsfaktoren EGF und TGF β auch bei diesen Invertebraten in hochkonservierter Form vorkommen und dort ähnliche zelluläre Mechanismen regulieren wie bei Säugern (Livneh et al., 1985).

Außer den Wachstumsfaktoren selbst konnten in Insekten und Nematoden zudem auch entsprechende Rezeptorkinasen mit Homologie zu EGF- und TGF β - Rezeptoren aus Säugern identifiziert werden.

Aufgrund dieser Befunde wurde bereits frühzeitig diskutiert, ob auch parasitische Helminthen derartige Moleküle und Rezeptoren exprimieren und ob diese an der Kommunikation zwischen Wirt und Parasit beteiligt sein können, also ob entsprechende Wachstumsfaktoren des Wirts in der Lage sind, Rezeptoren des Parasiten zu stimulieren, und umgekehrt (Gomez- Escobar et al., 1997).

In der Tat konnten bereits entsprechende Rezeptoren aus parasitischen Helminthen identifiziert werden: Für den Plathelminthen *S. mansoni* wurde jeweils ein Rezeptor aus der EGF- bzw. TGF β - Rezeptorfamilie (Shoemaker et al., 1992, Davies et al., 1997) beschrieben. Für den Nematoden *Brugia pahangi* ist ebenfalls ein TGF β - Rezeptorhomologes bekannt (Gomez- Escobar et al., 1997).

Die interessante Fragestellung war nun, ob diese Faktoren und Rezeptoren auch für *E. multilocularis* existieren und möglicherweise an der Wirt- Parasit Interaktion beteiligt sein können. Im Fall von *E. multilocularis* war dies zudem insofern noch interessant, da vorangegangene Studien gezeigt hatten, daß das Echinokokken Metacestodenstadium in Abhängigkeit von Wirtshepatozyten *in vitro* wachsen kann, wofür lösliche Faktoren mit einem Molekulargewicht von 5-

15 kDa notwendig waren. Diese Beschreibung trifft unter anderem auf Liganden der EGF- bzw. TGF β Rezeptorfamilie zu. Über eine Charakterisierung zugehöriger Rezeptoren in Echinokokken wären also Untersuchungen zu einem möglichen Einfluß Hepatozyten- definierter EGF- und TGF β - Faktoren auf die Metacestode möglich.

In der Tat konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit über diverse molekulargenetische Methoden zwei Rezeptorkinasen aus *E. multilocularis* identifiziert werden, die zur EGF- bzw. TGF β Rezeptorfamilie zählen.

Die cDNA des EGF- Rezeptorhomologen, EmRTK1, konnte charakterisiert werden und ein vollständiges Leseraster identifiziert werden. Strukturanalysen ergaben, daß sie für eine EGF Rezeptor- Tyrosinkinase codiert, welche hohe strukturelle Homologie zu anderen Rezeptor- Tyrosinkinasen aufwies.

Alle für diese Proteinfamilie typischen Domänenstrukturen konnten identifiziert werden, ebenso waren alle katalytisch wichtigen Reste an entsprechender Position nachweisbar. Demnach ist davon auszugehen, daß es sich um eine funktionell aktive Rezeptor- Tyrosinkinase der EGF Rezeptorfamilie handelt.

Als wichtiger Unterschied zu bereits bekannten Rezeptoren dieser Familie konnte für EmRTK1 keine eindeutige, exportdirigierende Signalsequenz nachgewiesen werden.

Es ist demnach fraglich, ob EmRTK1 wie die anderen Vertreter der Familie, über Golgi- Apparat vermittelten Export an die Oberfläche transportiert wird. Es konnten jedoch bereits für Rezeptoren der TGF β Familie aus anderen Plathelminthen Hinweise erhalten werden, daß Plathelminthen- Proteine, welche nachweislich an der Oberfläche exprimiert werden, ungewöhnliche Signalsequenzstrukturen aufweisen (Davies & Pearce, 1999). Dies könnte auch für EmRTK1 der Fall sein, was aber noch durch biochemische Analysen bestätigt werden müßte.

Es konnte anhand von RT- PCR Experimenten gezeigt werden, daß *emrtk-1* mRNA in zwei Larvenstadien von *E. multilocularis*, dem Metacestoden- und dem Protoskolexstadium, exprimiert wird, welche an der Infektion des Zwischenwirts beteiligt sind. Dies weist einerseits darauf hin, daß das *E. multilocularis* EGF- Rezeptorhomologe in Kontakt mit entsprechenden

Wachstumsfaktoren des Wirts kommen könnte, vorausgesetzt, er wird in einer Weise exprimiert, die eine Interaktion mit dem endokrinen System des Wirts erlaubt. Die Expression in beiden Larvenstadien läßt zudem vermuten, daß EmRTK1 an unterschiedlichen Entwicklungsprozessen beteiligt ist, welche unter Umständen auch unterschiedliche Liganden miteinbeziehen.

Kürzlich durchgeführte Studien zur Genexpression in *E. multilocularis* Metacestoden hatten interessanterweise ergeben, daß spezifisch in Gegenwart von Wirtshepatozyten ein *Echinococcus* Faktor, EmEGH, hochreguliert wird, welcher strukturell zur Familie der EGF- Proteine gehört (K. Brehm, Manuskript in Vorbereitung). Dies eröffnet die interessante Hypothese, daß Wirtshepatozyten die Entwicklung des Parasiten beeinflussen könnten, indem sie über bislang unbekannte Mechanismen zur vermehrten Bildung des EGF-homologen Faktors führen, welcher schließlich über Bindung an den in dieser Arbeit identifizierten Rezeptor auf die Echinokokken Zellen wirkt.

Da sowohl *D. melanogaster*, als auch *C. elegans* jeweils nur einen Rezeptor dieser Familie exprimiert, ist es sehr wahrscheinlich, daß der hier identifizierte Rezeptor, EmRTK1, auch der einzige EGF- Rezeptor Homologe aus Echinokokken darstellt und so als wahrscheinliches Zielmolekül für EmEGH dient.

Es wäre demnach lohnend, die mögliche Interaktion von EmRTK1 und EmEGH über biochemische und zellbiologische Methoden weiter zu untersuchen. Neben der Interaktion mit parasitenspezifischen Wachstumsfaktoren wäre zudem interessant, ob EmRTK1 auch durch wirtsdeterminierte, EGF homologe Faktoren stimuliert werden kann.

Die an dem zu EmRTK1 hoch homologen SER aus *S. mansoni* durchgeführte Untersuchungen hatten einerseits ergeben, daß dieser Rezeptor durch humanes EGF nicht stimuliert wird (Ramachandran et al., 1996).

Andererseits zeigt EmRTK1 jedoch gewisse Sequenzunterschiede zu *S. mansoni* SER, welche möglicherweise zu einer höheren Affinität zu humanem EGF führen könnten.

Zudem wurden in der damaligen Studie keine weiteren Homologe, wie z.B. TGF α , getestet, welche die eigentlichen Liganden für die entsprechenden parasitischen Rezeptoren darstellen könnten.

Derartige Studien wären beispielsweise über eine Expression von EmRTK1 in *D. melanogaster* Zellen beinhalten, verbunden mit biochemischen Analysen zur Autophosphorylierung der Rezeptoren nach Stimulation mit diversen homologen Wachstumsfaktoren aus Säugern, möglich.

Zur weiteren Analyse von EmRTK1 wäre auch wichtig zu untersuchen, ob und wo der Rezeptor in Metacestode und Protoskolex exprimiert wird. Hier wäre insbesondere interessant, ob EmRTK1 an der Oberfläche der Metacestode vorliegt und somit direkter Kontakt mit dem endokrinen System des Wirts bestehen könnte. Entsprechende Studien sind nur durch den Einsatz spezifischer Antikörper gegen EmRTK1 möglich. Die dafür notwendigen Voraussetzungen in Form von Sequenzinformationen wurden in dieser Arbeit erstellt.

Auch die cDNA eines TGF β Rezeptorhomologen aus *E. multilocularis*, EmRSK1, wurde vollständig charakterisiert. Das enthaltene Leseraster codierte für eine Rezeptor Serin/ Threoninkinase mit hoher struktureller Homologie zu anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie. Alle typischen Domänenstrukturen konnten identifiziert werden, ebenso waren alle katalytisch wichtigen Reste an entsprechender Position nachweisbar. Demnach ist davon auszugehen, daß es sich um eine funktionelle Serin/ Threoninkinase der TGF β Rezeptorfamilie handelt.

EmRSK1 unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Mitgliedern der TGF β Rezeptorfamilie durch eine Abweichung in der extrazellulären, cysteinreichen Domäne: EmRSK1 wies nur vier statt sieben Cysteinreste vor der CC- CN- Cystein- Box auf. Dies scheint kein Plathelminthen- spezifisches Merkmal von TGF β Rezeptoren zu sein, denn der homologe Rezeptor von *S. mansoni* weist, wie die Rezeptoren aus Säugern, sieben weitere Cystein- Reste auf (Davies et al., 1998). Ob sich dieser Unterschied in EmRSK1 auf eine unterschiedliche Bindungsaffinität zu TGF β ähnlichen Liganden auswirkt, müßte durch biochemische Analysen noch näher untersucht werden.

Es konnte wie auch bei EmRTK1 gezeigt werden, daß der Rezeptor in zwei Larvenstadien von *E. multilocularis*, dem Metacestoden- und dem Protoskolexstadium, exprimiert wird, also während der Infektion des Zwischenwirtes. Auch hier ist davon auszugehen, daß die Expression des Rezeptors in beiden Stadien auf multiple Funktionen bei der Entwicklung der Larvenstadien hinweist, welche wiederum durch mehrere TGF β homologe Liganden vermittelt werden könnte.

In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls kürzlich erstmals ein Mitglied der BMP-Subfamilie der TGF β homologen Wachstumsfaktoren aus *E. multilocularis* auf molekularer Ebene charakterisiert werden (Zavala- Gongora & Brehm, unveröffentlichte Daten). Die in dieser Arbeit durchgeführten Strukturanalyse von EmRSK1 hatten ergeben, daß der Rezeptor strukturell der Unterfamilie zugeordnet werden kann, welche erhöhte Affinität zu BMP-ähnlichen Liganden aufweist. Es wäre deshalb möglich, daß EmRSK1 als Rezeptor für das identifizierte BMP Homologe aus *E. multilocularis* dient, zumal beide Faktoren in Metacestode und Protoskolex coexprimiert werden. Eine entsprechende Interaktion müßte durch biochemische Analysen gezeigt werden.

Da bereits für *S. mansoni* ein TGF β Rezeptor Homologes identifiziert werden konnte, das durch humanen TGF β stimuliert werden kann (Beall & Pearce, 2001) stellt sich natürlich auch hier die interessante Frage, ob ein entsprechender Zusammenhang auch für EmRSK1 vorliegt. Hier ist zum einen anzuführen, daß das TGF β Rezeptor Homologe aus *S. mansoni* (SmRK1) strukturell zur Unterfamilie der TGF β Rezeptoren zählt, wohingegen EmRSK1, wie bereits erwähnt, strukturell der Unterfamilie der BMP Rezeptoren zuzuordnen ist. Als wahrscheinliche Kandidaten für wirtsdefinierte Stimulation für EmRSK1 wären daher eher Mitglieder der BMP- Familie, und nicht der TGF β Subfamilie anzusehen.

Bei entsprechenden biochemischen Analysen zur Stimulation von EmRSK1 durch Wirtsfaktoren wäre es demnach vermutlich sinnvoll, sich zunächst auf Faktoren wie BMP2 oder BMP4 zu konzentrieren.

In Bezug auf derartige Studien stellt sich jedoch noch eine weitere wichtige Frage: Die nach einem möglichen TGF β Typ II Rezeptor Homologen aus *E. multilocularis*. In den meisten bislang untersuchten Systemen aus Säugern und Insekten ist für eine effektive Weiterleitung von TGF β ähnlichen Signalen immer ein Rezeptorpaar, bestehend aus Typ I und Typ II Rezeptor, notwendig (Miyazono et al., 2001). Sollte dies auch für *E. multilocularis* zutreffen, müßte für Analysen zur Rezeptoraktivierung zunächst noch der zugehörige Typ II Rezeptor identifiziert werden, denn EmRSK1 ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, strukturell klar der Typ I Rezeptor Subfamilie zuzuordnen, was sich durch das Vorhandensein eines typischen GS- Motivs und stukturelle Unterschiede der Kinasedomäne ergibt.

Andererseits hatten Analysen an *C. elegans* am Typ I Rezeptor Daf-1 gezeigt, daß dieser auch ohne zugehörigen Typ II Rezeptor zur Signalweiterleitung fähig befähigt ist (Gunther et al., 2000). Weiterhin hatten diverse Studien zum Vorhandensein von TGF β Typ II Rezeptor in parasitischen Helminthen bislang keinen Hinweis ergeben, daß diese in diesen Organismen vorliegen (Gomez-Escobar et al., 1997; McGonigle et al., 2002). Degenerative PCR Studien zur Identifizierung eines Typ II Rezeptors aus *E. multilocularis* waren ebenfalls erfolglos, obwohl durch entsprechende Studien Typ I Rezeptoren relativ problemlos identifiziert werden konnten (K. Brehm, persönliche Mitteilung, diese Arbeit). Es ist demnach durchaus möglich, daß in parasitische Helminthen die TGF β Signaltransduktion ausschließlich über Typ I Rezeptoren erfolgt.

In diesem Zusammenhang könnte die identifizierte Leucin- Zipper Struktur von EmRSK1 von großem Interesse sein. Leucin- Zipper dienen bekanntermaßen zur Dimerisierung von Proteinen, die entsprechende Struktur von EmRSK1 könnte also möglicherweise eine entsprechende Funktion bei der Signalweiterleitung über EmRSK1 ausüben. Es wäre beispielsweise vorstellbar, daß eine Assoziation der intrazellulären Domänen von Typ I und Typ II Rezeptoren wie sie in Säugern vorliegt, im Fall von EmRSK1 durch Leucin-Zipper vermittelte Homo- Dimerisierung ihre Entsprechung findet. Es ist hier weiterhin interessant zu erwähnen, daß kürzlich ein zweiter TGF β homologer Typ I Rezeptor (EmRSK2) aus *E. multilocularis* identifiziert werden konnte, der

ebenfalls über ein Leucin- Zipper Motiv verfügt (Zavala- Gongora & Brehm, unpublizierte Daten).

So könnte auch eine Heterodimerbildung zwischen EmRSK1 und EmRSK2 von funktioneller Bedeutung für die Signaltransduktion in *E. multilocularis* sein. Entsprechende Studien sollten nicht nur aus infektiologischer, sondern auch aus zellbiologischer Sicht von großem Interesse sein.

Zur zellbiologischen Analyse von TGF β Signaltransduktionsmechanismen bei Echinokokken dürfte auch eine Analyse von entsprechenden Downstream Mechanismen sehr wichtig sein. Ein entsprechender Faktor konnte in Form von EmSmadA im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert werden. Zusammen mit der ebenfalls kürzlich erfolgten Charakterisierung zweier weiterer Smad homologer Faktoren (EmSmadB und EmSmadC) aus *E. multilocularis* (Zavala- Gongora & Brehm, unpublizierte Daten), zeigt das Vorhandensein von EmSmadA in der Metacestode an, daß auch die TGF β Downstream Signaltransduktionsmechanismen zwischen *E. multilocularis* und anderen Metazoen hochkonserviert sind.

Die Strukturanalyse von EmSmadA hatte gezeigt, daß eine MH2 Domäne, welche für eine Interaktion dieser Faktoren mit Typ I TGF β Rezeptoren wichtig ist, in hochkonservierter Form auch für den Echinokokken Faktor vorliegt. Protein- Protein Interaktionsstudien an entsprechenden Faktoren aus Säugern hatten vorher gezeigt, daß für die Interaktion zwischen der intrazellulären Domäne von TGF β Typ I Rezeptoren und zugehörigen Smads sowohl der L45 Loop der Rezeptoren, wie auch die L3 Loop Struktur des Smad Faktors von entscheidender Bedeutung sind. Die Analyse der L3 Loop Struktur von EmSmadA hatte ergeben, daß dieser Faktor strukturell der Gruppe zuzurechnen ist, welche eine hohe Affinität zu Typ I TGF β Rezeptoren aufweist, die der TGF β Rezeptor- Subfamilie angehören. Es ist demnach fraglich, ob EmSmadA als direkter Downstreamfaktor des hier charakterisierten EmRSK1 dient, da dieser, wie bereits erwähnt, zur Subfamilie der BMP- Rezeptoren gehört. Ein möglicher zugehöriger Rezeptor für EmSmadA könnte jedoch EmRSK2 sein, welcher eindeutige Strukturmerkmale für Mitglieder der TGF β Rezeptor Subfamilie aufweist (Zavala- Gongora & Brehm,

unveröffentlichte Daten). Da der weitere charakterisierte *Echinococcus* Faktor, EmSmad B, wie EmSmadA strukturelle Merkmale der Smadfaktoren aufweist, die mit TGF β Rezeptoren interagieren, EmSmadC hingegen solche für eine Interaktion mit BMP Rezeptoren, könnte die Situation in *E. multilocularis* also dahingehend aussehen, daß (i) EmRSK1 durch einen BMP ähnlichen Faktor stimuliert wird und entsprechende Signale über EmSmadC weiterleitet, während (ii) EmRSK2 über TGF β ähnliche Wachstumsfaktoren stimuliert wird und Signale unter Einbeziehung von EmSmadA und EmSmadB weiterleitet.

Unter Verwendung der in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzinformationen sollten entsprechende zellbiologische und biochemische Untersuchungen über Yeast Two Hybrid Experimente und Coimmunopräzipitation künftig möglich sein.

Als signifikanter Unterschied des in dieser Arbeit charakterisierten EmSmadA zu allen anderen bislang bekannten Smad Faktoren ist das Fehlen einer konservierten MH1 Domäne anzuführen. EmSmadA teilt dieses ungewöhnliche Merkmal mit EmSmadB, wohingegen eine MH1 Domäne in EmSmadC klar vorhanden ist (Zavala- Gongora & Brehm, unpublizierte Daten). Die MH1 Domäne ist in den bislang untersuchten Faktoren einerseits beteiligt an einer direkten Interaktion des Smad Faktors mit DNA- Zielstrukturen. Zudem konnte bereits gezeigt werden, daß die MH1 Domäne mit der MH2 Domäne direkt interagiert und somit über intramolekulare Maskierung zur Inaktivierung eines Smad Faktors beitragen kann (Liu et al., 1996). Durch Phosphorylierung des Smad Faktors über Typ I TGF β Rezeptoren kann diese Maskierung aufgehoben werden, was zur Aktivierung des Smad Faktors führt (Kretschmar & Massague, 1998). Im Fall von EmSmadA (und auch EmSmadB) könnte das Fehlen der MH1 Domäne zur Konsequenz haben, daß die entsprechenden Faktoren konstitutiv aktiv sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es in dieser Arbeit erstmals gelang, EGF- bzw. TGF β Rezeptor Homologe aus einem Cestoden auf molekularer Ebene vollständig zu charakterisieren.

Damit ist die Voraussetzung für Studien zur Wirt- Parasit Interaktion über entsprechende Signalmoleküle auf molekularer und biochemischer Ebene geschaffen. Weiterhin bietet dies die Möglichkeit, besonders die interessanten TGF β - Signaltransduktionsmechanismen am Beispiel von *E. multilocularis* bei Plathelminthen näher zu beleuchten. Weitere Studien zur möglichen Identifizierung der zugehörigen Signalmoleküle könnten nicht nur zum näheren Verständnis der Wirt- Parasit- Interaktion während der alveolären Echinokokkose beitragen, sondern auch als Basis für Entwicklung von Chemotherapeutika zur Behandlung der alveolären Echinokokkose genutzt werden.

5. Zusammenfassung:

Zellbiologische Untersuchungen an Modellorganismen wie *D. melanogaster* und *C. elegans* hatten gezeigt, daß Wachstumsfaktoren der EGF und TGF β Familie nicht nur an Entwicklungsprozessen bei Säugern, sondern auch bei anderen Metazoen entscheidend beteiligt sind. Aufgrund dieser Homologien wurde bereits vermutet, daß entsprechende Wachstumsfaktoren auch an der Interaktion von Säugewirt und parasitären Helminthen beteiligt sein könnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals entsprechende Rezeptoren und ein zugehöriger, intrazellulärer Signaltransduktionsfaktor des Fuchsbandwurms, *Echinococcus multilocularis*, identifiziert und auf molekularer Ebene charakterisiert. Unter Verwendung eines degenerativen PCR Ansatzes wurden zunächst cDNAs identifiziert, welche für ein EGF Rezeptor Homologes, EmRTK1, und ein TGF β Rezeptor Homologes, EmRSK1, aus *E. multilocularis*, codierten. Die vollständige Sequenzinformation der entsprechenden cDNAs konnte anschließend über 5' und 3' RACE Experimente erhalten werden.

Strukturanalysen an EmRTK1 (1564 Aminosäuren, 174 kDa) zeigten, daß es sich hierbei klar um ein Mitglied der EGF Rezeptorfamilie handelt. Sowohl in der Domänenstruktur, wie auch auf Aminosäure- Sequenzebene konnten dabei hohe Homologien zu bereits bekannten EGF Rezeptor Homologen aus Säugern, Insekten und dem Trematoden *Schistosoma mansoni* nachgewiesen

werden. Das zugehörige Gen *emrtk-1* wurde vollständig charakterisiert, seine Expression in den Larvenstadien Metacestode und Protoskolex konnte über RT-PCR Experimente nachgewiesen werden.

EmRSK1 (543 Aminosäuren, 60 kDa) konnte anhand struktureller Analysen eindeutig der Typ I TGF β Rezeptorfamilie zugeordnet werden. Höchste Sequenz Homologien konnten zwischen EmRSK1 und dem Activin Rezeptor des Menschen detektiert werden. Wie im Fall von EmRTK1 konnte das zugehörige Gen, *emrsk-1*, vollständig charakterisiert und eine Expression in Metacestoden und Protoskolizes nachgewiesen werden.

Ausgehend von einer bekannten cDNA Teilsequenz konnte zudem ein *Echinococcus* Homologes zu Smad Faktoren, EmSmadA, beschrieben werden, welche in Säugern und Insekten an der Weiterleitung von TGF β ähnlichen Signalen beteiligt sind. Obwohl eine für diese Molekülfamilie charakteristische C- terminale MH2 Domäne nachgewiesen werden konnte, fehlt dem Echinokokken Protein eine konservierte MH1 Domäne. Zusammen mit einem für EmRSK1 nachgewiesenen, ungewöhnlichen Leucin- Zipper Motiv könnte dieser Befund auf signifikante Unterschiede zwischen der TGF β Signaltransduktion von Echinokokken und bereits bekannten Organismen hindeuten.

Zusammenfassend könnten in der vorliegenden Arbeit erstmals umfangreiche Sequenzdaten zu EGF und TGF β Signaltransduktions- Systemen aus *E. multilocularis* gewonnen werden. Diese stellen eine solide Grundlage dar, um entsprechende Entwicklungsmechanismen in *E. multilocularis* und eine mögliche Wirt- Parasit- Kommunikation über EGF und TGF β ähnliche Faktoren auf molekularer und biochemischer Ebene weiter zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis:

1. **Ammann R., Tschudi K., von Ziegler M., Meister F., Cotting J., Eckert J., Witassek F., Freiburghaus A.** (1988): The long-term course of 60 Patients with alveolar *echinococcosis* in continuous therapy with mebendazole (1976-1985). *Klin. Wochensch.* 66:1060-1073
2. **Ammann R.W., Ilitsch N., Marcinek B., Freiburghaus A.U.** (1994): Effect of chemotherapy on the larval mass and the long-term course of alveolar echinococcosis. Swiss Echinococcosis Study Group. *Hepatology* 19: 735 -742
3. **Ammann, R.W., Eckert, J.** (1995) Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans. In: Thompson RCA, Lymbery AJ (eds) *Echinococcus* and hydatid disease. *CAB International, Oxon*, 411- 451
4. **Ammann R.W., Fleiner Hoffmann A., Eckert J.** (1999): Schweizerische Echinokokkose- Studiengruppe. Schweizerische Studie für Chemotherapie der alveolären Echinokokkose- Rückblick auf ein 20jähriges klinisches Forschungsprojekt. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 129: 323- 332
5. **Baker J., Harland R.M.** (1996): A novel mesoderm inducer, mMadr-2, functions in the Activin signal transduction pathway. *Genes Dev.* 10: 1880- 1889
6. **Barnum SR., Amiguet P., Amiguet-Barras F., Fey G., Tack BF.** (1989): Complete Intron/ Exon organization of DNA encoding the alpha chain of human C3. *J. Biol. Chem.* 264: 8471- 8474
7. **Bassam B., Caetano- Anolles G., Gresshoff P.** (1991): Fast and Sensitive Silver Staining of Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 196: 80- 83

8. **Beall M., McGonigle S., Pearce E.** (2000): Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF- β signalling. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111: 131- 142
9. **Beall M., Pearce E.** (2001): Human transforming growth factor-beta activates a receptor serine / Threoninkinase from the intravascular parasite *Schisosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 276: 31613- 31619
10. **Blumenthal T.** (1993): Mammalian cells can trans-splice. But do they? Review. *Bioessays* 15:347- 348
11. **Boyd F.T., Cheifetz S., Andres J., Laiho M., Massague J.** (1990): Transforming growth factor-beta receptors and binding proteoglycans. Review. *J. Cell Sci. Suppl.* 13:131-138
12. **Brehm K., Kern P., Hubert K., Frosch M.** (1999): Echinococcosis from every angle. *Parasitol. Today* 15: 351-352 [Brehm et al.,1999 a]
13. **Brehm K., Jensen K., Frosch P., Frosch M.** (1999): Characterization of the genomic locus expressing the ERM-like protein of *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100:147-52 [Brehm et al.,1999b]
14. **Brehm K., Kronthaler K., Jura H., Frosch M.** (2000) Cloning and characterization of β -tubulin genes from *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 107: 297-302 [Brehm et al., 2000a]
15. **Brehm K., Jensen K., Frosch M.** (2000): mRNA Trans- splicing in the Human Parasitic Cestode *Echinococcus multilocularis*. *J. Biol. Chem.* 275: 38311- 38318 [Brehm et al., 2000b]
16. **Brenner S.** (1987): Phosphotransferase sequence homology. *Nature* 329: 21

17. **Bresson- Hadni S., Liance M., Houin R., Bresson J.L., Lenys D., Miguet JP., Vuitton D.** (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: 61-6
18. **Brummel T.J., Twombly V., Marques G., Wrana J.L., Newfeld S.J., Attisano L., Massague J., O'Connor M.B., Gelbart W.M** (1994): Characterization and relationship of dpp receptors encoded by *saxophone* and *thick veins* genes in *Drosophila*. *Cell* 78: 251- 261
19. **Bryant D., Parsons J.T.** (1983): Site-directed point mutation in the src gene of rous sarcoma virus results in an inactive src gene product. *J.Virol.* 45: 1211- 1216
20. **Bub E., Stolze T., Strohmeyer G.** (1975): Pathogenese, Diagnose und klinisches Bild der hepatischen Echinokokkose. *Internist (Berl.)* 16: 428-435
21. **Burset M., Seledtsov I.A., Solovyev V.V.** (2000): Analysis of canonical and non- canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucl. Acids Res.* 28: 4364- 4375
22. **Casci T., Freeman M.** (1999): Control of EGF receptor signaling: lessons from fruitflies. Review. *Cancer Metastasis Rev.* 18:181-201
23. **Childs S.R., Wrana J.L., Arora K., Attisano L., O'Connor M.B., Massague J.** (1993): Identification of a *Drosophila* activin receptor. *Proc. Natl. Acad. Science USA* 90: 9475- 9479
24. **Choji, K., Fujita, N., Chen, M., Spiers, A.S., Morita, Y., Shinohara, M., Nojima, T., Irie, G.** (1992): Alveolar hydatid disease of the liver:

computed tomography and transabdominal ultrasound with histopathological correlation. *Clin. Radiol.* 46: 97-103

25. **David M., Wong L., Flavell R., Thompson S.A., Wells A., Lerner A.C., Johnson G.R.** (1996): STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J. Biol. Chem.* 271: 9185- 9188
26. **Davies S., Pearce E.** (1995): Surface-associated serine- threonine kinase in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70: 33- 44
27. **Davies S., Shoemaker C., Pearce E.** (1998): A divergent member of the Transforming Growth Factor β Receptor Family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. *J. Biol. Chem.* 273: 11234- 11240
28. **Davies S., Pearce E.** (1999): Atypical post- translational modification and targeting of a *Schistosoma mansoni* surface receptor, a member of the transforming growth factor β receptor family of cell surface receptors. *Mol. Biochem. Parasitol.* 104: 299- 310
29. **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.* 30:1089- 1097
30. **Elenius K., Paul S., Allison G., Sun J., Klagsbrun M.** (1997): Activation of HER4 by heparin- binding EGF- like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *EMBO J.* 16: 1268- 1278
31. **Estevez M., Attisano L., Wrana J.L., Albert P.S., Massague J., Riddle D.L.** (1993): The *daf-4* gene encodes a bone morphogenetic

protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development. *Nature* 365: 644- 649

32. **Ewald D., Eckert J., Gottstein B., Straub M., Nigg H.** (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.* 11:1057-1061
33. **Fausto N., Laird A.D., Webber E.M.** (1995) : Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration *FASEB J.* 9: 1527- 1536
34. **Feng X.H., Derynck R.** (1997): A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J.* 16: 3912- 3923
35. **Frohman MA., Dush M.K., Martin G.R.** (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002
36. **Frosch P.M., Frosch M., Pfister T., Schaad V., Bitter- Suermann D.** (1991): Cloning and characterisation of an immunodominant major surface antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48:121- 130
37. **Frosch P.M., Geier C., Kaup F.J., Muller A., Frosch M.** (1993): Molecular cloning of an echinococcal microtrichal antigen immunoreactive in *Echinococcus multilocularis* disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58: 301- 310

38. **Gomez- Escobar, N., van den Biggelaar, A., Maizels, R.** (1997): A member of the TGF- β receptor gene family in the parasitic nematode *Brugia pahangi*. *Gene* 199: 101- 109
39. **Gottstein B.** (1985): Purification and characterization of a specific antigen from *Echinococcus multilocularis*. *Parasite Immunol.* 7: 201- 212
40. **Gottstein B., Deplazes P., Aubert M.** (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: 291- 297
41. **Gottstein B.** (2000): Epidemiology and systematics of cystic and alveolar hydatid Disease. Review. *Chirurg.* 71: 1- 8
42. **Gottstein B., Saucy F., Deplazes P., Reichen J., Demierre G., Busato A., Zuercher C., Pugin P.** (2001): Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans? *Emerg. Infect. Dis.* 7: 408- 412
43. **Graff J.M., Thies R.S., Song J.J., Celeste A.J., Melton D.A.** (1994): Studies of a *Xenopus* receptor suggest that ventral mesoderm- inducing signals override dorsal signals *in vivo*. *Cell* 79: 169- 179
44. **Grassel S., Sicot FX., Gotta S., Chu ML.** (1999) : Complete Exon- Intron organization and promotor characterization. *Eur. J. Biochem.* 263: 471- 477
45. **Greenfield C., Hiles I., Waterfield M.D., Federwisch M., Wollmer A., Blundell T.L., McDonald N.** (1989): Epidermal growth factor induces a conformational change in the external domain of its receptor. *EMBO J.* 8: 4115- 4123

46. **Greenwald I.** (1990): Genetic and molecular analysis of EGF-related genes in *Caenorhabditis elegans*. Review. *Mol. Reprod. Dev.* 27: 73- 79
47. **Gunther C.V., Georgi L.L., Riddle D.L.** (2000): A *Caenorhabditis elegans* type I TGF beta receptor can function in the absence of type II kinase to promote larval development. *Development* 127: 3337- 3347
48. **Hackel P., Zwick E., Prenzel N., Ullrich A.** (1999): Epidermal growth factor receptors: Critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 184-189
49. **Haertel, M., Fretz, Ch., Fuchs, W.** (1980): Zur computertomographischen Diagnostik der Echinokokkose. *ROFO Fortschr. Geb. Röntgenstr. Nuklearmed.* 133: 164-170
50. **Hanahan D.** (1983): Studies on transformation of *Escherischia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 : 557- 580
51. **Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T.** (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42- 52
52. **Von Heijne G.** (1986): A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14:4683- 4690
53. **Hemphil A., Gottstein B.** (1995): Immunology and morphology studies on the proliferation of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitol. Res.* 81: 605- 614
54. **Higgins DG., Sharp PM.** (1989): Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Bioscience* 5: 151-153

55. **Hogan B.L.** (1994): Developmental signalling. Sorting out the signals. Review. *Curr. Biol.* 4:1122- 1124
56. **Huang S.H., Hu Y.Y., Holcenberg J.** (1990): A simple method for direct cloning cDNA sequence that flanks a region of known sequence from total RNA by applying the inverse polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18: 1922
57. **Hubbard S.R., Till J.H.** (2000): Protein tyrosin kinases structure and function. Review. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 373- 398
58. **Hubert K.** (2000): Untersuchung zur Rolle des immundominanten Proteins Elp (ERM- Like Protein) im Zytoskelett des Plathelminthen *Echinococcus multilocularis*. *Dissertation Universität Würzburg, Biologische Fakultät*
59. **Hunter T., Cooper A.J.** (1986) in: The Enzymes. P.D. Boyer and E.G. Krebs, Eds. (*Academic Press, Orlando, FL, 1986*) 17: 191- 246
60. **Ito A., Osawa Y., Nakao M., Horii T., Okamoto M., Itoh M., Yamashita T.** (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.* 69:369-371
61. **Jura H., Bader A., Hartmann M., Maschek H., Frosch M.** (1996): Hepatic tissue culture model for study of host-parasite interactions in alveolar echinococcosis. *Infect. Immun.* 64: 3484- 3490
62. **Jura H., Bader A., Frosch M.:** (1998) In vitro activities of benzimidazoles against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 141-146

63. **Karin M., Liu Z., Zandi E.** (1997): AP-1 function and regulation. Review. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 240- 246
64. **Kern P., Wechsler J., Lauchart W., Kunz R.** (1994): Klinik und Therapie der alveolären Echinokokkose. *Deutsches Ärzteblatt* 91: A-2494-2501
65. **Kingsley D.** (1994): The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 8: 133- 146
66. **Klambt C.** (2000): EGF receptor signalling: the importance of presentation. *Review. Curr. Biol.* 18: 388-391
67. **Kozak M.** (1991): An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.*, 115: 887-903
68. **Kretschmar M., Liu F., Hata A., Doody J., Massague J.** (1997): The TGF β family mediator Smad 1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 11: 984- 995
69. **Kretschmar M., Massague J.** (1998): SMADS: mediators and regulators of TGF β Signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 103-111
70. **Lagna G., Hata A., Gemmati- Brivanlou A., Massague J.** (1996): Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383: 832- 836
71. **Landschulz W., Johnson P., McKnight S.** (1988): The Leucine Zipper: A hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins. *Science* 240: 1759- 1764

72. **Lal S., Choi JH., Shaw JR, Hannah LC.** (1999): A splice site mutant of maize activates cryptic splice sites, elicits Intron inclusion and exon exclusion, and permits branch point elucidation. *Plant Physiol.* 121: 411-418
73. **Lemmon M.A., Bu Z., Ladbury J.E., Zhou M., Pinchasi D., Lax I., Engelman D.M., Schlessinger J.** (1997): Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J.* 16: 281-294
74. **Liebmann C.** (2001): Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. Review. *Cell Signal* 13: 777- 785
75. **Lin H.Y., Lodish H.F.** (1993): Receptors for the TGF- β superfamily. *Tr. Cell Biol.* 3: 14-19
76. **Liu F., Hata A., Baker J., Doody J., Carcamo J., Harland R., Massague J.** (1996): A human Mad protein acting as a BMP regulated transcriptional activator. *Nature* 381: 620- 623
77. **Liu F., Pouponnot C., Massague J.** (1997): Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF beta- inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.* 11: 3157- 3167
78. **Livneh E., Glazer L., Segal D., Schlessinger J., Shilo B.** (1985): The *Drosophila* EGF receptor gene homolog: conservation of both hormone binding and kinase domains. *Cell* 40: 599- 607
79. **Lo R.S., Chen Y.G., Shi Y., Pavletich N.P., Massague J.** (1998): The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *EMBO J.* 17: 996- 1005

80. **Macias-Silva M., Abdollah S., Hoodless P.A., Pirone R., Attisano L., Wrana J.L.** (1996): MADR2 is a substrate of the TGF- β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87: 1215- 1224
81. **Massague J., Attisano L., Wrana J.L.** (1994): The TGF- β family and its composite receptors. *Tr. Cell Biol.* 4: 172- 178
82. **Massague J., Hata A., Liu F.** (1997): TGF- β signalling through the Smad pathway. *Tr. Cell Biol.* 7: 187-192
83. **Massague J., Wotton D.** (2000): Transcriptional control by the TGF- β / Smad signaling system. Review. *EMBO J.* 19: 1745- 1754
84. **McGonigle S., Beall M., Pearce E.** (2002): Eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit associates with TGF beta receptors and 14-3-3 epsilon and acts as a modulator of the TGF beta response. *Biochemistry* 41: 579-587
85. **Miguet J.P., Bresson- Hadni S.** (1989): Alveolar echinococcosis of the liver. *J. Hepatol.* 8: 373- 379
86. **Miyazono K., ten Dijke P., Ichijo H., Heldin C.H.** (1994): Receptors for Transforming growth factors β . *EMBO J.* 55: 181- 220
87. **Miyazono K., Kusanagi K., Inoue H.** (2001): Divergence and convergence of TGF- β / BMP signaling. *J. Cell Physiol.* 187: 265 – 276
88. **Nakao A., Afrakhte M., Moren A., Nakayama T., Christian J.L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N.E., Heldin C.H., ten Dijke**

- P. (1997): Identification of Smad 7, a TGF β - inducible antagonist of TGF β signaling. *Nature* 389: 631- 636
89. **Osman A., Niles E.G., LoVerde P.T.** (2001): Identification and Characterization of a Smad2 Homologue from *Schistosoma mansoni*, a Transforming Growth Factor- β Signal Transducer. *J. Biol. Chem.* 276: 10072- 10082
90. **Ramachandran H., Skelly P., Shoemaker C.** (1996): The *Schistosoma mansoni* epidermal growth factor receptor homologue, SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 1-10
91. **Rausch, R.L.:** *Taeniidae*. (1975) In: W.T. Hubbert, W.F. Mc Culloch, and P.F. Schurrenberger (eds), Diseases transmitted from Animals to Man. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 678-707
92. **Rausch R.L., D'Allessandro A., Ohbayashi M.** (1984) : The taxonomic status of *Echinococcus cruzi* Brumpt and Joyeux, 1924 (Cestoda: Taeniidae) from an agouti (Rodentia: Dasyproctidae) in Brazil. *J. Parasitol.* 70: 295- 302
93. **Rausch, R.L.** (1995) in *Echinococcus* and Hydatid Disease (Thompson, R.C.A., and Lymbery, A.J., eds) pp. 89-134, CAB International, Wallingford, UK
94. **Rose T.M., Schultz E.R., Henikoff J.G., Pietrokovski S., McCallum C.M., Henikoff S.** (1998): Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucl. Acids Res.* 26:1628- 1635

95. **Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.** (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487- 491
96. **Sanger F., Nicklen S., Coulson AR.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463- 5467
97. **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*
98. **Schlessinger J.** (1988): The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochemistry* 27: 3119- 3123
99. **Schlessinger J., Ullrich A.** (1992): Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. Review. *Neuron* 9: 383- 391
100. **Schultz J., Milpetz F., Bork P., Ponting C.P.** (1998): SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5857- 5864
101. **Seitz H., Frosch M.** (1994): Der kleine Fuchsbandwurm-Erreger der alveolären Echinokokkose. *Deutsches Ärzteblatt* 91: A-2484- 2493
102. **Shoemaker C., Ramachandran H., Landa A., dos Reis M., Stein L.**(1992): Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53: 17-32
103. **Shoji S., Ericsson L.H., Walsh K.A., Fischer E.H., Titani K.** (1983): Amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine type II adenosine

- cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* 22: 3702-3709
104. **Siles- Lucas M., Gottstein B.** (2001): Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis. Review. *Trop. Med. Int. Health* 6: 463- 475
105. **Sinclair M.C., Aitken R.** (1995): PCR strategies for isolation of the 5' end of an immunoglobulin-encoding bovine cDNA. *Gene* 167: 285- 289
106. **Swiderski Z.** (1983): *Echinococcus granulosus*: hook-muscle systems and cellular organisation of infective oncospheres. *Int. J. Parasitol.* 13: 289- 299
107. **Thompson R.C., Eckert J.** (1982): The production of eggs by *Echinococcus multilocularis* in the laboratory following *in vivo* and *in vitro* development. *Z. Parasitenkd.* 8: 227- 234
108. **Thompson R.C., Lymbery A.J., Constantine C.C.** (1995): Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. Review. *Adv.Parasitol.* 35:145- 176
109. **Ullrich A., Schlessinger J.** (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203- 212
110. **Van der Geer P., Hunter T., Lindberg R.A.** (1994): Receptor protein tyrosine kinases and their signal transduction pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 251- 337
111. **Vogel, H.:** Wie wächst der Alveolarechinokokkus? (1978) *Tropenmed. Parasitol.* 29: 1-11

112. **Weinmaster G., Zoller M.J., Smith M., Hinze E., Rawson T.** (1984): Mutagenesis of Fujinami sarcoma virus: evidence that tyrosine phosphorylation of P130gag-fps modulates its biological activity. *Cell* 37: 559 - 568
113. **Wharton K.A.** (1995): How many receptors does it take? Review. *Bioessays*. 17:13-16
114. **1. WHO-Arbeitsgruppe zur Echinokokkose** (1997): Richtlinien zur Behandlung der zystischen und alveolären Echinokokkose beim Menschen, Chemotherapie Journal, 6.Jahrgang, Heft 3: 111-119
115. **Wu G., Chen Y.G., Ozdamar B., Gyuricza C.A., Chong P.A., Wrana J.L., Massague J., Shi Y.** (2000): Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287: 92- 97
116. **Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F., Massague J.** (1994): Mechanisms of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370: 341- 346 [1994a]
117. **Wrana J.T., Attisano L., Arora K., Childs R.S., Massague L., O'Connor M.B.** (1994): Two distinct transmembrane serine threonine kinases from *Drosophila* form an activin receptor complex. *Mol. Cell Biol.* 14: 944- 950 [1994b]
118. **Yarden Y., Schlessinger J.** (1987): Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of purified epidermal growth factor receptors. *Biochemistry* 26: 1443- 1445
119. **Zhang Y., Musci T., Derynck R.** (1997) The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. *Curr. Biol.* 7: 270- 276

7. Anhang:

7.1 Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AE	Alveoläre Echinokokkose
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA
CE	Cystische Echinokokkose
C- Terminus	Carboxy- Terminus
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC- ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser mit Diethylpyrocarbonat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	N/ N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleotide acid
dNTP	Mischung der Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
<i>E.multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
EmRSK1	<i>E.multilocularis</i> Rezeptorserinthreonin Kinase1
EmRTK1	<i>E.multilocularis</i> Tyrosin Rezeptorkinase1
<i>elp</i>	<i>erm- like protein-</i> Gen
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
GITC	Guanidiumthiocyanat
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- 1- thio β- D- galaktosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	milli
M	molar
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Min	Minute
MOPS	3- (N- Morpholino) Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-</i> RNA
N	nano
N- Terminus	Amino- Terminus

OD _{xxx}	optische Dichte bei _{xxx} nm
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
<i>ori</i>	Replikationsstartpunkt (<i>origin of replication</i>)
p	Protoskolex
PAA	Poly- Acryl- Amid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase- Ketten- Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
Primer	Oligonukleotid
RACE	Rapid Amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
WHO	World Health Organisation
X- Gal	5- Bromo- 4- Chloro- 3- Indolyl- β- D- Galaktopyranosid
Z	Zyste

7. Anhang

cacacocaggaagatgtcagaggtcgccagaacatcttgggacttcacgggtataatgtgtccagaggaggcgggtgttaaaggctctat
taggttttatctggccttcttccatataatcttggtaaatcttccagcattggggagatacttctccctacaacggtcttagcaaggct
ttcaactcttgaggttggcgttttcaatcttgggaacaagttgcaaatgctgtcactaataaggagttaaagtcactctcgttagag
tgacaagcagtagcaaaaatggcaacacattaccatcattgtctatggtgccaagaactatagtggaatcagtcggtccggaagtgaagc
ccaaggtttatctgtcaagccctaaaggtgattagttactcggctcatgaaattgcaaccacatgcttcgcatccatgggttt
tgctcctcaatttagTCAGGAGACACTTGTGTCAAGCGCTGCTCGAAGGAGCAGTACGCTGAGGAGAAGCAGAAGCTCTGTCAACCC
TGCAACTCCAAGTGTTAGCGTCTCTGAAGTCCAAATCCCTCCAGATGACATCTCCGCTGCTCTGGACCCGGCGATTACCTCGGAC
TTGGGGGATGTCTTCTGCTACTTTGTGAAAAAAGgttgggtgagggaaatttggtaagtaattactgaaaatgggggaagtgtcttg
gttctactaaagtacatggtgggagcaaggcaaaaagtcacagagataaaggcatccaattatagtccttctcgtctcagacccttg
taggatggtgtaccgtgacacttttgatgtgctggactactaaagtacacacttaccattttgcctatacttgacctatagtgga
tcagcatatccaacatgctgattgactagtgaggagaaagtcacaatgaaactagcttcagaaagtgggcaaacggttgagagta
ctgttagcaggaattagttggaatactggaacttcaaaatagaaccgtcaatacactacagcaatgactctctccctgttcg
atcaactcttctcttcaactctggtgaaatgcccgtctccactgactgttggcggggtctacgcagtcaccccgccaatgggtctta
aggcgcagacggggggaggctttgaaatcaatgaaggacaaaataatcttcaatggagttgggtgtgcaagtattttaac
gttggctctgtaaccacttagactgataatctgaaagagttgtttactaaaaggaggtaaagtcataattttaaaatcacaattgt
ctggtatagcaatttcaacttccactgtgtgctggtctggttcaaacagcgtgttttggatttatacaaacacaaatccagcc
agcaagtagataaagtggtttgacaaaaaaatacaaatgtgggaaacttttgccttttgcctcactgctacagtgactctgctc
tttcccaggttaggaggatgttgaatgggttaggtggctggagcatttatacgggttgatcgtttatctctacttagtgattataaag
gtgaaataatgaaatgaaatcattagatcgaacttattttcccacagcaatctcaggttccgagcaataaagggaaggtgatac
caatttgtagcagtagtaggaagtagcttct
agcacaaccttggataataatgtggggggatggggacatggtaattatagaactgggctagtttttattatgtatgaaatttacca
aatttatttaataattttaaattgagcctgaaacgcatctatttattgttggctggtagacaaaatctgacaaaaatggtaaacag
aggagtgagaaaaatggactaaagtaattttaaattgtttgctataatgaaatcagcaatcacaatgaggacgaagggacac
agtcataatttcaacttctctccatctccatct
ttcaagcccttgggttagctcttggcaaaaggggaacaaaaataatccaccaacacagcaatgaaattgttaaattaaagggcagagga
gtgattcactcactgacagtcgatttatcactcagttatcccaacttctctcctgaaagtttatgaggtaccgctgcaacg
aaattgttaattgacagcagctgaaatgaaatccgtaaaaaataatagaaagcgttagagagatttaacataatttctcttggca
ttaaattgtagcagtagtaggaagtagctgagcctgtagtaactctgtagtctgcaagaaattgtgcaatttgcctatcgtcgaac
gagccttgggtaggacacaaatctgatactgcttaacgtgttctcttttcaaccggcaatgtgtaaaaagtgaaatgaaagcaga
tgatgggttttgcactgttggatcactgcccacccatttgggtggcagctctcactgcaacttctcctcccaatgttctcaca
gcatcaacagaatacactcactcaaacacagacatgcttaaaagcttaggcagtgaggctgaaatggggtcaagttgagctgac
tttggaaatgggttcccaactgtgacaccttgaggcactgcaagagtagctgcaagtgagcaatgagcaatgagcaatgagctgag
tgactaacgctatctgtccacgcacactttcaaatgattcaagtaaaaaatggaagggcacttccaagtgcttacaagtcacaaca
gttgtgttgtagcggagtagtaaaaaatcgcccaactcaattgttcaactggtagcttcaatttggaccaccccttctactaccctg
aaacaagtttgcgcttaacttcttaacttggaaatcactatagctataattttggcaaaaatgacgtattgatttgagtttgaca
tttggagttatccggtgaataagaaatggcaatgcttatgaaactgcaactgactgctgctgattcgcacaacaaacaggggggaa
agatttctgttcaatttcaaaaagcagtggtgaaccagactaaaggagcactctctcactcagcttgggctattgtttactttat
ggaaagaaatcccaagttttagtagattttttttgaagtagctcgtgaaatgggtgttagatagttctctctcgcacataatg
caatactctgtcggattttaggaaactgaggttcaactccatcttcttggataaaaagaaaaagcgttttccagcaaacggtttt
ccattctctcggcagcattccatctcactcagctggttcggcaagtagcagcaactaccacacttgagtcagcaatgcaacggcag
aaggtgttccgtccacaacaaatctgcttttttacggcttttctctctagttatttgggttctctaaagcacttctgctctg
aataagcaatctctcactgaggaagcactcgtttatcttctcactgagcaacagatttcaatccagatgaaactgtgctccagga
ccctctgcttcaaaatcactgtagcagatgcttagtccatgctgtaaaatcccccaaggttactccctgtggtctacaac
tccatcgtctcagcagcacaacattatgggggttaaaactatcttccacatctcaatgaaataattttcccccagccttaacc
caagctccttaattgtctgcaatccgcacacagcaattagcattgcaatcacttggtagcaaacattgtctaaaaaataagctt
tctagctgaaacagctggtcctcctctctagactttaaagtcctcagccacgctcgggagtagaaaggaatagcttccagatt
ctagtagtcgctcattcttccgcagaagcggagaagcctcactcttcaattttggtagctggttagagatagagaactaaagcag
tataattttaggttccctctcaatgaccttggcactcaggaagagctctctcttctctctcagctcagctgcaatctgtttggta
caagctccttaagaggtaaaaggtctgtaaaactgacagtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
TCCAGTACCAGTGCCTGGATATGAAATGTCCACCCAAACACTTCGGCAACGCGACATCTTTGACGATCTGAACCTGAAGAAAGAGG
AATTTCCCTTAGTCACTGTGCGGGCAGCAAAATCGGGATCTTCAGGAATCGCTTCCCTGCCATCTGAATGCGAGGTTTGTGTCGGTCC
AGGAATCAGCTTCGGTTTGTGCGAAATGTGCAAAATTCAGGATGCTACCGGTGGAGTGTGCAATGCCCTGTCTGCTGgttagatgca
ctactgattactgaaatgactggtgctgctctctgctggaaagtggttaactctgattttaaatttttgaagaaaaacattta
accatgtagagtagctgttggtaaaagtggaatttgtgcaacgttagcaacgggtctacttaatgtagcgtcaaccttgcacagca
tttaaaactgttatcagcagctttaaattttcactgtagcaatctttttgtgactgggcatgacaatactctagcgcctctattct
catcogaagcagtagcagcaatgtcgggtgtaggagtaggctaggagcctatagatggtcacaagcggaggtcaaacccgggag
cttggagagctgcacaacaaatgtatcgttaatggctcaaaaatgacattatcagtcgctctcttggagcagcagtagtggct
gtcacaacttagccactaaatccaaaatagaggtgaaagaaacttgggtgcatttgggctatttcaatgcatccctttttcaatctct
cttctgtagatcagtggaagaggactcaaatcaccgtctccgttactctttaaagagcgaatctcaatgcaaccacttctctgaagtt
gataccccgctcttctcctcactcaccgcttct
gaggtacagagtggaactacttactcactgacatcaacacttctcagtagtgagcattctctctcaatcaaaaggtgtctcttg
gacagcagtagtaaaagatgcttatttagaagcgggtttactgttctgtgtaaaagagagaggtcctcaggggtcctaggtgtgag
gcatgtgctatgctcaagcggtagcactaacagtggggacagaagtagcgggttaataactactgtgtgaaatcctcgaatagtt
tcggagagatgggttaacaacgctgggtcagatcactcogtaatttctttaaataaaaagaaatgtagaataatggttaatt
atcaaaaatcaggtgtcaatctctcactgcttagatgagtaggtgttccccctttaaataaaaagtaataagttcaaaatggctgga
cgcttggcatgtaaaaaagaggagagtagcaagttgacttgcacaogttcaacccctgggtaagtagccacgctgtagcgtc
tgacttcaaaaggaacagctcaacaattgattactgactgacaaaatgggtgtgtttgtactcaacgcacaaaataaaccacccat
acagtgcaaaatcactgacacttaaaattttaaactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcact
gaagtggctgggcaagcaacctttaaagccctcagattacaagcagttgctccccggggaagagacgccccctcaatgtaga
tgctcaaaatgaaatgggttacttcaacgtgoccttctttagACGACACCTATGTCCGAATGCAACGGCAACAGAACACCTCTCA
GAGAGAGAAAAACGATGTTGGAGAGGGCGGAATGCCTACGATGTGATGACCAATGTGCTGGAGGGTGTACGGCCTACGGACCGGAGT
TCTGCAACAACTGTCTGCTATGCCAAAATCATGATGATGTCAGCGGAATAAGgtttgtttgtctcagttgattaaagtaacaaat
ggaggttaattcaatctcttctgtatgctgcaaatgtatctctcctcactatcctcaatgctatctttagcctat
ctttgtcaagaagtataatgggaaatctcctctctcgtgactttgtaggcaatacaaaaacacggccaacttatttaga

CCCATCCTTCAGACTCTTCCTTATTGCTCCCGCAGCCCTTTCCAGCTTGTCATCCCGCCCTAACCGATGTTGACTGCGTTCAT
 GAACTTGCCGCGCCATACACACCAGCTTACTTCTCTCCTGCGCCAAGCAACTTCATTTCTACTGACAATAAATAGTAGTACA
 TGCCCTAAAAA

7.3 EmRSK1- Genomische DNA Sequenz (Intron: Kleinschrift und Fettdruck):

ATGTTGTACAAAACCTCCTGTTGATTAATGAAAAACATACCATTTTGTGCAAAATGTTTTCCATCGGAACTTGTGGGAAAGATCAT
 CGGAATGCGCGTCTTTGATTGGATGCTTTTATTCTGTCCAAAAGGACGCCCTAGGATATGTGGTTCGACGAGCATTATGGTTGCCCTTCT
 CAATAATTCCTTTCCATAATCTCCTGCTCAATTTCCGTTGTTACCAATACAACCTGCTGCTTTTCATCAAACTCCTCGGACTATTGT
 AATGGCATCTCCCTGTAAACAAACAGAAATCCGGTGCCTTTGTTTTCCACTCACATTTTACCGTACTCTGCATTTTGGCTGTTG
 TATTAGCCTTTGTGTATATCAAAGGAACTTCAGCAAACATGAGAAGCCCTTACAAAGCATTCCTCCCTTATTTTCCCGAATTTAC
 TGATAGTGGCAGCGGGTCGGGAAAGCCGTTCTTAGTTAGTCAAACAATTGCTCGTCAAACAACCTTCTGGTATGTATCGGAAAAGGT
 CGGTTCCGGGAAGTATGGCGAGCCGCTGCAATGGCGAAGTGTGCTGTGAAGATCTTTCCAGCCGATGGCGCCAGTTGGACCC
 GTGAACTCAGATATATACCACTGCTCTCCTTTCTCACCAGAACATTCGCTTATATGCCAGTATATGATTTACGCGGTGGATG
 TACTCAACTCTGGCTGTTACCGCTACCACGCTGCGGTTCCCTGCACGATTTCTTTCCACGGCAAAGGTGTGACTCCGCAATGT
 GGACTCAAACTAGCCGATCAATCGCTGCGGGTCTAGCCTTCTCCACAGCGAAGTAGTTGGATTTTCATGGCAAACCGCGGATTGCC
 ATAGGGATATTAATCTAAGAATATTTCTGGTTATGGCTAACAAATGAGGCCCTGTTGGCAGATTTTGGTCTCGCTCTGGTAAAACTC
 CAAAGGAATGAATGGTGGGGGACAGCATGAGGCAAAATGAGAGCGGTGACGCTTACCTCCCGTAGCCTTCCGAGGAAACAA
 CGGTACATGGCTCTGAGATATTGGCTCTTTATCCCTTGGTGTGGGGTGGCTGGGTGCGTGCAGCAGCAGGAGAGGCAGATAGACA
 AGAACAGTCTGGGAGTGTGATGAAGACAATTTGCTATTTCCAGGGAAATGTTAGAGTGCAGACATCCGCTGCTTTCTTCGATGT
 CTATCTATCCACAGATGTCTACGCACTGGGACTCGTCTATGGGAGATTTGGAGGCGTGTACAGGCAAACAATACGAG**gtgggacca**
tcaacttcaagcttggtaatttggtaattttagtcaacttctcgttcttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggta
acggtgccaagtaagtttttatttcgccccaaaattagtgatttccaaactgacttaaacatggttgaattgtacatcaacttggaca
gtgtgacgggtggaacggcattattcatttgcagataacttgcacatttaaacacctgcaatttctaggtttogcactctctggtttta
gtaaacacctagattcaactacgtctctgtgttataatgaattcatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggta
ttttaggtagatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaatttggtaattt
ccccaaacaaactcctccctttattcttcaacacagCTTCTTATTATGACTCGGTCGCATCCGATCCAAACTTCTTACAGATGTACAG
 AGTGGTAGTATTGGGGAAACCTATGATTTCTTGTAAACACCTGGTAGACCTGCCCTACCAATGCAGGTGTGCCACCTATGCAAC
 CACATTTCTGGTGGTTCGAATTTGGTCAACGCTGGAGCTCACCGCCACCGCGACAGGGGGCAGGGGGAGCGGCCCTCCCTGACAA
 TGGAGCGGGGGAGCAGTGTAGGAGTGGCTGGTGGTGGGCGGACGTCATTGCGGAGTGTGGCACCCTCGTTACACACACCG
 CCTCTCGGCCCTGCGCGTGCAGAAACCTCAGATCATGAGGACTGTGAGCTGAATCGGACGCTGCGTTGGACACTTTTATGC
 TCAGAACCTTGCAATATGTTCTCTTTTTAATGAAATCTCTGGTAAAAATATGGTATTAATGCATACGCACCCACCCAAAAA
 AAAAA

7.4 EmSmadA- Genomische DNA Sequenz (Introns: Kleinschrift und Fettdruck):

ATGGCTAGTTCGTTGGGATTTTCGGTTTCGAGACCTGAAACCGTTTCAGTTACAACAATAATGTCCAATATTGCTCTTCATTGTACCACAT
 CCGACTATACATCCTCAAGTGACAGCAGCCGACTCGTGTAGTCCGCCAGCGTAGCTAGCGGTAGTACCTTCTCAGACAGTTTGGCCCT
 TCTGCTCCGAATTCGGGTGCGCTTTATGGAGACCTTTAGTTTCAGCCCTACGATCGCCAACAGGTATGCCAGTCCGGGATAGTAAT
 AATG**caagtcatacggcacttgagttatttgc**aaagcactc**atgggagctatttataccggcattaaatcggctaacat**taacggt
ctgcagaactacttccattcattgtaattttagtagatggtgtaactttagctaaataaagctagttctttaggccttaaaagaa
tagtagtaattttaaccct**ctaggtactaactgctcccaactacggatgta**gggtggtt**caactcactttaa**ctc**caag**
ttacttcacgtggtaaaggatccttggcattcaataatcatttccggogagagcttagctggactacttactttagcggagggtgagtg
gtgacgtttgaagtgcaattcaactgactgtagtagtcttctcgtgggtgctgtgcaacttaacatccaaagtcggcttcccc
cttctcaagttccttggtaacttctagttccactccgcttgcctgggtttgcgcaaacgcaaacaact**agttgca**gtt**ctctca**
ttcttcaactccttctccagtcgattgcatgcttgcaggtatgcaagcaacaaatgacagcaatataatacctcttgggagtcgc
atgcaacatagtcttggcaatgcaaacctgtgtgtgcaataatgogaaaagcgc**ctgcagcaatgacatcctgcaogta**at
tttgggtaccaccctactgactggccgcaaggtgccagactcggtattctgggtcctaaatogagttctcctcgggtatacactct
ttctggttaaaagcgtctcaacaggatgcaattgcaatgocggtgaagttggctgacttcttgcgatgagct**aggggtgcttatact**
gatggatgtaattcaactcctcactctctctgcttcttcaactgctgagtgcaacgggatccgttaatttgcagagagtagata
gtctcctctogctacttccctaaatcgttgggttaoccaatgctagaaacctctttttcaaacaggggctaatggtattttaag
gcaacagaacataaaataggttttgcgttgggtatttgatttgggtgctactttgtttagctattcgattggagatttctgaactca
tcaacttcaataaaagcaacacctcatttctgctattttagtattttagcaaaaacatgtagtcaactgcttcaactcctgctc
ttactatggcgcctcaactattatttaccgaagggctgggctgctgctgcttcaactgctgcaactttaactcct**ctcaaa**agatt**taac**aggt**gta**
ttgttaagttaaatagcctcaactaacgttaacgcgactagataatttcaacatttgaataggatgcaagttcttcttggctg
ggaattttaaagaa**taggcaaa**gat**caac**ctt**cttca**act**ttcc**at**ca**g**GACGATGGAGTCACTGGAGGGGAGAAATGTGA**
 CGGTCAACAACATTGGCAGGATTATTCGACCAACAACCTCAACGTCGGGAACACTCAGTCACCCAAATCTAATCCCCGGTTCCTCTCT
 CATCCCACAACCGTACCGTTGACACCTTCTTTGAAGAATTTGGTGTCTGTCTTCTACTACGAGTTGAACAACCGGTGCGGTGACGTTTT
 TTCATGCCTCGAAACCCAAATTCACCGTGGATGGGTTTACGGCGCGCTTTTGGGCACAGAAAGATTAGTTTGGCGGACTTAGTCA
 CGTGAATCGTCCACCTCAAGTTGATATGACTCGCCGCCACATTTGGTCCGGCCCTCAATCTGCTTTACATATCAGGGGAGGTTGTT
 GAGTGTCTGAGGCACTGGCCCAATTTCTGTCAGTCAACCCAGTGCATCTTAAACAATGGCATCCTGCCACCGTGGTCAAGTCC
 CTCGGC**gtaaacggatgggtttatttcc**aaact**ctat**tt**ggcaactgctggtgctggtttactgaa**agat**ttatgggtcgttaaaagc**
ataaacctatactaaatgctttcaaaaacatttgatctg**ctca**aa**actgcttca**gt**gctttca**act**ggta**tag**ctcc**att**ctata**
tttattcaccatt**ttat**tag**gtatgcttt**aa**actcttaca**ta**aaat**tt**attgct**aa**gattag**ct**agc**at**gctctctg**
ggttttagGT**GCAATCTCGT**TTTT**CGATA**ACCGT**GAAAT**TC**CGG**AA**TTGCT**GTCT**CAGT**CAGT**CACC**AGAA**CTAC**GA**AA**CC**GTA**
 TTCTCCCTACCCATATGTTTTCATTCGAATCAGCTTTTGTGAAGGATGGGGCGCGGATTACCG**gtaagttacgacagctttgct**
ttcgcct**acga**att**aaatg**ct**ttat**gt**gtg**at**agc**ac**ctctg**tatt**ccat**cc**aa**cc**ctgg**gt**gaaa**tt**cc**ag**ct**ta**aa**ta**c**
aaact**ttaa**g**ca**at**atg**tt**aa**ac**actc**g**at**ct**cc**ct**act**ct**ct**aa**at**ca**act**ta**ca**at**tg**ca**act**ta**ga**ac**ctct**ca**ta**g**at**tt**ag**
cagct**gac**g**ta**ca**ac**cc**ctg**ca**aaa**ca**aaa**tt**at**g**tag**g**ag**tg**g**at**tt**g**ct**tt**acc**g**ct**tt**aa**tg**gt**ca**aa**ag**gct**tt**at**tt

7. Anhang

aaggactgcaagatttactacttgaatggttacgttcaaatttttaatgtttggtggaattggtaaagaaaaaactacttttg
ctgtcacgtttccaaaagttgctttaaagcagagcatggtctctctgagtgtaatttgacgaattccctcttcgggttttttaactcat
taaaagtctaaacgcatgtaactgaagtgttttccgcctaggttcctgcttatttaggctggttgtttactaggtccactactatcg
ctgatcatggtcgaatgagtttgctgactcaatgtgtggataccaaaatgtcctttatttaaaaaattactgcagcataatagaggcgc
ctttgoggtaattccttcagagccctcaaagttaaaccctttgtcattggggtgcaattttctgaaatctttgtgttaaaccgaaaaa
attgcaatttttttggttggtattccaaagaaatcctatcaatccaaatacctgggaattaactttgctcctaacattgtcagggaaatc
ggtaataaaaatgtgatctatgggaactttcaaaagtttttttgtaagtaagatggttcataatgacgctataattgtcatcaaatgt
cttcgttttcgaccctactaatcatttagtaattcaagataagtcattttgtttatctttttccttcaactccgggtgaaaattg
ttgtotacaaaatgcaagggcaggccctttgagcatogtccgaggtattgccttagttcgttgggtttacagttagggaaaatttcat
agcagatttgtgccttccattttgtgatgtttatggcaggtggattgggttttagctaccctactcgagggtctttctttgcagTCGTCAA
ACTATAACCAGCACACCCTGTTGGATTGAGCTTCACCTGAACGAGCCGCTCAAGTGGCTTGACCGGGTCTTGCAAGAGATGGGCTCTC
CCTCGACTCCGTGCACCTCTGTGAGCTAAAAGTGATACATTTGTCTCAGCTTCTCGCAGTGTAGTTGCGCCTTCACGCCCTTTTGCA
TGTTTTTCCCCTTTCTCTTTCTTTCTTTGTTTCATTCTCGCACCGTGAAATTCGCCATTTATTGCAATCACTCCATCGACTTCTT
GAATCACCTTCTCTCTTATTTCTCCACATCATCCATTGCGCTCCTCTTTCGTCTAACTATCTCAATTGACGTTAGCAGCAGCCGCA
GCAACATTTCACTACTGCTGCTATTACCGCAATCAGTTCTGGTAACGACTTCGTTTTAATGCGCCAGCACTACCCCTTCTCTCCTTT
CGTGGTTTTATACATCCCCCTCCGCCCTTTTCTCCCGCATTCACGCACGCACCTTTGGACGTAATGTCTCCCGATCACGGCCATACGA
TTAGCGTCCCCTGTTGTTGTTACATGCATATATTGTGTTTGTGACTTTAAATAAATTGACTGTTTTAAGTCAAAAAA

Danksagung

Herrn Professor Dr. Matthias Frosch danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Hygiene- und Mikrobiologie der Universität Würzburg im Umfeld renommierter Forschung durchgeführt haben zu können.

Ich danke Dr. K. Brehm für die Überlassung des interessanten Themas und die fachkundige und engagierte Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Markus Spiliotis bin ich zu Dank verpflichtet für seine Unterstützung bei der Charakterisierung der genomischen Loci.

Für die angenehme Zusammenarbeit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Echinokokken- Arbeitsgruppe. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Heidi Beland, die mich immer mit Rat und Tat unterstützte.

Lebenslauf

Name: Antje Kroner

Geburtsdatum: 29.05.1975

Geburtsort: München

Familienstand: ledig

1985-1994: Adalbert Stifter – Gymnasium Geretsried

1994: Allgemeine Hochschulreife

1995-2002: Studium der Humanmedizin

an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1997: Ärztliche Vorprüfung

1998: Erstes Staatsexamen

2001: Zweites Staatsexamen

2002: Drittes Staatsexamen

Würzburg, August 2002