

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Untersuchungen zum mRNA Trans-Spleißen bei den humanparasitischen Cestoden
Echinococcus multilocularis und *Echinococcus granulosus*

**Inaugurale - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von
Katharina Jensen
aus Delmenhorst**

Würzburg, September 2002

Referent: Prof. Dr. M. Frosch

Koreferent: Prof. Dr. M. Leippe

Dekan: Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2003

Die Promovendin ist Ärztin

ABKÜRZUNGEN UND ERLÄUTERUNGEN

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AE	alveoläre Echinokokkose
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
Blot	Transfer von DNA, RNA oder Proteinen auf Nylonmembran
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	zystische Echinokokkose
Cestoden	Bandwürmer
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
dNTP	Mischung aller vier Desoxynukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. granulosus</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
<i>E. multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
Elp	ERM-like-protein
G	Guanin
g	Gramm
IPTG	β -Isopropylthiogalactosid
IE	internationale Einheit
kb	kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase Gen
LB	Luria broth
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
Min	Minuten
MM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
μ	mikro
nt	Nukleotide

NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidylat
p.a.	pro analysis = Analysequalität
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
poly(A)	Polyriboadenylat
Primer	Desoxyoligonukleotidtriphosphat
Protoskolices	Larven der Echinokokken
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunden
SSC	Sodium-Sodiumcitrat
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
SL	Spliced Leader
SMART	switch mechanism at the 5' end of RNA
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Trimethylethylendiamin
Tris	Tris-aminomethan
U	Unit = Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gall	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galaktosid
z.T.	zum Teil

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIAL.....	12
2.1	Geräte.....	12
2.2	Verbrauchsmaterial.....	12
2.3	Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme.....	13
2.4	Vektoren.....	14
2.5	Medien und Platten.....	14
2.6	Lösungen und Puffer.....	15
2.7	Primer.....	17
3	METHODEN.....	18
3.1	Kultivierung und Isolierung von <i>E. multilocularis</i> Larvengewebe.....	18
3.2	Isolierung von DNA und RNA aus <i>E. multilocularis</i> Larvengewebe.....	19
3.2.1	RNA-Präparation.....	19
3.2.2	Präparation chromosomaler DNA.....	20
3.2.3	Präparation von Metazestoden RNA.....	21
3.2.4	Präparation von Protoskolex RNA.....	21
3.3	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung.....	21
3.4	Verfahren zur cDNA-Synthese.....	22
3.4.1	cDNA Synthese nach dem SMART™cDNA Synthese Protokoll.....	22
3.4.2	cDNA Synthese mittels Verwendung eines Oligo-(dT)-Primers und über Konstruktion eines 5'-Poly-G-Endes.....	23
3.5	PCR-Verfahren.....	25
3.5.1	PCR-Standardansatz.....	25
3.5.2	SMART™RACE (rapid amplification of cDNA ends).....	26
3.5.3	Inverse PCR.....	28
3.5.4	RT-PCR.....	29
3.5.5	PCR mit dem Expand™High Fidelity PCR System.....	30
3.5.6	PCR mit degenerativen Primern.....	31

3.5.7	kompetitive PCR.....	32
3.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	34
3.6.1	Agarosegelelektrophorese.....	34
3.6.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	35
3.6.3	Marker für die Gelelektrophorese.....	37
3.7	Automatisierte DNA-Sequenzierung.....	37
3.8	Klonierung.....	38
3.8.1	Klonierungen mit dem TOPO TA Cloning® Kit.....	38
3.8.2	Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl Methode.....	39
3.8.3	Mini-Plasmidpräparation.....	40
3.9	DNA-Markierung und Nachweis mit Digoxigenin.....	41
3.9.1	Dot Blot und immunologischer Digoxigenin-Nachweis	42
3.9.2	DNA Hybridisierung.....	43
3.9.3	DNA-Nachweis über Hybridisierung mit einer DIG-markierten DNA-Sonde.....	43
4	ERGEBNISSE.....	45
4.1	Charakterisierung genregulatorischer Sequenzen von <i>E. multilocularis elp</i>	45
4.1.1	Charakterisierung des Transkriptionsstartpunktes und der Polyadenylierungsstelle.....	45
4.1.2	Charakterisierung der Promotorregion.....	50
4.1.3	Untersuchung der Exon- Intronengrenzen.....	51
4.2	Charakterisierung des Trans-Splicing Mechanismus bei Echinokokken.....	52
4.2.1	Charakterisierung eines alternativen <i>elp</i> -Transkriptes.....	52
4.2.2	Charakterisierung weiterer SL-trans-gespleißter mRNAs von <i>E. multilocularis</i>	55
4.2.3	Klonierung eines SL-RNA Gens aus <i>E. multilocularis</i> und <i>E. granulosus</i>	58

4.2.4	Untersuchungen der isolatspezifischen Expression der cis- und trans- gespleißten <i>elp</i> Transkripte von <i>E. multilocularis</i>	65
4.2.4.1	Analyse über PCR.....	65
4.2.4.2	Analyse per Dot Blot.....	66
4.2.5	Untersuchungen zur stadienspezifischen Expression der <i>elp</i> Transkripte.....	69
4.2.5.1	Analyse per RT-PCR und anschließender Hybridisierung mit einer <i>elp</i> -spezifischer Sonde.....	69
4.2.5.2	Genaue quantitative Analyse des Expressionsverhältnisses per kompetitive PCR.....	70
4.2.6	Identifikation eines alternativen primären <i>elp</i> -Transkriptes.....	73
4.3	Versuch der Identifizierung eines weiteren ERM-homologen Gens von <i>E. multilocularis</i>	75
5	DISKUSSION.....	77
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	86
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	88
8	ANHANG.....	96

1 EINLEITUNG

Die besonders in der nördlichen Hemisphäre verbreitete alveoläre Echinokokkose (AE) und die weltweit auftretende zystische Echinokokkose (CE) stellen zwei humanmedizinisch sehr relevante Parasitosen dar (Schantz, 1992). Die Letalitätsrate liegt zwischen 52-94% für untherapierte humane Träger von *E. multilocularis* und 10-14% für chirurgisch und chemotherapeutisch behandelte Patienten (Hahn et al., 1999). Vier Spezies werden derzeit der Gattung *Echinococcus* zugeordnet; *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *E. oligarthus* und *E. vogeli*. Signifikante humanmedizinische Bedeutung besitzen nur die beiden erstgenannten Arten, *E. multilocularis* und *E. granulosus* als Erreger der AE bzw. der CE. Das Vorkommen von *E. oligarthus* und *E. vogeli* ist auf Gebiete Zentral- und Südamerikas beschränkt und Humaninfektionen durch diese Spezies sind nur sehr selten (Dönges, 1988; Gottstein, 1992a). Im Folgenden sind die Phylogenie der Cestoden, der Entwicklungszyklus und die Epidemiologie von Hund- und Fuchsbandwurm sowie neuere Daten zur Klinik, Diagnostik und Therapie der Echinokokkose kurz dargestellt.

Phylogenie der Cestoden

Unter der Gattung *Echinococcus* werden kleine endoparasitische Plattwürmer (Plathelminthen) zusammengefaßt. Sie werden der Klasse der Cestoden (Bandwürmer) im Speziellen der Unterklasse der Eucestoden (der echten Bandwürmer) aufgrund bestehender morphologischer und genetischer Merkmale zugeordnet (Thompson, 1995; Hahn, 1999). Cestoden, Trematoden und Turbellaria stellen die Hauptklassen der Plathelminthen dar, wobei jedoch nur unter Cestoden und Trematoden parasitäre Vertreter zu finden sind. Außerdem ist anzumerken, daß es sich bei den Turbellaria um eine Ansammlung paraphyletischer Organismen handelt, deren Zusammenfassung als Taxon umstritten ist (Ax, 1995).

In biologischen Textbüchern werden Plathelminthen als *Acoelomata* als Teil der parasitischen *Bilateria* dargestellt. Neuere genetische Untersuchungen haben gezeigt, daß Plathelminthen jedoch sehr wohl den *Coelomata* zuzurechnen sind, da sich die

primäre Leibeshöhle erst im Verlauf der Entwicklung zurückgebildet hat. Den Untersuchungen zufolge werden Plathelminthen derzeit mit Mollusken und Anneliden der Protostomiergruppe der Lophotrochozoen zugeordnet, welche der zweiten Protostomiergruppe der Ecdysozoen (Arthropoden, Nematelminthen) und den Deuterostomiern gegenübergestellt wird (Adoutte, 1999).

Entwicklungszyklus der Echinokokken

Um ihren Lebenszyklus zu vollziehen, benötigen Echinokokken zwei Säugetierwirte. Als Endwirt fungiert bei *E. multilocularis* primär der Fuchs, doch können auch Hund oder Katze an dessen Stelle treten. Nur in den Endwirten, die stets Karnivore sind, kommt es zum Heranwachsen der adulten Echinokokken. Diese besitzen in der Regel drei bis fünf Glieder - sogenannte Proglottiden - und können zu einer Gesamtlänge von 4- 6 mm heranwachsen. An ihrem Kopfteil, dem Scolex, sind sie mit einem doppelten Hakenkranz und vier Saugnäpfe ausgestattet (Smyth, 1963).

Der Endwirt infiziert sich über die orale Aufnahme larvenhaltigen Gewebes, aus dem sich innerhalb von ein bis zwei Monaten im Dünndarm des jeweiligen Tieres der geschlechtsreife, zwittrige Bandwurm entwickelt. Mit Hilfe der Saugnäpfe und des Hakenkranzes kann sich dieser tief in den Lieberkühnschen Krypten einnisten, um dort nach Selbstinsemination Eier zu produzieren, die durch Ablösung der endständigen Proglottide mit dem Kot des Wirtes in die Umwelt gelangen. Diese relativ hitzeempfindlichen Eier besitzen eine hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen. Sie überstehen niedrige Temperaturen bis -18°C und können unter natürlichen Bedingungen bis zu 240 Tage lang infektiös bleiben (Schad et al., 1987).

Der Zwischenwirt infiziert sich durch die orale Aufnahme dieser Eier. Die Eier enthalten die Oncosphäre (Sechshakenlarve), das erste Larvenstadium des Bandwurms. Im natürlichen Lebenszyklus von *E. multilocularis* wird die Rolle des Zwischenwirtes von verschiedenen Nagetieren z. B. der Feldmaus übernommen. Im Anschluß an die Ingestion der Eier, schlüpfen diese unter Einwirkung proteolytischer Enzyme im Magen-Darmtrakt. Die aktivierten Oncosphären gelangen nach Penetration der Darmwand über Blut- oder Lymphzirkulation an ihr Zielorgan, d.h. in über 90% der Fälle in die Leber z.

T. aber auch in Lunge, Muskulatur, Herz oder Gehirn (Eckert et al., 1992; Gottstein, 1992; Schantz & Gottstein, 1986). Hier kommt es zur Entwicklung des Metazestodenstadiums, des zweiten Larvenstadiums. Die Metazestode von *E. multilocularis* ist aufgebaut aus flüssigkeitsgefüllten Blasen, die zu einem schlauchartigen Netzwerk heranwachsen können. Nach außen sind sie durch eine azelluläre Laminatschicht abgegrenzt. Diese dient als Schutz gegen die Immunantwort des Wirtes und zur strukturellen Festigkeit der Metazestode. Proximal sind die Blasen durch eine zelluläre Keimschicht bestehend aus synzytialen Tegument ausgekleidet, welches am Stoffaustausch mit dem Wirt beteiligt ist und über Plasmabrücken mit darunterliegenden kernhaltigen Zellen in Verbindung steht. Durch Protrusion dieser Keimschicht d.h. durch asexuelle Vermehrung über Gewebssprossung wächst das Metazestodengewebe von *E. multilocularis* tumorartig-infiltrativ in das umliegende Gewebe ein, und ist daher häufig schlecht abgrenzbar. In der Feldmaus als Zwischenwirt, entwickeln sich von der Keimschicht ausgehend 2-4 Monate nach der Infektion zahlreiche Protoskolizes. Diese stellen das dritte Larvenstadium des Fuchsbandwurms dar und bilden die spätere Kopffregion des Adultwurms.

Als Fehlwirt kann der Mensch an die Stelle des Zwischenwirtes treten. Er gilt deswegen als Fehlwirt, weil er zum einen nicht als Beute für den Endwirt fungiert, und zum anderen es in ihm nur sehr selten zur Ausbildung des dritten Larvenstadiums der Protoskolizes kommt (Rausch & Wilson, 1973). Der Mensch infiziert sich im Falle der AE wahrscheinlich über die orale Aufnahme kontaminierter Waldfrüchte oder über den direkten Kontakt mit dem Endwirt. Eine besondere Gefahr besteht für Jäger während des Abbalgens infizierter Füchse.

Der Entwicklungszyklus des Hundebandwurms ist dem des Fuchsbandwurmes sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Zwischen- und Endwirten, sowie in der Struktur des zweiten Larvenstadiums. Dem Hundebandwurm dient der Hund, aber auch andere Karnivore wie Wolf, Schakal oder Dingo als Endwirt. Als Zwischenwirt werden verschiedene Wiederkäuer besonders das Schaf aber auch Pferd, Rind und Kamel genutzt. Das Metazestodengewebe von *E. granulosus* besitzt einen anderen morphologischen Aufbau bestehend aus relativ großen Metazestodenvesikeln mit interner Sprossung. Außerdem sorgt eine zusätzliche äußere fibröse Bindegewebsschicht (Adventitia) für eine gute Abgrenzbarkeit der bis zu

kindskopfgroßen Zysten (Leducq & Gabrion, 1992; Rogan & Richards, 1987, Slais & Vanek, 1980). Dies erlaubt eine bessere Therapierbarkeit der CE gegenüber der AE.

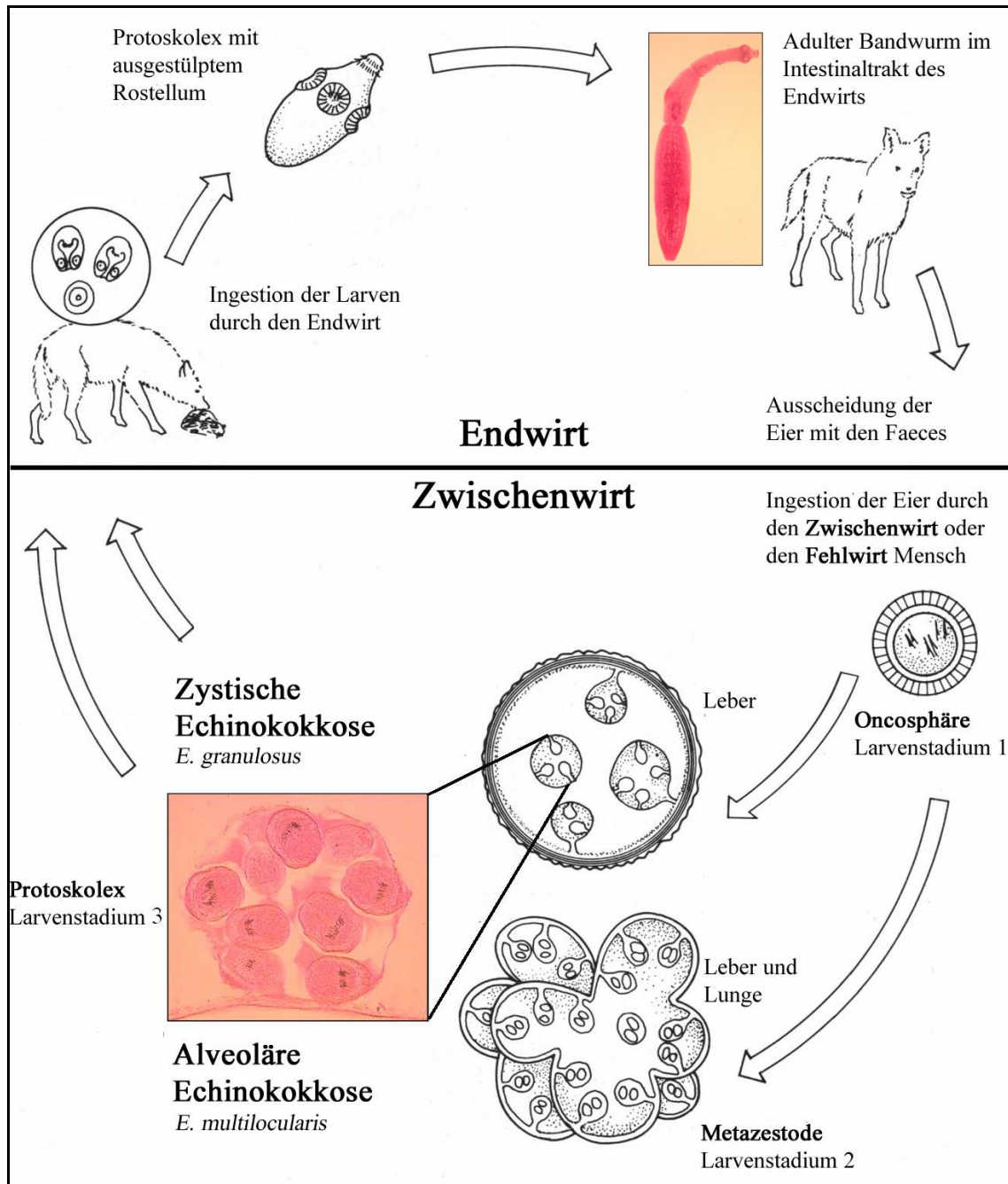


Abb. 1: **Entwicklungszyklus von *E. multilocularis* und *E. granulosus*.** Bei der Darstellung handelt es sich um eine modifizierte Version der Abbildung "Life cycle of *Echinococcus* spp." von Bogitsh, B. C. und Cheng, T. C. 1990.

Epidemiologie der Echinokokkose

Dem Ausbreitungsgebiet seiner Hauptendwirte – dem Rot- und Polarfuchs – entsprechend beschränkt sich die Verbreitung des kleinen Fuchsbandwurms *E. multilocularis* auf Gebiete der nördlichen Hemisphäre. Die Hauptendemiegebiete der AE liegen in Nordsibirien, Alaska und Zentralchina, mit einer Inzidenz von z. T. mehr als 60 Fällen je 100 000 Einwohner p.a. (Craig, Rogan & Allen, 1995). In hochendemischen Gebieten Chinas liegt die Befallsrate der Füchse zwischen 15 und 60 % die von Hunden zwischen 10 und 14 %. Teilweise besteht in diesen Regionen eine Durchseuchungsrate der Bevölkerung mit *E. multilocularis* von 5 %, die in vielen Fällen auf schlechte hygienische Verhältnisse sowie das enge Zusammenleben von Hund und Mensch zurückzuführen ist (Craig, 1994, Craig et al., 1992). In Mitteleuropa liegen die Hauptausbreitungsgebiete der AE in Ost- und Zentralfrankreich, der Schweiz, Österreich und bestimmten Regionen Deutschlands wie der Schwäbischen Alb, der Rheinebene und der Alpenregion (Gottstein, 1992a; Frosch & Lucius, 1994). In den Endemiegebieten liegt die Durchseuchungsrate der Füchse bei 5-60% (Loos-Frank & Lucius, 1992; v. Keyserlingk & Welzel, 1992). Nach Schätzungen ist hier mit einer Prävalenzrate der humanen Echinokokkose von ca. 1:30000 bis 1:20000 zu rechnen (Kimmig, 1992).

Im Gegensatz zum Fuchsbandwurm weist der Hundebandwurm *E. granulosus* eine weltweite Verbreitung auf. Endemisch tritt die CE in Europa nur im Mittelmeerraum auf, außereuropäisch in Teilen Ostafrikas, der ehemaligen Sowjetunion, Mittel- und Lateinamerika sowie China (Bähr, 1981). Die Prävalenzraten humaner Infektionen liegen bei über 50/100 000 p.a., laut einer Studie von P. S. Craig in Turkana/ Kenia sogar bei über 200/ 100 000 p.a. (Craig, Rogan & Allen, 1995). Aufgrund der guten chirurgischen Interventionsmöglichkeiten besteht bei der CE im Gegensatz zu der AE jedoch mit 2- 4 % eine deutlich geringere Letalitätsrate (Hahn et al., 1999).

Klinik, Diagnose und Therapie der Echinokokkose

Die Ausprägung des Krankheitsbildes der humanen Echinokokkose hängt von Sitz und Größe des Gewebsprozesses sowie der Echinokokkenart ab. Meist geht dem

symptomatischen Stadium ein klinisch unauffälliges Wachstum des Larvengewebes über 10 bis 15 Jahren voraus. Durch das expansive Wachstum der Larvenzyste von *E. granulosus* kommt es, bedingt durch den Verdrängungsprozeß, zu Dysfunktionen des befallenen Organs. Bei der AE sind epigastrische Schmerzen, Ikterus, Gewichtsabnahme und Hepatomegalie hinweisend auf einen infiltrativen Befall ähnlich einem tumorartigen Befall der Leber mit *E. multilocularis*. Metastasen können sich in Lunge, ZNS und anderen Organen durch Spontanruptur und Einbruch der Metazestoden in Blut- und Lymphbahnen ansiedeln. Es kann dann zu entsprechenden Symptomen wie Haemoptysis, chronischem Husten und epileptischen Anfällen kommen (Ammann & Eckert, 1995).

Zum primären Nachweis einer Infektion mit Echinokokken werden bildgebende Verfahren eingesetzt. Die Sonographie gilt als gute Screeningmethode. Eine Eingrenzung der Differentialdiagnosen erfordert jedoch den Einsatz von CT oder MRT (Katranci et al., 1999; DUEWELL et al., 1990). Die bildgebenden Verfahren erlauben zwar eine relativ gute morphologische Beurteilung, sind jedoch häufig schwer interpretierbar und z.T. unzuverlässig.

Da auch der direkte Nachweis von Parasitenanteilen wie Zystenmembran oder Haken nur in sehr seltenen Fällen gelingt, erfordert die sichere Diagnosestellung stets einen serologischen Nachweis. Antikörper gegen Gesamtantigen aus Metazestodengewebe können im indirekten Hämagglutinationstest, im ELISA und per Latexagglutination nachgewiesen werden. Trotz Kombination verschiedener Nachweise zur Erhöhung der Spezifität (z. B. Antigen B und Antigen 5) konnten ein Mangel an Sensitivität und das Auftreten von Kreuzreaktionen innerhalb des Genus Echinokokkus oder zwischen Echinokokken und anderen Parasiten aus der Ordnung der Cyclophyllidea bei dieser Methode nicht ausgeschlossen werden (Gottstein, 1992; Rickard & Lightowlers, 1986). Bei 5-10% der Infizierten können keine Antikörper nachgewiesen werden (bei Befall der Lunge mit *E. granulosus* können bei fast einem Drittel der Patienten keine Antikörper detektiert werden) und in manchen Fällen lassen sich Antikörper erst postoperativ bestimmen. Außerdem erlauben diese Verfahren, bedingt durch die lange Persistenz der Antikörper, keine Aussagen über Therapieerfolge.

Zunehmend werden rekombinante Antigene zur Diagnose und Differenzierung der humanen Echinokokkose eingesetzt. Die kodierenden Sequenzen der rekombinanten Antigene wurden aus cDNA-Expressionsbanken von Echinokokkenlarven isoliert. Auf diese Weise konnten die Antigen kodierenden Klone EM10, spezifisch für *E. multilocularis*, und EG55, für *E. granulosus*, isoliert werden (Frosch et al., 1991). cDNA-Klone mit einer fast identischen Nukleotidsequenz zu *elp* (=ERM-like-protein; Bezeichnung für das durch EM10 kodierte Gen) konnten außerdem von Hemmings and McManus EM4 (1991) und von Felleisen und Gottstein Antigen II/3 (1993) identifiziert werden. Im Sandwich-ELISA konnte die AE über Elp mit einer Sensitivität von 93.2 % und einer Spezifität von 96.8 % und die CE über EG55 entsprechen mit 89.1 % und 98.6 % nachgewiesen werden (Frosch et al., 1991; Helbig et al., 1993).

Eine weitere sensitive Methode, die jedoch lediglich von geringer Bedeutung und hier nur der Vollständigkeit halber mit aufgeführt ist, ist der Nachweis des Parasiten auf DNA-Ebene über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Gottstein & Mowatt, 1991). Die DNA für dieses Verfahren wird durch Feinnadelbiopsie gewonnen, was problematisch in Bezug auf die Gewinnung geeigneten Materials ist und keinerlei Aussage über die Aktivität des Parasiten erlaubt.

Die Therapie der Wahl der Echinokokkose stellt die operative Entfernung des Parasitengewebes dar. Die gut abgekapselten Zysten von *E. granulosus* erlauben ein solches Vorgehen in 90 % der Fälle (Mentha et al., 1991). Als weniger invasives und weniger aufwendiges Verfahren wird neuerdings die Punktion-Aspiration-Injektion-Respiration kurz PAIR-Methode bei der CE angewandt. Unter Ultraschallkontrolle wird die Hydatidenflüssigkeit nach Feinnadelpunktion abgelassen und mit 95 %igem Ethanol gespült. Die PAIR-Methode stellt eine sichere, kostengünstige und effektive Therapiemöglichkeit der CE dar (Filice & Brunetti, 1997; Ustunsoz et al., 1999).

Da das Metazestodengewebe von *E. multilocularis* durch das infiltrative Wachstum schlecht von dem umliegenden gesunden Gewebe abzugrenzen ist, ist ein radikales chirurgisches Vorgehen nur in etwa 20-30 % der Fälle möglich (Ammann, Hoffmann & Eckert, 1999). Auch die PAIR-Methode kann hier aufgrund des schlauchartigen Wachstums nicht zur Anwendung kommen. Alternativ bleibt der Einsatz der Benzimidazol-derivate Albendazol und Mebendazol. Ihre Wirkung ist den klinischen

Therapieerfolgen nach zu urteilen nicht parasitozider sondern parasitostatischer Natur. Langzeitstudien mit Mebendazol und Albendazol haben gezeigt, daß es unter Therapie zu einer Reduktion des Larvengewebes oder zumindest zu einer Stagnation des Wachstums kommt, wodurch wahrscheinlich ein geringer Anstieg der 10-Jahre-Überlebensrate zu erklären ist (Ammann, Hoffmann & Eckert, 1999). Da eine Abtötung des Parasiten jedoch wahrscheinlich ausbleibt, sind die Heilungsraten, wie durch verschiedene Studien belegt, weiterhin gering (Ammann und Eckert, 1995).

ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) Proteine bei *E. multilocularis*

Bei Elp handelt es sich um ein Protein, das signifikante Homologien zu der bei Säugern gut charakterisierten Familie der ERM-Proteine aufweist. Hierzu gehören Ezrin, Radixin und Moesin. Subzellulär konnten ERM-Proteine bei Säugetierzellen in speziellen Plasmamembranstrukturen wie Mikrovilli, Wachstumsspitzen und Zellkontaktpunkten nachgewiesen werden. Es wird vermutet, daß sie sowohl eine regulatorische als auch strukturelle Rolle in der Funktion des kortikalen Actinzytoskeletts spielen, wobei die genauen molekularen Mechanismen noch nicht bekannt sind (Bretscher, 1999).

Basierend auf bestehende Sequenzhomologien in der N-terminalen Domäne werden die ERM-Proteine der Bande 4.1 Superfamilie zugeordnet. Neben den Proteinen Merlin und Talin gehören zu dieser Superfamilie auch diverse Tyrosinphosphatasen. Allen Mitgliedern der 4.1 Superfamilie kommt eine Rolle in der Regulation der Zytoskelett-Plasmamembraninteraktion zu (Takeuchi, 1994). Die ERM-Proteine weisen untereinander Aminosäuresequenzidentitäten von 72- 80% auf. Relativ hoch konserviert sind sie dabei in ihrem N-terminalen und dem mit einer Aktinbindungsdomäne versehenen C-terminalen Bereich (Tsukita & Yonemura, 1997).

In allen bisher untersuchten höheren Eukaryonten besteht eine gewebs- und organspezifische Expression von Ezrin, Radixin und Moesin. In Zellkulturversuchen konnte ihre Koproduktion und Kolo-kalisation in einzelnen Zellen an oben genannten subzellulären Strukturen nachgewiesen werden, wo sie funktionell unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen (Tsukita et al., 1997). Untersuchungen bei niederen

Eukaryonten, die nur ein ERM ähnliches Protein und evtl. ein zusätzliches Merlin exprimieren, haben gezeigt, daß anscheinend alle Funktionen, die bei Vertebraten von einer Kombination aus Ezrin, Radixin und Moesin übernommen werden, in niederen Metazoen durch ein einziges ERM ähnliches Protein erfüllt werden können.

So konnten auf dem gesamten Genom von *C. elegans* nur zwei potentielle ERM Gene identifiziert werden (EMBL, GenBankTM, accession number T29262 und T29263). Die Gene sind auf dem Chromosom direkt hintereinander lokalisiert, was einen Entstehungsprozeß durch Genduplikation nahe legt. In Bezug auf ihre Nukleotidsequenz unterscheiden sie sich lediglich in einem kurzen Abschnitt am 5'-Ende, was vermuten läßt, daß sie für nur ein einziges ERM- Protein kodieren. Extensive Sequenzanalysen von PCR-Produkten bei *Drosophila* führten ebenfalls zur Identifizierung nur eines ERM ähnlichen Proteins und eines zusätzlichen potentiellen Merlins (McCartney and Fehon, 1996).

Spliced Leader-Trans-Spleißen, ein Mechanismus der RNA-Prozessierung

Trans-Spleißen ist ein Mechanismus der mRNA-Prozessierung, bei dem Exons verschiedener prä-mRNA-Moleküle miteinander verbunden werden, um eine reife mRNA zu bilden. In einer speziellen Form des Trans-Spleißens, dem SL (Spliced Leader)-Trans-Spleißen, werden kurze Miniexons, sogenannte SL Sequenzen, an das 5' Ende einer prä-mRNA angefügt, um eine reife mRNA zu bilden (Agabian, 1990; Huang & Hirsch, 1992; Nilsen, 1993). Bei allen bisher untersuchten SL Donor-Molekülen handelt es sich um kurze, ca. 100 bp lange, nicht polyadenylierte, nukleäre RNAs (sogenannte SL-RNAs). Diese besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den snRNAs, welche als Bausteine des Spleißosoms am "konventionellen" oder Cis-Spleißing Mechanismus ganz wesentlich beteiligt sind.

Erstmals wurde Trans- Spleißen bei kinetoplastiden Protozoen beschrieben. Alle dort untersuchten, reifen mRNAs wiesen die gleiche SL-Sequenz an ihrem 5' Ende auf (Blumenthal, 1995; Donelson & Zeng, 1990; Murphy, Watkins & Agabian, 1986). Anschließend konnte dieser Mechanismus auch für anderen Protozoen und diverse Metazoen nachgewiesen werden. Der Nachweis einer endogenen Produktion von SL

RNAs bei Vertebraten, Pilzen oder Insekten konnte jedoch bisher nicht erbracht werden (Blumenthal, 1993; Bruzik & Maniatis, 1992; Tessier et al., 1991). Bei Metazoen wurde SL-Trans Spleißen in den Stämmen Nematelminthen, Chordaten, Cnidarien und auch bei Trematoden (Plathelminthen) identifiziert (Davis, 1997; Stover & Steele, 2001; Vandenberghe et al., 2000). Während bei kinetoplastiden Protozoen Trans-Spleißen die Hauptform des Spleißens darstellt, werden Transkripte von Metazoen sowohl trans- als auch cis- gespleißt, d.h. in der Regel wird das Transkript am 5' Ende in trans-gespleißt und interne Introns werden über Cis-Spleißen entfernt (Rajkovic et al., 1990; Davis et al., 1994; Davis, 1997). Außerdem werden nicht alle mRNAs bei Metazoen trans-gespleißt. So werden bei *Euglena gracilis* 80- 90 % der Transkripte trans- gespleißt, bei *C. elegans* etwa 60- 70 % (Davis et al., 1995). Bei dem zuletzt genannten Rundwurm konnten sogar 5 verschiedene SL-Sequenzen isoliert werden, die jeweils unterschiedlich häufig als SL beim Spleißen fungieren (Ross, Freedman & Rubin, 1995).

Trotz vieler signifikanter Ergebnisse den biochemischen Mechanismus des Trans-Spleißens betreffend, existieren kaum Erkenntnisse über die genauen *in vivo* Funktionen des SL. Das Auflösen polycistronischer Transkripte durch Trans- Spleißen bei Trypanosomen, *Caenorhabditis elegans* und wahrscheinlich auch *Schistosoma mansoni*, stellt bisher die einzige sicher nachgewiesene Funktion dieses alternativen Spleißing-Mechanismus dar (Blaxter & Liu, 1996; Blumenthal, 1995; Davis, 1996; Davis & Hodgson, 1997; Donelson & Zeng, 1990; Nilsen, 1993 & 1995). Da jedoch in *C. elegans* nicht alle polycistronischen Transkripte (nur etwa 25%) sondern auch ein Teil der monocistronischen Transkripte in Trans gespleißt werden, ist anzunehmen, daß Trans-Spleißen noch an weiteren Mechanismen beteiligt ist (Blumenthal, 1995; Davis, 1996). Mögliche Funktionen wie eine Rolle in der Regulation der Translation, Kontrolle der mRNA-Stabilität und die intrazelluläre Organisation des Transportes von Transkripten sind zur Diskussion gestellt worden (Davis, 1996; Nilsen, 1993; Maroney et al. 1995). Spezifische, funktionell essentielle Sequenzmotive der SL konnten bisher nicht identifiziert werden, da die Primärsequenzen der Spliced Leader von Organismen aus unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen stark divergieren. Trotz Nachweis des SL-Trans-Spleißens bei parasitischen Helminthen, wie Nematoden und Trematoden, war dieser Genexpressionsmechanismus vor dieser Arbeit noch nicht für Cestoden beschrieben worden.

Ziele der Arbeit

Nur wenige Gene der Cestoden *E. multilocularis* und *E. granulosus* konnten bisher charakterisiert werden und die genregulatorischen Mechanismen dieser Spezies sind kaum untersucht. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es den Transkriptionsstartpunkt des *elp*-Gens von *E. multilocularis* zu kartieren, um Promotorstrukturen zu charakterisieren, die u.a. für heterologe Genexpression genutzt werden können. Im Verlauf dieser Arbeiten konnte erstmals auch bei Cestoden eine Spliced Leader Sequenz identifiziert werden. Ausgehend von der bekannten SL-Sequenz sollte das SL-Gen von *E. multilocularis* und *E. granulosus* sowie weitere Gene, die über SL-Trans-Spleißen exprimiert werden, charakterisiert werden, um Trans-Spleißen bei Cestoden eindeutig belegen zu können. Zur genaueren Untersuchung des Mechanismus des SL-Trans-Spleißens insbesondere auf entwicklungspezifische und isolatspezifische Unterschiede der Genexpression sollte das SL-trans-gespleißte *elp* bei *E. multilocularis* näher untersucht werden.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Brutschränke	verschiedene Ausführungen (Heraeus, Hanau)
Elektrophoresekammern	für horizontale Gele in verschiedenen Ausführungen (Biometra, Göttingen) für vertikale PAA-Gele (Biomtra, Göttingen)
Gel-Dokumentation	Midi-Doc (Herolab, Wiesloch)
Heizblock	Dri-Block, DB3 (Techne, Cambridge, UK)
Hybridisierungssofen	CV 5 (Biometra, Göttingen)
Schüttelinkubator	TH 30 (Bühler, Tübingen)
Sequenziergerät	ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)
Spannungsgerät	Power Pack P24 und P25 (Biometra, Göttingen)
Speed Vac®Plus	SC110A (Savant, New York, USA)
Spectrophotometer	U-2000 (Hitachi, San José, USA), UVT 28 MP (Herolab, Wiesloch)
Thermocycler	Trio-Thermoblock™ (Biometra, Göttingen)
Ultraschallgerät	Sonifier®II Ultraschall Desintegrator Model 250 mit Standard Mikrospitze, konisch, 3 mm (Branson, Danburg)
Ultra-Turrax	T25 (Janke&Kienkel, Staufen)
UV-Crosslinker	Stratalinker®1800 (Stratagene, Heidelberg)
Wasserbäder	WBU 45 (Mettler)
Zentrifugen	Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 und Ultrazentrifuge L7 (Beckman, München), Biofuge 15 (Heraeus, Hanau), EBA (Hettich)

2.2 Verbrauchsmaterial

Filme	Röntgenfilm, Hyperfilm™-MP (Amersham, Braunschweig)
Filmkassetten	verschiedene Größen (Kodak)

Filterpapier	Whatman®3MM Chr (Schleicher & Schüll, Dassel)
Membranen	Nylonmembran, Quiabrane (Qiagen)
Spritzen und Kanülen	(Braun Melsungen AG, Melsungen)
Reaktionsgefäße	0.5, 1.5 und 2.0 ml Gefäße (Sarstedt, Nümbrecht) 15 und 50 ml Flakons (Greimer, Nürtingen) 15 ml Röhrchen, steril (Greiner, Nürtingen)
Zentrifugenröhrchen	Quickseal™, 25 × 89 mm (Beckman, München)

2.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

Amsham	Terminale Transferase
AppliChem	IPTG, Chloroform, Phenol, Formaldehyd, Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1)
Bayer	Ampicillin (Binotal®)
Boehringer	DIG-DNA Labeling Kit, DIG-Luminescent Detection Kit, DNA-Molekulargewichtsmarker II und III, DIG Oligonukleotide Tailing Kit, Lysozym, Proteinase K, Expand™ High Fidelity PCR System, Titan™ RT-PCR System, X-Gal, T4-Ligase
Clontech	SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit
Difco	Agar-Agar, Glucose
Laboratories	
Eurogentec	Goldstar Taq-Polymerase, Smart-Ladder
Gibco	Superscript II MMLV-reverse Transkriptase, 1 kb DNA Ladder, RNA-Ladder 0,24-9,5 kb
Invitrogen	TOPO-TA Cloning® Kit
Life Technologies	LB-Agar (Lennox L Agar), LB Broth Base (Lennox L Broth Base)
Merck	Silbernitrat, Natriumcarbonat
Pharmacia	Restriktionsendonukleasen (<i>BAM</i> H1)
Qiagen	Qiagen Plasmid Midi/Maxi/Mega Kit, QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen Gel Extraction Kit, RNeasy® Mini Kit

Serva	Tween®20, TEMED, EDTA, Ethidiumbromid, Bromphenolblau
Stratagene	MMLV- Reverse Transkriptase, dNTP-Mix
USB	Acrylamid, SDS
Sigma	DEPC, Orange G, Paraffin-Mineralöl, Kanamycin

Alle Puffer und Lösungen, die autoklaviert werden, werden mit destilliertem Wasser angesetzt. Zur Lösung von DNA wird autoklaviertes ddH₂O, pH 8 eingesetzt und für Arbeiten mit RNA zusätzlich mit DEPC versetzt. Alle restlichen Chemikalien wurden entweder von Merck, Darmstadt oder Serva, Heidelberg in p.a. Qualität bezogen.

2.4 Vektoren

pPCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen)

Linearisierter Vektor mit Thymin-bzw. Adenosin Überhang zur Klonierung von PCR-Produkten (f1 ori, colE1 ori, lacZ α Fragment, MCS, Kanamycin und Ampicillin resistance ORF, T7-RNA-Promotor)

2.5 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 werden mit 1 l Medium gemischt, autoklaviert und bei ca. 40°C in Platten gegossen

Bei Zusatz von Antibiotika werden folgende Konzentrationen erstellt:

Ampicillin	100 μ g/ml (Stammlösung: 25 mg/ml)
Kanamycin	50 μ g/ml (Stammlösung: 25 mg/ml)

2.6 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

10 × Running Buffer

200 mM MOPS

10 mM EDTA

50 mM Natriumacetat (pH6)

pH6.7-7.0

Probepuffer

3 % 2- Mercaptoethanol

20 % Glyzerin

0.05 % Bromphenol

GITC

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

Lösungen zur DNA-Hybridisierung:

Lösung 1

0.25	M	HCl
------	---	-----

Lösung 2

0.5	M	NaOH
1.5	M	NaCl

Lösung 3

1	M	Tris (pH7.5)
3	M	NaCl

Lösungen zur Mini-Plasmid-Präparation:

Lösung A

10 mM	EDTA
25 mM	Tris-HCl
50 mM	Glukose
10 mg	RNAse
pH 8	

Lösung B

200 mM	NaOH
1 %	SDS

Lösung C

2 M	Essigsäure
3 M	Kaliumacetat

Maleinsäurepuffer

0.1	M	Maleinsäure, pH7.5
0.15	M	NaCl

2.7 Primer

Die Oligonukleotide (Länge je nach Versuchsansatz 17-30 bp) wurden von der Firma ARK Scientific GmbH Biosystems (Darmstadt) bezogen.

Abkürzungen: M=(A, C); R (Purine)=(A, G); W=(A, T); S=(C, G); Y (Pyrimidine)=(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)

Degenerierte Primer

MER-1: 5' ACTCRRCAYYTSTTTYTTYTXCA 3'
 MER-2: 5' ACTATKGGTYTSMGXGARWSXTGG 3'
 MER-3: 5' CCTGARGCYTCYGTKYTXYTXGC 3'
 MER-2A: 5' ACTATTGGTCTSCGYGARACXTGG 3'
 MER-2B: 5' ACCATAGGTCTGCGYGARWSXTGG 3'
 MER-2C: 5' ACTATTGGTCTSCGYGARATHHTGG 3'
 UDI-1: 5' CCGTACATXTCSARRTCYTGXGC 3'
 UDI-2: 5' CCGTACATCTCSAGSTCRTGNGC 3'

cDNA Primer

A 20: 5' GGCCGCATGCCGACTAGTAC 3'
 G 20: 5' CCGATGGCTGGCATGCACCA 3'
 A 37: 5' GGCCGCATGCCGACTAGTACT₁₇ 3'
 G 34: 5' CCGATGGCTGGCATGCACCAC₁₄ 3'
 CD 5 RT: 5' TATAAGCTGCAGACACGGATCCAACGCGGG 3'
 CD 3 RT: 5' ATCCTCTTGAAAGGATCCTGCAGGACT₂₆VN 3'
 CD5: 5' TATAAGCTGCAGACACGGATCCA 3'
 CD3: 5' ATCCTCTTGAAAGGATCCTGCAGG 3'

Vektor-Primer

TOPO-T7: 5' TACGACTCACTATAGGGCGA 3'
 TOPO-M13: 5' CAGGAAACAGCTATGACCAT 3'

elp- Primer

EP6: 5' TCGGTTTGATCGTACTGTTC 3'
 EP13: 5' CCCGTGGTTGGGCTCCCGTT 3'
 EMCIS5: 5' GGGCTCCCGTTGATTGCAGTT 3'
 EM3: 5' AAAGTCAATCAACGGGA 3'
 EM5: 5' CACCCTGACCTTATTCGTCT 3'
 EM6: 5' ATCGTACTGTTCCCTTGCTGG 3'
 EM9: 5' TTAAACTTGTTCCCTGGGG 3'
 EM11: 5' CTGTGACTCAGCTGTAGTCA 3'
 EM13: 5' GATGCAGAAGGGCTCTTTGG 3'
 EM14: 5' TCGTCTGTTTTGCGTTGCTT 3'

EM15: 5' AATAAGGTCAGGGTGACTAC 3'
 EM16: 5' TTGCTGGTAATCAGTCGATC 3'
 EM19: 5' CGTTGGCAGTATTCTCAGCG 3'
 EM24: 5' GATGATGCTCCGCATAATCCA 3'
 EM29: 5' CAGTAGCCTCCTTGTITGAG 3'
 EM31: 5' TTCACTTCTCGTGAACAGTAG 3'
 PF18: 5' AACAGTTTGAGTCGATGTAG 3'
 PF66: 5' AAGTGAAGCCAAGGAA 3'

SL-Primer

EM-SL: 5' TCCTTACCTTGCAGTTTTGT 3'
 SLOLAP: 5' ACCTTGCAGTTTTGTATGAC 3'
 SL-ATG: 5' ACCTTGCAGTTTTGTATG 3'
 SLN2: 5' GGGTCAGCTCGTAGGCACAC 3'
 SLN3: 5' TTTGGCTGGTCCTTCGAGGG 3'
 SLN5: 5' TGCAGTTTTGTATGGTGAGT 3'
 SL5PR: 5' CACCGTTAATCGGTCCTTAC 3'

3 METHODEN

3.1 Kultivierung und Isolation von *E. multilocularis* Larvengewebe

Für diese Arbeit wurde Material der *E. multilocularis*-Isolate H95, K188 und T1 (Wildisolate aus Hohenheim, Kernten bzw. Tirol) eingesetzt. Das hier untersuchte Larvenmaterial von *E. granulosus* ist Teil humanen Operationsmaterials gewonnen an der Universität Hannover. Die Metazestoden von *E. multilocularis* werden kontinuierlich in mongolen Wüstenspringmäusen (*Meriones unguiculatus*) kultiviert. 8-10 Wochen alten Mäusen werden 0.5 ml homogenisiertes Parasitenmaterial in sterilem PBS injiziert. Das Heranreifen der Larven vollzieht sich über einen Zeitraum von 2 Monaten.

Das Larvengewebe wird mit Hilfe eines Skalpell unter möglichst sterilen Bedingungen entnommen und alle erkennbaren Gewebs- und Blutreste manuell entfernt bzw. mit PBS weggespült. Mit Hilfe des Kolbens einer sterilen 10 ml Spritze wird des Gewebes in einem sterilen Plastiksieb zerkleinert. Anschließend wird 3× mit PBS in einem 50 ml

Plastikfalkon gewaschen. Die Endmenge des Larvengewebes beträgt nach Abpipettierung des Überstandes ca. 5 ml.

3.2 Isolierung von DNA und RNA aus *E. multilocularis* Larvengewebe

3.2.1 RNA-Präparation

Es wird ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet. Alle verwendeten Glas- und Metallgegenstände werden vorher bei 240°C für 5 h erhitzt. Lösungen, Puffer und kleine Reaktionsgefäße werden über Nacht mit 0.1% DEPC versetzt und anschließend zweimal autoklaviert. Alle Einmalgebrauchsgegenstände werden nur aus ungeöffneten Verpackungen entnommen.

Die 5 ml homogenisierte Tumormasse wird in einem 50 ml Gemisch bestehend aus 4 M GITC mit 400 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen und anschließend im Ultraturax dreimal für jeweils 15 Sek. auf Eis zerkleinert. Das vor der Benutzung autoklavierte Messer des Ultraturax wird zwischen den Zerkleinerungsschritten jeweils mit GITC-Puffer und DEPC-Wasser gereinigt. Zur Scherung der genomischen DNA wird die Suspension dreimal durch eine 25 G und einmal durch eine 27 G Kanüle gezogen. Anschließend wird die Suspension für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und auf ein 3.5 ml 5.7 M Cäsiumchloridkissen in 12 ml Ultrazentrifugenröhrchen aufgetragen. Die Zentrifugation findet bei 32.000 rpm und 18°C für mindestens 16 h statt. Zur Gewinnung des RNA-Pellets wird unter sterilen Bedingungen mit einer Pasteurpipette ca. 5 ml des Überstandes, und danach der Rest mit einer neuen Pipette bis auf ca. 0.5 cm vor dem Boden abgezogen. Das restliche Cäsiumchlorid wird aus dem Röhrchen dekantiert, der Boden mit dem Pellet mit Hilfe eines sterilen Skalpell abgeschnitten und auf Eis gestellt. Das Pellet kann nun mit DEPC-Wasser resuspendiert und anschließend die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 6.0) und 2 Volumen eiskaltem 100%igem Ethanol über Nacht bei -80°C ausgefällt werden. Nach 30 minütiger Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4°C wird die RNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, danach bei 37°C getrocknet und in 200 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die quantitative und qualitative

Überprüfung der RNA erfolgt photometrisch bzw. über ein 1%iges denaturierendes RNA-Agarosegel. Die RNA wird bei -80°C gelagert.

3.2.2 Präparation chromosomaler DNA

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 wird aus dem Zwischenwirt isoliert (s.o.) und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert. Dieses wird in einer achtfachen Menge Tris/ NaCl/ EDTA- Puffer aufgenommen. Anschließend wird durch tropfenweise Zugabe von 20%igem SDS eine 0.5%ige SDS Konzentration in der Suspension hergestellt und für 15 Min 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, zweimal mit Phenol versetzt und anschließend bei RT gut geschüttelt und dann bei 14000rpm für 10 Min abzentrifugiert werden. Das gleiche Verfahren wird mit der oberen wäßrigen Phase nach Phasentrennung mit 1:1 Phenol/Chloroform und Chloroform/ Isoamylalkohol wiederholt. Dieser Schritt kann bei Bedarf wiederholt werden bis die Interphase verschwunden oder auf ein Minimum reduziert ist. Zur Fällung der chromosomalen DNA wird der wäßrige Überstand mit 2 Volumen eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt und für 30 Min. bei -80°C inkubiert. Um eine Scherung der ausgefällten DNA zu vermeiden, wird zunächst der Überstand abpipettiert und anschließend die sedimentierte DNA mit einer Pipette mit abgeschnittener Einmalspitze entnommen und bei 13000rpm und 4°C für 30 Min abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem 70%igem Ethanol kann das Pellet bei RT getrocknet und die DNA in Ampuwa- Wasser

resuspendiert werden. Als Kontrolle der DNA-Ebene wurde in dieser Arbeit eine PCR mit EM 10-15 und EM 10-16 durchgeführt (Amplifikat= 525 bp Fragmentes). Zur quantitativen Kontrolle kann die optische Dicht bei 260 und 280 nm bestimmt werden (s.u.). Die Qualität kann durch elektrophoretische Auftrennung der nicht verdauten und der *EcoRI* verdauten DNA im 0.4%igem Agarosegel abgeschätzt werden.

3.2.3 Präparation von Metazestoden RNA

Ca. 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 bei 15000 rpm für 5-10 Minuten zentrifugiert. Die RNA-Isolierung erfolgt mit Hilfe des *Rneasy Mini Kits* (Qiagen) nach entsprechendem Protokoll. Es wird in 30 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

3.2.4 Präparation von Protoskolex RNA

Das Tumorgewebe 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 etwa 50 Protoskolices erfolgt mit dem *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) nach entsprechendem Protokoll. Das finale RNA-Resuspensionsvolumen beträgt 30µl.

3.3 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 wobei:

1 OD₂₆₀ 50 µg/ml dsDNA,
 40 µg/ml ssDNA, ssRNA oder dsRNA bzw.
 30 µg/ml Oligonukleotiden entspricht

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.

3.4 Verfahren zur cDNA-Synthese

3.4.1 cDNA-Synthese nach dem SMART™ (switch mechanism at the 5' end of RNA) cDNA Synthese Protokoll (Clontech)

Dieses cDNA-Synthese-Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit für diverse Versuchsansätze besonders zur Charakterisierung genregulatorischer Sequenzen von *E. multilocularis elp* angewandt (4.1.1). Es wurde dabei nach dem hier beschriebenen Standardprotokoll vorgegangen.

Reverse Transkription

Aus 6 µg RNA, je 1 µl CD 3 RT- und CD 5 RT- Primer (10 µM) und der entsprechenden Menge an DEPC-H₂O wird ein 5 µl Gemisch erstellt, welches für 3 Min bei 72 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt wird. Nach diesem Schritt werden hinzugefügt:

2	µl	5 × First-strand Puffer
1	µl	DTT (20 mM)
1	µl	dNTPs (10 mM)
1	µl	MMLV reverse Transkriptase (Superscript II, Gibco)

Die reverse Transkription wird bei 42°C für 60 Min durchgeführt und der Ansatz nach Ablauf der Reaktion mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt.

cDNA-Synthese

Für einen 100 µl PCR-Ansatz werden folgende Komponenten gemischt:

2	µl	ssDNA
10	µl	10 × Puffer
6	µl	MgCl
2	µl	dNTPs (10 mM)
1	µl	CD 5-Primer (10 µM)
1	µl	CD 3-Primer (10 µM)
1	µl	Taq-Polymerase
77	µl	H ₂ O

Es wird über 20-30 Zyklen amplifiziert und zwar nach einminütiger Denaturierung bei 94°C für je 30 Sek bei 94°C und bei 65°C (Annealing) sowie für 3 Min bei 72°C (Elongation). Nach Ablauf des letzten Zyklus wird nochmals für 10 Min bei 72°C inkubiert, anschließend der Reaktionsansatz abgekühlt und das Produkt vor weiterer Verwendung mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt.

3.4.2 cDNA Synthese mittels Verwendung eines Oligo-(dT)-Primers und über die Konstruktion eines 5'-Poly-G-Endes

Die in diesem Verfahren hergestellte cDNA wurde zur Identifikation weiterer ERM-homologer Gene über PCR mit degenerativen Primern eingesetzt (4.3). Ähnlich wie bei der SMARTTMcDNA Synthese wird mit spezifischen Oligonukleotiden und hier zusätzlich durch Einsatz einer terminalen Transferase eine cDNA konstruiert, die am 5' bzw. am 3'-Ende je eine spezifische Sequenz aufweist (G20 bzw. A20).

Reverse Transkription

1.5 µg RNA werden auf 15.5 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und nach Zusatz von 1 µl A37-Primer (besteht aus 17 Thyminnukleotiden und einer 20 nt langen spezifischen Sequenz=A20) für 10 Min bei 70°C inkubiert, auf RT wieder abgekühlt und abzentrifugiert. Zu diesem Gemisch werden hinzugegeben:

2	µl	10 × RT-Puffer
1	µl	dNTPs (10mM)
0.5	µl	MMLV-Reverse Transkriptase (Stratagene)

Es wird 10 Min bei RT, zur Inaktivierung der reversen Transkriptase weitere 60 Min bei 37°C, 5 Min bei 90°C inkubiert und nach Ablauf der Reaktionen der Ansatz auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2.5 µl frisch angesetzter 5 M NaOH-Lösung wird erneut bei 55°C für 30 Min inkubiert und nach Versetzen des Ansatzes mit 72 µl 1%iger Essigsäure dieser mit Hilfe *des QIAquick PCR Purification Kits* gereinigt.

Konstruktion des 5'-Poly-G-Endes

Das 30 µl Eluat wird zusammen mit 8 µl 5 × tDT-Puffer, 1 µl dGTP (400 µM) (Stratagene) und 3.5 µl terminaler Transferase (Amersham) zur Verlängerung der Enden mit Guanosinnukleotiden 12 Min bei 37 °C und anschließend zur Enzyminaktivierung 10 Min bei 65°C inkubiert. Das Produkt wird aufgereinigt und die DNA mit 40 µl H₂O eluiert.

cDNA Synthese

Zur Konstruktion einer cDNA mit spezifischen Sequenzen an 5'-und 3'-Ende wird zunächst ein komplementärer Strang mit einem Primer, der an das 5'-Poly-G-Konstrukt bindet, synthetisiert. Hierfür wird folgendes Gemisch erstellt:

40	µl	ssDNA (Eluat der Vorreaktion)
5	µl	Taq-Puffer
1	µl	G 34-Primer (besteht aus 14 Cytosinnukleotide zur Bindung an das 5'-Poly-G-Konstrukt und einer 20 nt langen spezifischen Sequenz=G20)
3	µl	MgCl-Lösung
0.5	µl	Taq-Polymerase

Es wird nach folgendem Schema inkubiert:

60	Sek	94°C
40	Sek	42°C
40	Sek	52°C
40	Sek	62°C
15	Min	72°C

Anschließend wird der Ansatz aufgereinigt und die DNA in 50 µl H₂O resuspendiert. Die so konstruierte cDNA kann entweder direkt für eine PCR eingesetzt werden oder zur Steigerung der cDNA-Konzentration zunächst mit den spezifischen endständigen Primer G 20 am 5'- und A 20 am 3'-Ende nochmals amplifiziert werden. Hierzu wird folgender Reaktionsansatz erstellt:

10	µl	cDNA	
10	µl	Taq-Puffer	
6	µl	MgCl-Lösung	
1	µl	G 20-Primer (25 µM)	
1	µl	A 20-Primer (25 µM)	
0.5	µl	dNTPs (10 mM)	
0.5	µl	Taq-Polymerase	
71	µl	Ampuwa-Wasser	

Die PCR wird mit Mineralöl überschichtet und wie folgt inkubiert:

2	Min	94°C	
30	Sek	94°C	} 30x
30	Sek	67°C	
3	Min	72°C	
10	Min	72°C	

Vor der weiteren Verwendung wird das Produkt aufgereinigt.

3.5 PCR-Verfahren

3.5.1 PCR-Standardansatz

Für diese Arbeit wurden temperaturstabilen DNA-Polymerase (Clontech, Eurotec, Boehringer) sowie spezifischen Oligonukleotiden der Firma ARK Scientific zur Amplifikation verwendet. Die in-vitro-Amplifikation von DNA erfolgt im Thermocycler und gliedert sich in folgende Schritte:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| (1.) Denaturierung der DNA | 2-5 Min bei 94°C |
| (2.) Hybridisierung | 60 s bei der primerspezifischen <i>Annealing</i> -Temperatur |
| (3.) Extension/Polymerasereaktion | 60-120 s abhängig von der Fragmentgröße bei 72 °C |
- Wiederholung dieser drei Schritte 30 mal
- Final Extension: 600 s bei 72°C (abschließende Auffüllreaktion)

Die Annealingtemperatur richtet sich nach dem A/T- bzw. G/C- Nukleotidegehalt der Primer (2° für jedes A oder T und 4° für jedes G oder C des Primers; minus 2-4° der Endsumme). Sie soll eine möglichst optimale Bindung der Primer an die DNA ermöglichen und die Amplifikation von falschen Abschnitten durch unspezifische Bindung verhindern. Die Dauer der Polymerasereaktion richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. In 1 Min können DNA-Stränge von ca.1000 Nukleotiden Länge enzymatisch hergestellt werden. Zum Schutz vor Verdunstung wird der Reaktionsansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Im Anschluß an die Amplifikation wird das Die PCR-Produkte über den *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt.

PCR-Standardansatz (Gesamtvolumen 100 µl):

- DNA- Template (1 ng/ 100 µl)
- Oligonukleotid-Primer 0.5-1 µl (Konzentration: 25 bzw. 50 µM)
- DNA-Polymerase 1 µl (0.8-1 U/ 100 µl)
- Reaktionspuffer 10 µl (1/10 Vol. des Reaktionsansatzes)
- Magnesiumchlorid 6 µl (1 mM)
- H₂O Auffüllen des Reaktionsansatzes auf 100 µl

3.5.2 SMART™RACE (rapid amplification of cDNA ends) (Frohmann et al. 1988)

Für die Erststrangsynthese mit SMART™ wird ein modifizierter oligo (dT) Primer (CD3RT) verwendet, der neben 26 Thyminresten, die an den Poly-A-Schwanz der

mRNA binden, eine 26 Nukleotid lange, spezifische Sequenz aufweist. Die zur Synthese eingesetzte Reverse Transkriptase (MMLV-RT-Derivat, Superscript II, Gibco) besitzt, aufgrund einer bestehenden Punktmutation im Bereich der RNase H Aktivität des Enzyms, eine intrinsische Polynukleotidkinaseaktivität. Das heißt, sie addiert, wenn sie das Ende des mRNA Templates erreicht, an dessen 3'Ende 3-5 Cytosinnukleotide. Der CD5RT Primer, der neben einer spezifischen Sequenz am 3'Ende ein Guanin Triplet aufweist, kann im nächsten Schritt (Template Switch) an dieses dC-Ende des Erststranges binden und ermöglicht so die Synthese einer vollständigen cDNA Kopie der ursprünglichen RNA (siehe Abb.3). Das Resultat dieser Reaktion ist eine vollständige cDNA-Kopie der ursprünglichen RNA einschließlich der genauen und vollständigen 5' und 3' Sequenz, versehen mit zwei zusätzlichen, spezifischen endständigen Sequenzen (Bindestellen für CD3 bzw. CD5).

Das 5' bzw. des 3'Endes einer cDNA kann jetzt selektiv über PCR amplifiziert werden, indem zur Amplifikation ein interner Primer in Kombination mit CD3 bzw. CD5 eingesetzt wird. Für diese Reaktion wird folgendes Gemisch erstellt:

1-3	µl	cDNA (hergestellt nach dem SMART™cDNA Synthese Protokoll)
1	µl	CD3 bzw. CD5 (10µM)
1-5	µl	eines genspezifischen internen Primers (25-50µM)
0,5	µl	Taq-Polymerase
5	µl	10x Puffer
3	µl	MgCl
0,5	µl	dNTPs (10 mM)
→		mit H ₂ O auffüllen auf 50 µl

Die eingesetzten genspezifischen, internen Primer sollten 23-28 nt lang sein, einen G/C-Gehalt von 50-70% haben und ihre optimale Annealingtemperatur sollte mindestens $\geq 65^{\circ}\text{C}$ am besten $\geq 70^{\circ}\text{C}$ betragen. Die Amplifikation erfolgt nach demselben Protokoll, wie die cDNA-Synthese nach SMART™mit entsprechend angepaßter Annealingtemperatur.

3.5.3 Inverse PCR

In dieser Arbeit wurde zur Charakterisierung des Transkriptionsstartpunktes sowie der Polyadenylierungsstelle von *elp* eine modifizierte Form der 5'-bzw. 3'-RACE durchgeführt. Durch Herstellung einer zirkulären cDNA konnten beide Enden gleichzeitig amplifiziert werden (Jayagopala Reddy et al.,1991). Eine graphische Darstellung dieser Methode ist im Ergebnisteil unter 4.1.1 zu finden. Mit Hilfe der inversen PCR können unbekannte DNA-Abschnitte unter der Voraussetzung, daß geeignete Restriktionsenzymstellen vorhanden und ein Teil der DNA-Sequenz bekannt ist, amplifiziert werden. Die Methode beruht darauf, daß lineare Restriktionsfragmente, die sowohl eine bekannte als auch die unbekannte Sequenz beinhalten zu Ringen geschlossen werden. Diese können dann mit spezifischen Primern aus der bekannten Region, welche in Richtung unbekannte Region gerichtet sind vervielfältigt werden.

Für dieses Verfahren wurde eine cDNA nach dem SMART-Protokoll hergestellt. Die sich danach an den Enden befindenden Primersequenzen (CD3 und CD5) besitzen jeweils eine *Bam*-H1-Restriktionsenzymstelle, welche sich im Verlauf der gesuchten cDNA-Sequenz nicht wiederholt.

Restriktionsspaltung der DNA

In ein Reaktionsvolumen von 10-30 µl werden 1-2 Units Enzym pro µg DNA für den Verdau eingesetzt. Als Puffer werden nur die vom Hersteller beigefügten Puffer benutzt. Es sollte auf keinen Fall mehr als 1 µl Enzym pro 10 µl Ansatz verwendet werden, um die inhibitorische Wirkung des Enzympuffers vernachlässigen zu können. Der Ansatz wird für 3 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend zum Stoppen der Reaktion im Heizblock für 10 Min auf 65°C erhitzt. Das gespaltene Produkt wird über den *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und mit 30 µl H₂O eluiert.

DNA Ligation

Dem nach Restriktionsenzymsspaltung entstandenen Eluat werden zugesetzt:

2 µl T4-DNA-Ligase (1 U Ligase auf 20-50 µl)

- 4 μl 1 × Ligase-Puffer (NEB)
- 4 μl Ampuwa-Wasser

Die Ligation überlappender Enden (sticky ends) erfolgt über Nacht bei 16°C.

PCR

4 μl des Ligationsansatzes werden für die 30 μl PCR eingesetzt. Es wird über 30 Zyklen jeweils 1 Min bei 94°C, bei 65°C Annealingtemperatur und bei 72°C inkubiert.

3.5.4 Reverse Transkriptase- vermittelte Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Als sehr sensitive Methode wurde das *TitanTM One Tube RT-PCR System* (Boehringer) zur Herstellung von cDNA bei der Untersuchung der stadienspezifischen Expression der *elp*-Transkripte (4.2.5) eingesetzt. 3 μl des 30 μl Eluats der (Protoskolex bzw. Zysten) RNA-Präparation werden als Template eingesetzt.

50 μl Reaktionsansatz:

- 3 μl RNA-Template
- 10 μl 5 × RT-PCR Puffer mit Mg²⁺ (Endkonzentration 1.5 mM)
- 2.5 μl DTT-Lösung (Endkonzentration: 5mM)
- 2 μl dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP Endkonzentration: 0.2 mM)
- 0.5 μl Primer A (Endkonzentration: 0.5 μM)
(EM6 für Transkript A und SLOLAP für Transkript B)
- 0.5 μl Primer B (Endkonzentration: 0.5 μM)
(EP13)
- 1 μl Enzym-Mix
- 30.5 μl DEPC-H₂O

Über 30 Min wird bei 50°C im Thermocycler die reverse Transkription initiiert und durchgeführt. Anschließend wird bei 94°C das erste mal für 2 Min und in jedem darauffolgendem Zyklus für 45 Sek denaturiert. Ebenfalls für 45 Sek wird bei einer Annealingtemperatur von 54°C und anschließend bei 68°C für die Polymerasereaktion inkubiert. Im Anschluß an den letzten Zyklus wird eine Polymerase-Reaktionszeit von

10 Min eingehalten. Um quantitative Unterschiede der Genexpression besser beurteilen zu können, wurden in dieser Arbeit RT-PCRs verschiedener Zykluszahlen untersucht. Hierzu wurde die Reaktion nach der gewünschten Zykluszahl während der Elongationsphase angehalten, eine bestimmte Menge (10 µl) des Gemisches zum Aufrufen auf ein Gel vorsichtig entnommen und der Rest den noch folgenden Zyklen ausgesetzt.

3.5.5 PCR mit dem ExpandTM High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)

Dieses System eignet sich besonders zur Amplifikation langer DNA-Fragmente und wurde in dieser Arbeit eingesetzt zur Amplifikation der vollständigen etwa 2kb langen *elp* Transkripte A und B (4.1.1). Das Enzymgemisch aus thermostabiler Taq-Polymerase und Pwo DNA Polymerase mit 3'-5' Proofreading-Aktivität ermöglicht eine Vervielfältigung auch langer DNA Fragmente mit hoher Spezifität.

Es werden folgende Komponenten in zwei getrennten Ansätzen gemischt, um eine vorzeitige Interaktion zu vermeiden:

Gemisch I:

4	µl	dNTPs (Endkonzentration 200 µM)
2	µl	ssDNA (0.1-0.75 µg)
1	µl	Primer A (EP13 für Transkript A und SLOLAP für Transkript B)
1	µl	Primer B (PF18)
17	µl	H ₂ O

Gemisch II:

5	µl	10 × Expand HF Puffer mit 15 mM MgCl ₂
0.75	µl	HF PCR System Enzym-Mix
19.25	µl	H ₂ O

Nach Mischen der beiden Ansätze wird zunächst für 2 Min bei 94°C denaturiert. Anschließend wird über 30 Zyklen je 40 Sek bei 94°C und bei 52°C

Annealingtemperatur und danach für 3 Min bei 72°C inkubiert. Abschließend wird nochmals 7 Min auf 72°C erhitzt und der Ansatz vor der weiteren Verwendung aufgereinigt.

3.5.6 PCR mit degenerierten Primern

Um die Sequenz eines unbekanntes Gens zu amplifizieren, können degenerierte PCR-Primer aus den Sequenzdaten des Proteins rekonstruiert werden. Hierzu werden Proteinsequenzen des Gens von nahe verwandten Spezies im Proteinalignment miteinander verglichen und anhand dieses Vergleiches die Primer konstruiert. Da die meisten Aminosäuren von mehr als einem Codon codiert werden, werden möglichst Sequenzen verwendet, bei denen ein großer Teil der Aminosäuren von nur einem oder zwei Codons codiert werden (z.B. Met, Trp, Cys oder Asp) und diese unter den verglichenen Spezies hochhomolog sind. Bei der Verwendung eines Pools diverser degenerierten Primer ist die Konzentration des passenden Primers und somit auch die Effizienz der Amplifikation drastisch reduziert. Durch Konstruktion eines einzigen möglichen Primers über die am höchsten konservierte Sequenz kommt es hingegen häufig zu Fehlbindungen. Daher hat es sich als günstig erwiesen einen Primer zu konstruieren, der sowohl eine Region hoher Übereinstimmung sowie einen degenerierten Abschnitt enthält (Rose, T.M. et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Identifizierung weiterer ERM-homologer Gene von *E. multilocularis* PCRs nach dem Standard-PCR-Schema als 50 oder 100µl Ansatz mit degenerativen Primern durchgeführt. Die cDNA für diese PCR wurde mittels Oligo-(dT)-Primers (s.o.) aus RNA des Isolates H95 hergestellt. Die Reaktionen erfolgten bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen von 52-62°C. Für den ersten Satz degenerativer PCRs wurden Primer aus dem Bereich des membranbindenden Amino-Terminus eingesetzt. In diesem Bereich sind die Homologien zwischen den Spezies am größten (Mer1, Mer2 und Mer3 jeweils in Kombination mit dem stromabwärts bindenden Oligonukleotid UDI 1). Die ersten 3 Nukleotide von Mer 1- 3 sowie von UDI 1 sind nicht und die sich anschließenden Sequenzen in unterschiedlichem Maße degeneriert. In einem zweiten Satz degenerativer PCRs wurde ein neuer Satz Primer (

Mer2a-c und UDI2) eingesetzt, die weniger degeneriert und deren degenerierte Nukleotide mehr auf das 3' Ende der Primersequenz beschränkt sind.

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden in einem PAA-Gel oder einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und Fragmente mit entsprechender Größe entweder direkt aus dem Gel isoliert oder die PCR kloniert.

3.5.7 Kompetitive PCR

Die hohe Empfindlichkeit der PCR eignet sich besonders zur quantitativen Messung von Gendosen und Genexpressionsstärken. In dieser Arbeit wurde die kompetitive PCR zur genauen quantitativen Analyse der Expressionsverhältnisse der *elp*-Transkripte A und B eingesetzt (4.2.5.2). Die PCR wurde nach dem bereits beschriebenen Verfahren durchgeführt (Diviacco et al., 1992, Jayagopala Reddy et al., 1996). Bei der Methode werden zwei DNA-Moleküle, die bis auf einen kurzen Sequenzabschnitt identisch sind, im selben Reaktionsansatz amplifiziert, wodurch sie als Template fungierend zu „Kompetitoren“ werden. Zum einen wird in diesem Versuchsansatz Transkript A bzw. B mit spezifischen Primern amplifiziert, zum anderen der so genannte Kompetitor, eine zuvor konstruiertes DNA-Fragment, das neben dem spezifischen 5'-Ende von Transkript A bzw. B, das 74 bp lange Intron II von *elp* beinhaltet und somit im Agarosegel gut vom ersten Amplifikat unterschieden werden kann. Der Kompetitor wird in fest definierter Menge zum Reaktionsansatz gegeben, was die quantitative Beurteilung der PCR-Amplifikation ermöglicht.

Für das cis- und das trans-gespleißte *elp* Transkript wurde ein Kompetitor wie folgt konstruiert: durch overlap extension eines per PCR amplifizierten chromosomalen und eines cDNA Fragmentes von *elp* (Horton et al., 1989) wurde ein 584-bp-Fragment konstruiert, welches flankiert ist durch die Primersequenzen von EMCIS5-spezifisch für Exon I am 5'-Ende- und EM6 am 3' Ende. Aufgrund der Existenz von *elp* Intron II (und Nichtexistenz des 5'-Introns und des Intron I) in diesem Sequenzabschnitt, ist dieses konstruierte Fragment 74 bp länger als ein mit denselben Primern amplifiziertes cDNA-Fragment einer konventionell gespleißte mRNA. Mit Hilfe weiterer overlap extensions wurde das Oligonukleotid EM-SL, spezifisch für den SL bei *elp*, fusioniert mit EMCIS5

oberhalb des Fragmentes. Das hieraus resultierende Fragment für EM-SL und EM6 ist 94 bp länger als das korrespondierende Fragment der trans-gespleißten *elp*-mRNA.

Die PCRs wurden nach dem Standard-PCR-Protokoll in einem 50 µl Ansatz, über 30 Zyklen, bei 54°C Annealingtemperatur durchgeführt. Die eingesetzte cDNA wurde nach dem SMART™ cDNA-Synthese Protokoll erstellt.

Die Fusions-PCR bei overlap extension wurde wie folgt durchgeführt:

Die beiden PCR- Ansätze werden über den *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt in 30 µl H₂O resuspendiert. Es werden gemischt:

5	µl	je PCR-Ansatz
2	µl	10 × Puffer
1.2	µl	MgCl
1	µl	dNTPs (10 mM)
0.5	µl	Taq-Polymerase
5.3	µl	H ₂ O

Nach 2 Min bei 94°C, 5 Min bei 60°C und 5 Min bei 72°C werden dem Ansatz folgende Komponenten zugefügt:

8	µl	10 × Puffer
4.8	µl	MgCl
1	µl	5' Primer (EM-SL bzw. EMCIS5)
1	µl	3' Primer (EM6)
65.2	µl	H ₂ O

Es folgt eine Amplifikation über 30 Zyklen.

Zur Eliminierung falscher Amplifikate wird das Produkt mit dem *TOPO-TA Cloning Kit* kloniert. Die entsprechenden Klone bzw. Inserts werden isoliert, sequenziert, als 100 µl Standard PCR nochmals mit den entsprechenden endständigen Primern amplifiziert und anschließend über die Messung der OD₂₆₀ im Photometer die Konzentration und rechnerisch die Molekülmenge pro mol und µl ermittelt. Von dem so konstruierten Kompetitor wird eine Verdünnungsreihe mit definierten Mengen erstellt und für die kompetitive PCR einzusetzen.

Kompetitive PCR

Um eine gute Durchmischung der PCR-Komponenten zu erreichen werden zwei Ansätze gemischt:

Mix A:1	μl	cDNA
1	μl	Kompetitor in definierter Verdünnung
Mix B:3	μl	10 × Puffer
1.8	μl	MgCl
0.5	μl	dNTPs (10 mM)
0.5	μl	Taq-Polymerase
0.5	μl	Primer A (EMCIS5 für Transkript A und EM-SL für Transkript B)
0.5	μl	Primer B (EM6)
21.2	μl	H ₂ O

Nach sorgfältiger Vermengung dieser beiden Ansätze wird nach folgendem Schema inkubiert:

1	Min	94°C	
1	Min	94°C	} x 30
1	Min	57°C	
1	Min	72°C	
10	Min	72°C	

Die Amplifikate werden in einem 2%igem Agarosegel elektrophoretische aufgetrennt.

3.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten

3.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten von ca. 0.5-15 kb kann in Abhängigkeit von der Größe der Fragmente in unterschiedlich konzentrierten Agarosegelen (0.7-2 %) erfolgen. Je höher die Agarosekonzentration desto besser ist die Auftrennung für kleinere DNA-Fragmente. Standardgele in der Arbeit haben eine Agarosekonzentration von 1 %.

Für ein 1%iges Standard-Agarosegel werden 1.2 g Agarose mit 120 ml TEA-Puffer gemischt und über dem Bunsenbrenner zum Kochen gebracht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C (Handwärme) wird die Lösung auf den horizontalen Gelträger gegossen. Die zu untersuchenden Proben werden vor dem Auftragen zur Beurteilung der Lauffront mit einem 0.25% bromphenolhaltigen 6 × Puffer gemischt. Als Marker werden entweder der 1-kb-DNA Ladder oder der SMART-Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei 100-200 V, in einem Bad aus 1 × TEA-Puffer, bei RT. Das Gel wird für 10 Min in einer 2 mg/l Ethidiumbromidlösung entwickelt und anschließend unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und photographiert.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen

Die Isolierung von amplifizierten DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen erfolgt über den *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). Eine Extraktion von DNA aus Agarosegelen wird mit Hilfe des *QiaGel Extraction Kit* (Qiagen) vorgenommen. Beide Isolierungsverfahren basieren auf einer selektiven Bindung von DNA an Silikagel-Membranen in Anionenaustauschsäulen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen.

3.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

8	g	Harnstoff (8M)
8.5	ml	H ₂ O
2	ml	10 × TBE-Puffer
3	ml	PAA (40 %)
140	µl	APS (16 %)

Das Gemisch wird filtriert, durch Zugabe von 20 µl TEMED die Polymerisierung gestartet und luftblasenfrei in eine Vertikalapparatur mit einem Glasplattenabstand von

1 mm gegossen. Die Glasplatten müssen vor der Nutzung von beiden Seiten sorgfältig mit Spülmittel gereinigt, danach mit destilliertem Wasser abgespült und abschließend mit 70 %igem Ethanol behandelt werden. Der Kamm wird zwischen die Glasplatten eingesetzt und das Gel zur Auspolymerisierung ca. 1 h stehen gelassen. Nach Entfernung des Kammes wird das Gel in eine Kammer mit $1 \times$ TBE-Puffer eingebunden, die Taschen mit der Pufferlösung ausgespült und die Proben nach Mischung mit dem Bromphenolblau-haltigen Puffer aufgetragen. Die Bromphenolblaupufferfront läuft im PAA-Gel mit den 50 bp-DNA-Fragmenten auf einer Höhe. Die Elektrophorese erfolgt bei RT und 190 V Spannung.

Silberfärbung der PAA-Gele

Die Silberfärbung ermöglicht durch Reduktion von Silberionen in metallisches Silber unter alkalischen Bedingungen und unter Verwendung von Formaldehyd den sehr sensitiven Nachweis von bis zu 1 pg/mm^2 DNA im Gel. Hierzu wird zunächst für 20 Min unter leichtem Schwenken in 20%iger Essigsäure fixiert, anschließend 3×2 Min mit H_2O gewaschen und nach 30 minütiger Imprägnierung in einer Lösung aus AgNO_3 (1g/l) mit 1.5 ml Formaldehyd/l erneut für 20 Sek kurz mit H_2O gewaschen. Die Entwicklung des Gels erfolgt in einer frisch angesetzten Lösung bestehend aus 30 g/l Na_2CO_3 , 1.5 ml Formaldehyd/l und 2 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$. Zum Abstoppen der Reaktion nach 2-5 Min wird das Gel in 10%ige Essigsäure gelegt. Zur genauen Beurteilung der Bandenmuster kann das Gel auf einem Lichtkasten betrachtet werden. Die Gele können entweder auf Glasplatten abgedeckt mit Klarsichtfolie oder zwischen zwei Blättern Einmachfolie gelagert.

Isolierung von DNA aus PAA-Gelen

Spezifische Banden können aus dem PAA-Gel mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten und per PCR direkt amplifiziert werden. Ungefähr die Hälfte einer mittelstarken Bandenbreite wird als Template für einen Standard-PCP-Ansatz eingesetzt. Sollte diese Form der Bandenisolierung vermehrt eingesetzt werden, so empfiehlt sich die Verwendung niedrigprozentigerer PAA-Gele und das Ausschneiden möglichst kleiner Gelabschnitte, da der Harnstoff sich unter Umständen irritierend auf den Ablauf der PCR auswirken kann.

3.6.3 Marker für die Gelelektrophorese

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

	Bandengröße (in kb)		Bandengröße (in kb)	ng/Bande
1kb Marker	3000	SMART- Ladder	10000	100
	2000		8000	80
	1600		6000	60
	1000		5000	50
	519		4000	40
	506		3000	30
	396		2500	25
	344		2000	20
	298		1500	15
	220		1000	100
	201		800	80
	154		600	60
	134		400	40
			200	20

3.7 Automatisierte DNA Sequenzierung

Sequenzieransatz:

0.4 µg gereinigte Plasmid-DNA

oder

0.1 µg gereinigtes PCR-Produkt

5-10 pmol Sequenzierungsprimer

2 µl Sequenziergemisch

mit ddH₂O auffüllen auf 10µl

Die DNA Sequenzierung erfolgt mit dem automatischen Sequenziergerät „ABI Prism™ Sequencer 377“ (Perkin Elmer) nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977). Nach der Denaturierung der DNA bei 96°C für 10 Sek 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. Gleichzeitig mit dem 4 Min dauernden Prozeß der DNA-Synthese erfolgt bei 60°C auch die Markierung der DNA-Fragmente. Anschließend werden die Reaktionsansätze gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und bei 90°C für 2 Min denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsansätze 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.

3.8 Klonierungen

3.8.1 Klonierung mit dem TOPO TA Cloning® Kit

Die meisten Klonierung in dieser Arbeit wurden mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) durchgeführt. Folgende Komponenten werden hierbei gemischt, für 5 Min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gestellt:

0.5-2 µl PCR-Produkt
1 µl PCR®-TOPO Vector
→ auf 4 µl mit H₂O auffüllen

One Shot™ Transformationsreaktion:

Die One Shot Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl 0.5 M β-Mercaptoethanol versetzt und nach Zugabe von 2 µl des Klonierungsansatzes vorsichtig gemischt und 30 Min auf Eis gestellt. Anschließend werden die Zellen bei 42°C für 30 Sek hitzeschockiert, für 2 Min auf Eis gestellt und mit 250 µl SOC-Medium (RT) aufgefüllt. Als solches wird die Zellsuspension bei 37°C im Schüttler inkubiert. Wird anschließend auf Kanamycinplatten (50 µg/ml) ausplattiert (100 µl eines Ansatzes je Platte) beträgt die Inkubationszeit im Schüttler 60 Min. Bei der Verwendung von Ampicillinplatten (100 µg/ml) 30 Min. Die Platten werden vor Ausplattierung mit einem Gemisch aus 35 µl X-Gal, 20 µl IPTG und 50 µl LB-Medium behandelt. Die beimpften Platten werden im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Die heranwachsenden weißen Klone beinhalten das Plasmid die blauen nicht.

3.8.2 Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂ Methode (Dagert und Ehrlich, 1979)

50 ml LB-Medium werden mit 350 µl einer 5 ml LB E. coli Übernachtskultur versetzt und dann bei 37°C für 2.5-3 Stunden im Schüttler zur Überführung der Bakterien in die Log-Phase inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.4-0.5 wird die Kultur 10 Min auf Eis abgekühlt, auf zwei sterile Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 8000 rpm und 4°C für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand kann nun abpipettiert und das Bakteriensediment vorsichtig mit eiskaltem 100 mM CaCl₂ (20 ml je Röhrchen) resuspendiert werden. Anschließend wird erneut bei 4°C und 6000 rpm für 15 Min zentrifugiert, der Überstand dekantiert, erneut CaCl₂ (2.5 ml je Röhrchen) zugefügt und das Gemisch für mindestens 3 h auf Eis gestellt. Nach Ablauf der Mindestzeit wird der Suspension 1/3 Volumen 100%iges eiskaltes Glycerin zugegeben. Die Bakterien können jetzt auf Trockeneis gelagert in Aliquots zu je 200 µl abgefüllt und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

3.8.3 Mini-Plasmidpräparation (Birnboim und Doly, 1979)

Lösung A: 10 mM EDTA
25 mM Tris-HCl
50 mM Glukose
10 mg RNase
pH 8

Lösung B: 200 mM NaOH
1 % SDS

Lösung C: 2 M Essigsäure
3 M Kaliumacetat

Die Mini-Plasmidpräparation erlaubt eine schnelle Überprüfung einer großen Menge rekombinanter Kolonien und wurde in dieser Arbeit bei verschiedenen Versuchen zur kurzfristigen Überprüfung von Klonen durchgeführt. Hierzu werden zunächst die entsprechenden Klone mit Hilfe einer Pipettenspitze von der über Nacht inkubierten Platte in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Flüssigmedium und 10 µl einer 25 mg/ml Stammlösung Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) oder Ampicillin überführt und erneut über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Ansätze werden anschließend portionsweise in 1.5 ml Eppendorfbehälter gefüllt, bei 15000 rpm für 5 Min zentrifugiert und der Überstand nach jedem Zentrifugationsschritt dekantiert. Zur Porenbildung in der Zellmembran erfolgt eine Resuspension des Pellets in 100 µl Lösung A und nach Zugabe von 200 µl der frisch angesetzten Lösung B wird die Lösung 5 Min bei RT stengelassen. Anschließend werden 150 µl der Lösung C hinzugefügt, 10 Min auf Eis gekühlt und 15 Min bei 15000 rpm die Nicht-DNA-Bestandteile abzentrifugiert. Der die DNA-Plasmide enthaltende Überstand wird auf die doppelte Menge mit eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt, 30 Min bei -70°C inkubiert und 15 Min bei 15000 rpm (RT) zentrifugiert. Unter gleichen Bedingungen wird noch ein weiteres mal für 7 Min zentrifugiert, nachdem der Überstand dekantiert und das doppelte Volumen 70%igen Ethanols hinzugefügt wurde. Die so isolierte und gereinigten DNA-Plasmide können nun für 5-10 Min in der Speed-vac getrocknet und schließlich in 20 µl H₂O resuspendiert werden.

3.9 DNA-Markierung und Nachweis mit Digoxigenin

Der *DIG-DNA Labeling Kit- random primed* (Boehringer) ermöglicht eine nicht-radioaktive Markierung von DNA. Anstelle normaler dNTPs wird ein dNTP-Markierungsgemisch (1mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM Dig-11-dUTP) für die PCR eingesetzt. Über einen Zeitraum von einer Stunde wird jedes 20. bis 25. Nukleotid der neu synthetisierten DNA ein DIG-dUTP. Diese Dichte von DIG-dUTP in der DNA ermöglicht eine hoch sensitive Nachweisreaktion. In vorliegenden Arbeit wurde nach diesem Verfahren eine *elp*-spezifische DIG-markierte Sonde hergestellt.

Für die Reaktion werden 10 ng- 3 µg gereinigte, lineare DNA –hier 15µl eines aufgereinigten *elp*-spezifischen PCR-Fragmentes amplifiziert mit den Primern EP6 und EM15- mit H₂O auf 15 µl aufgefüllt, bei 95°C für 10 Min hitzedenaturiert und danach auf Eis gestellt. Anschließend wird die denaturierte DNA-Lösung mit folgenden Komponenten gemischt:

2	µl	Hexanukleotidgemisch
2	µl	dNTP-Markierungsgemisch
1	µl	Klenow-Enzym

Für mindestens 1 h besser über Nacht wird der Ansatz bei 37°C im Brutkasten inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 2 µl EDTA-Lösung (0.2 M, pH8) gestoppt und anschließend das Gemisch zur DNA-Fällung (mind. 30 Min bei -70°C) mit 2.5 µl 3 M Na-Acetat (pH4.5) und 75 µl eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt. Es bildet sich ein Niederschlag, der mit 70%igem Ethanol (500µl) gewaschen bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert und schließlich im Vakuum getrocknet wird. Die DIG-markierte DNA wird in 50 µl H₂O resuspendiert und kann bis zu 6 mal zur Markierung eingesetzt werden. Zur Überprüfung der Markierungsreaktion sollte die Sonde im Dot Blot mit einer DIG-markierten Kontroll-DNA verglichen werden. Der Nachweis erfolgt dann wie unter 3.9.1 beschrieben.

3.9.1 Dot Blot und immunologischer Digoxigenin-Nachweis

Maleinsäurepuffer

0.1	M	Maleinsäure, pH7.5
0.15	M	NaCl

Ein Dot Blot ermöglicht als sehr sensitives Verfahren den Nachweis geringen Mengen PCR-Produkt und damit die Beurteilung von Mengenverhältnissen amplifizierter Fragmente. In dieser Arbeit wurde der Dot Blot zur Analyse der isolatspezifischen Expression von cis- zu trans-gespleißtem *elp* durchgeführt (4.2.4.2). Zur Markierung der PCR-Amplifikate wurden DIG-markierte dNTPs in der Reaktion eingesetzt. Die PCR wurde nach dem Standard-PCR-Protokoll mit den Oligonukleotiden EP6 und EP13 für das cis-gespleißte Transkript A und EP6 und SLATG für das trans-gespleißte Transkript B, bei einer Annealingtemperatur von 53°C durchgeführt. Als Template für die Reaktion wurde cDNA der Isolate H95, K188 und T1 in verschiedenen Verdünnungen (1/100 und 1/1000) eingesetzt und über 10 bzw. 12 bzw. 15 Zyklen amplifiziert.

Digoxigenin-Nachweis

Digoxigenin ist über eine Alkali-labile Esterbindung an das eingebaute dUTP gebunden und kann mit Hilfe einer Anti-DIG-Antikörperlösung nachgewiesen werden. Hierzu werden von den PCR-Produkten und einem speziellen DIG-markierten Marker je 1 µl auf die Nylonmembran aufgetragen. Die markierte DNA wird bei 100 mJ mit der Membran UV-vernetzt und mit folgenden Lösungen gewaschen.

1-5	Min	Waschpuffer – Maleinsäurepuffer mit 0.3 % Tween [®] 20
30	Min	Puffer 2 – 1 % Blockierungsreagenz in Maleinsäure
30	Min	1:10000 verdünnte Anti-DIG-AP-Antikörper gelöst in Puffer 2
2 ×		
15	Min	Waschpuffer
5	Min	Puffer 3 – 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5 und 0.1 M NaCl
5	Min	CSPD [®] in Puffer 3 im Verhältnis 1:100

Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch den Puffer 2, können die zugegebenen Anti-Digoxigenin-Antikörper an die markierten DNA-Abschnitte binden. Diese Antikörper besitzen eine integrierte Alkalische Phosphatase mit Hilfe derer das Chemilumineszenzsubstrat CSPD[®] dephosphoryliert werden kann. Durch diese enzymatische Reaktion kommt es zur Lichtemission mit einem Maximum bei 477 nm nach 6 h. Diese Lichtemission kann durch Auflegen eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht werden.

3.9.2 DNA Hybridisierung

In einer Hybridisierungsreaktion kommt es zur Bindung zwischen zwei einsträngigen Nukleinsäuresträngen aufgrund von Basenpaarwechselwirkungen zwischen komplementären Sequenzen. Diese Bindungen können erfolgen zwischen zwei DNA, zwei RNA oder auch einem DNA und einem RNA Strang. Die entsprechenden Verfahren, die basierend auf diesem Phänomen entwickelt wurden und durch die es möglich ist mit sehr hoher Spezifität und Sensitivität DNA-Fragmente zu identifizieren, wurden Northern bzw. Southern Blot benannt (Southern, 1975).

3.9.3 DNA-Nachweis über Hybridisierung mit einer DIG-markierter DNA-Sonde

20 × SSC	3	M	NaCl
	0.3	M	Na-Citrat
	pH	7.0	
Lösung 1: 0.25		M	HCl
Lösung 2: 0.5 M			NaOH
	1.5	M	NaCl
Lösung 3: 1		M	Tris (pH7.5)
	3	M	NaCl

Dieses Verfahren wurde zum Nachweis stadienspezifischer Expressionsunterschiede der *elp* Transkripte durchgeführt (4.2.5.1). Die zu analysierenden Transkripte wurden per

RT-PCR wie unter 3.5.4 in Material und Methoden beschrieben amplifiziert und in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt.

Das Gel wurde anschließend mit folgenden Lösungen behandelt:

Lösung 1: 15 Min, danach kurz mit Ampuwa-Wasser spülen → Depurinierung

Lösung 2: 30 Min, danach kurz mit Ampuwa-Wasser spülen → Denaturierung

Lösung 3: 2 × 30 Min, danach kurz mit Ampuwa-Wasser spülen → Neutralisierung

Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgt über Nacht in 20 × SSC über eine Brücke aus Whatmanpaper (3 mm, 6-7 Schichten), die auf die Größe des Gels und der Nylonmembran zugeschnitten sind und einer ca. 10 cm hohen Schicht aus zugeschnittenem Zellstoff.

Am nächsten Tag wird die Nylonmembran entnommen, kurz an der Luft getrocknet und eine stringente Wäsche durchgeführt.

Stringente Wäsche:

2 × 5 Min bei RT Waschpuffer 1 – 2 × SSC und 0.1 % SDS

2 × 15 Min bei 68°C Waschpuffer 2 – 0.1 × SSC und 0.1 % SDS

Zur Fixierung wird die DNA mit 100 mJ UV-venetzt.

DNA-Hybridisierung

Der Blot wird mit 10 ml Hybridisierungslösung (*DIG-Easy-Hyb*) bei 65°C 45-60 Min zur Absättigung freier Bindungsstellen vorhybridisiert. Währenddessen werden weitere 10 ml Hybridisierungslösung auf die gleiche Temperatur erwärmt, die DIG-markierte DNA-Sonde 10 Min bei 96°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. 100 ng der Sonde werden zu der vorgewärmten Hybridisierungslösung und nach Abkippen der Vorhybridisierungslösung zu dem Blot gegeben. Es wird über Nacht bei 65°C hybridisiert. Nach erfolgter Hybridisierung wird erneut eine stringente Wäsche zum Lösen aller unspezifischer Bindungen und anschließend der Digoxigenin-Nachweis mit CSPD[®] durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung genregulatorischer Sequenzen von *E. multilocularis elp*

4.1.1 Charakterisierung des Transkriptionsstartpunkts und der Polyadenylierungsstelle

In verschiedenen Arbeitsgruppen konnte unabhängig voneinander eine cDNA-Sequenz charakterisiert werden, die für das immundominante Protein Elp von *E. multilocularis* kodiert (Frosch et al., 1991; Hemmings und McManus, 1991; Felleisen & Gottstein, 1993). Auch die genomische Sequenz des gesamten *elp*-Lokus konnte bestimmt werden und das entsprechende Protein sowohl in der Keimschicht und dem Tegument der Metazestode als auch beim adulten Wurm nachgewiesen werden (Brehm et al., 1998; Felleisen & Gottstein, 1993; Frosch et al., 1991) (siehe Abb.2). Um Promotorstrukturen von *elp* zu charakterisieren wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der exakte Transkriptionsstartpunkt sowie die genaue Polyadenylierungsstelle für *elp* bestimmt.

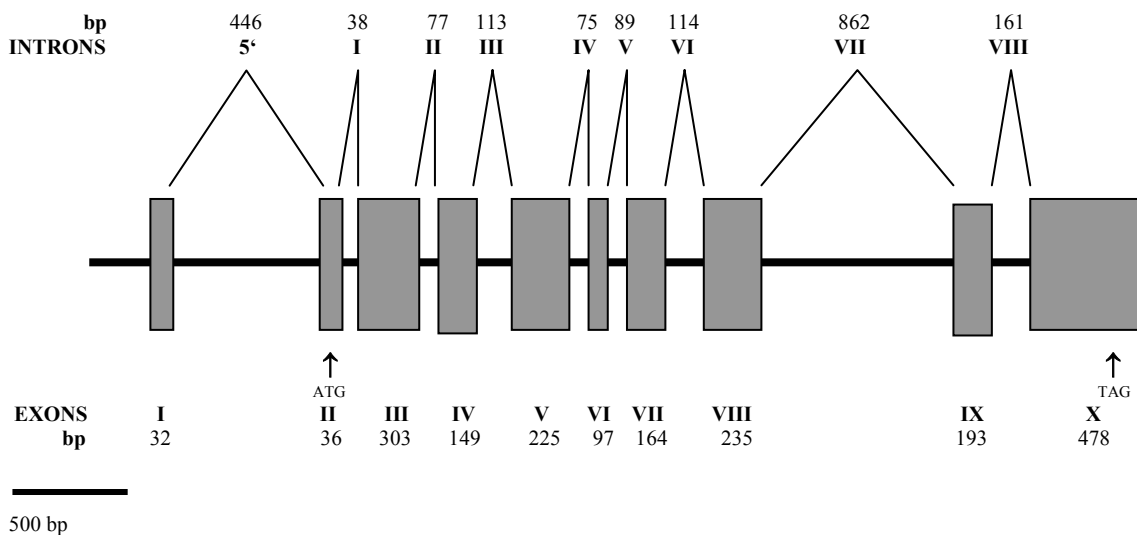


Abb.2: **Chromosomaler Aufbau des *E. multilocularis elp* Lokus.** Die Exons (I– X) sind als graue Boxen dargestellt und die Größe eines jeden Exons (in bp) angegeben. Das ATG- Start- und TAG- Stopcodon der kodierenden Region von *elp* in den Exons II und X sind durch Pfeile (↑) markiert. Die Introns (5' und I- VIII), deren Größen oberhalb der Abbildung (in bp) aufgeführt sind, werden durch die schwarze Linie repräsentiert.

Aus Wüstenspringmäusen passagiertes Larvenmaterial, welches sowohl Metazestoden- als auch Protoskolexgewebe von *E. multilocularis* beinhaltet (Isolate H95, K188 und T1), wurde Gesamt-RNA extrahiert. Hieraus wurde nach dem SMARTTM PCR cDNA Syntheseprotokoll cDNA für den Einsatz in einer 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) hergestellt. In dieser Arbeit wurde die RACE, wie in Abb. 3 dargestellt, als inverse PCR durchgeführt, was die gleichzeitige Bestimmung von 5' und 3'Ende der mRNA erlaubt (Reddy et al., 1991).

Zur genauen Kartierung von 5' und auch 3'-Ende von *elp* wurde zur Erststrangsynthese mit SMARTTM ein modifizierter oligo (dT) Primer (CD3RT) verwendet, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden kann und eine zusätzliche spezifische Sequenz (26 nt) aufweist. Durch Einsatz einer reversen Transkriptase mit intrinsischer Polynukleotidkinaseaktivität werden an das 5'Ende 3-5 Cytosinreste addiert. Der CD5RT Primer, der neben einer spezifischen Sequenz (mit *Bam*H1-Schnittstelle) am 3'Ende ein Guanin Triplet aufweist, kann im nächsten Schritt an dieses dC-Ende des Erststranges binden und ermöglicht so die Synthese einer vollständigen cDNA Kopie der ursprünglichen RNA. Über die so konstruierten, spezifischen endständigen Sequenzen kann die cDNA mit Hilfe entsprechender Oligonukleotide (CD3 und CD5) per PCR amplifiziert (siehe Material und Methoden) und mit *Bam* H1 gespalten werden. Schnittstellen für dieses Enzym befinden sich im Bereich der endständigen Sequenzen (CD3 und CD5) nicht jedoch innerhalb der mRNA. Anschließend wurde in großem Volumen relegiert, so daß zirkuläre cDNA Konstrukte entstehen, mit denen als Template im Zuge einer inversen PCR 3' und 5'Ende erneut amplifiziert wurden.

Die inverse PCR wurde mit den Primerkombinationen EM3×PF66 und EM11×PF66 durchgeführt (siehe Abb. 3 und Anhang). EM3 bindet unmittelbar stromaufwärts des 5' Introns und EM11 12 bp stromabwärts vom Intron I (siehe Abb.2). PF 66 bindet am 3' Ende der cDNA etwa 480 bp oberhalb des vermuteten 3'- Endes der *elp*- Sequenz. Die PCR Fragmente wurden mit Hilfe des TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) in *E. coli* kloniert, mehrere Klone isoliert und diese auf ihre Insertgröße hin überprüft. Repräsentative Klone mit der entsprechenden Fragmentgröße wurden ausgewählt und sequenziert.

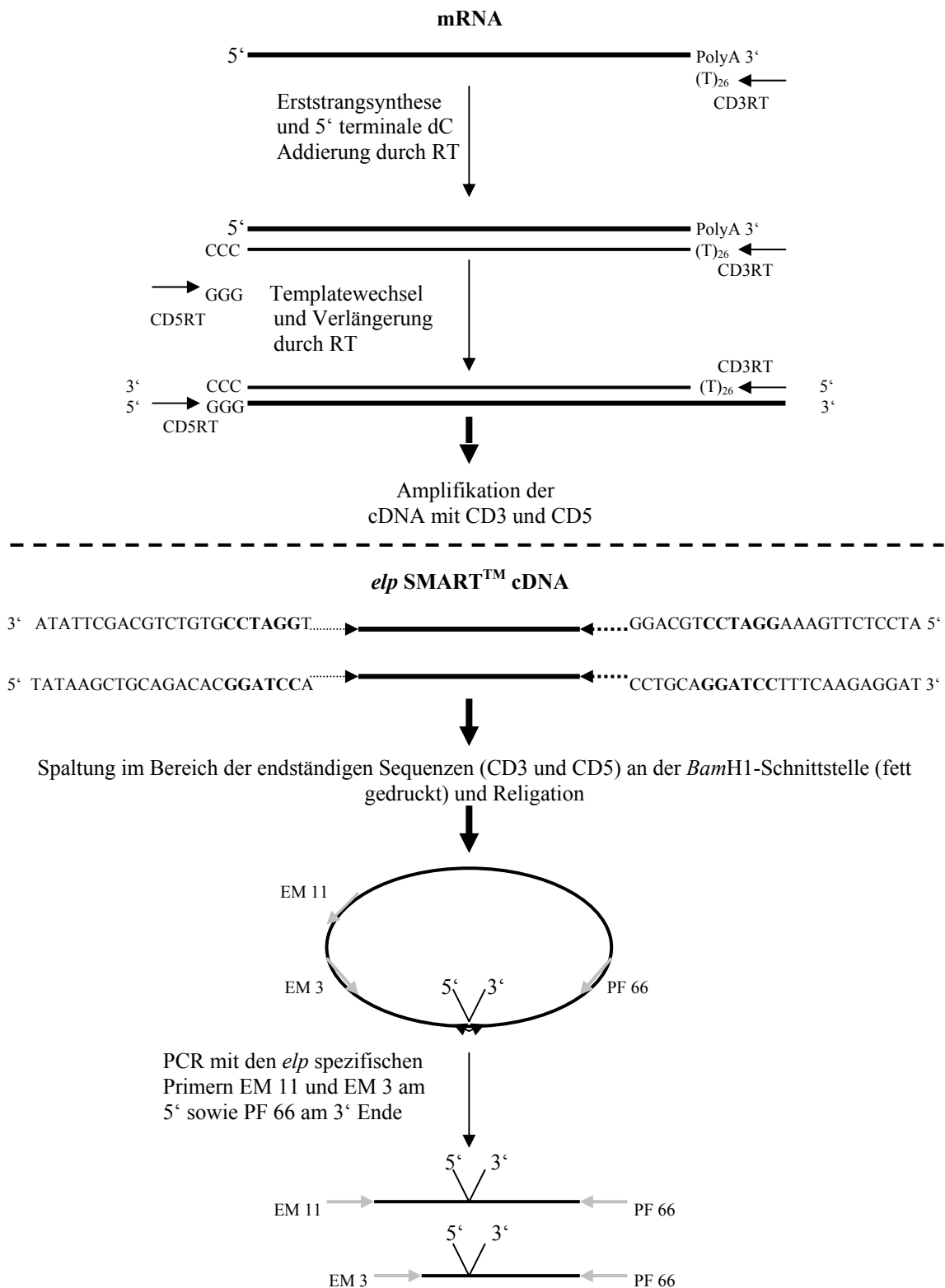


Abb.3: Schematische Darstellung der SMART™ Methode zur cDNA Synthese und der 5'RACE am Beispiel von *elp*. Die cDNA Synthesepriemer werden durch schwarze Pfeile (→ = CD5RT und CD3RT) bzw. dünn gestrichelte (.....→ = CD5) und dick gestrichelte (.....→ = CD3) Pfeile repräsentiert. Die grauen Pfeile stellen

die *elp* spezifischen Primer für die 5'RACE dar (→ = EM3, EM11 und PF66). Die genaue Lokalisation der *elp* spezifischen Primern ist dem Text bzw. der *elp* Sequenzdarstellung im Anhang zu entnehmen.

Auf diese Weise konnte in allen untersuchten Klonen die 3' Poly-A-Schwanz Initiationssequenz von *elp* 191 bp stromabwärts des TAG-Stop-Codons lokalisiert werden. 17 bp oberhalb dieses Poly-A-Startpunktes befindet sich eine mögliche Polyadenylierungssignalsequenz (ATTAAA). Auf chromosomaler Ebene weist die Sequenz stromabwärts des Poly-A-Startpunktes ein GT-reiches Signal auf. Hierbei handelt es sich um generelle Merkmale zur effizienten Polyadenylierung und Spaltung bei eukaryontischen mRNAs (Chen & Wilusz, 1998).

Der Transkriptionsstartpunkt konnte 487 bp stromaufwärts des ATG-Translationsstartpunktes bzw. 32 bp oberhalb des 5' Introns bestimmt werden. Die Anwesenheit eines zusätzlichen Guanosinnukleotids am Ende jeder sequenzierten cDNA bestätigte deren Vollständigkeit. Dieser Guanosinrest ist nicht auf der chromosomalen Sequenz zu finden und daher ist davon auszugehen, daß es sich hierbei um ein RACE-Produkt handelt, welches sich von dem m⁷G-Cap ableitet. Ein solches Cap befindet sich am 5'Ende einer jeden eukaryontischen mRNA (Muthukrishnan et al., 1995).

Zur Verifizierung des korrekten Transkriptionsstartpunktes der *elp* mRNA wurden RT-PCR-Studien durchgeführt. Mit dem an eine kodierende Sequenz in Exon V bindenden Primer EP6 und den am 5'-Ende von *elp* bindenden Primern EM9, EM14 und EP13 wurde versucht, direkt Fragmente zu amplifizieren. EP13 setzt 13 bp, EM14 32 bp und EM9 72 bp stromaufwärts des 5' Introns an, d.h. EP13 bindet stromabwärts und EM9 und EM14 stromaufwärts des vermuteten Transkriptionsstartpunktes. In der Tat konnte, wie erwartet, ein Fragment mit entsprechender Größe nur mit der Primerkombination EP13×EP6 amplifiziert werden nicht jedoch mit EM9×EP6 oder EM14×EP6 (siehe Abb.2 und 4).

Demnach umfaßt der als prä-mRNA exprimierte Bereich des chromosomalen *elp* Locus von *E. multilocularis* 3888 bp, wovon sich 10 Exons ableiten. Innerhalb der kodierenden Sequenz befinden sich 9 Introns, wobei das erste, das so genannte 5'Intron eine Sonderstellung einnimmt, da es zwischen Transkriptions- und

Translationsstartpunkt (32 bp stromabwärts bzw. 9 bp stromaufwärts) lokalisiert ist. Intron I befindet sich 27 nt stromabwärts des Translationsstartpunktes. Intron II liegt an Position 327, Intron III an 479, Intron IV an 704, Intron V an 800, Intron VI an 965, Intron VII an 1200 und Intron VIII an Position 1393 der kodierenden cDNA- Sequenz.

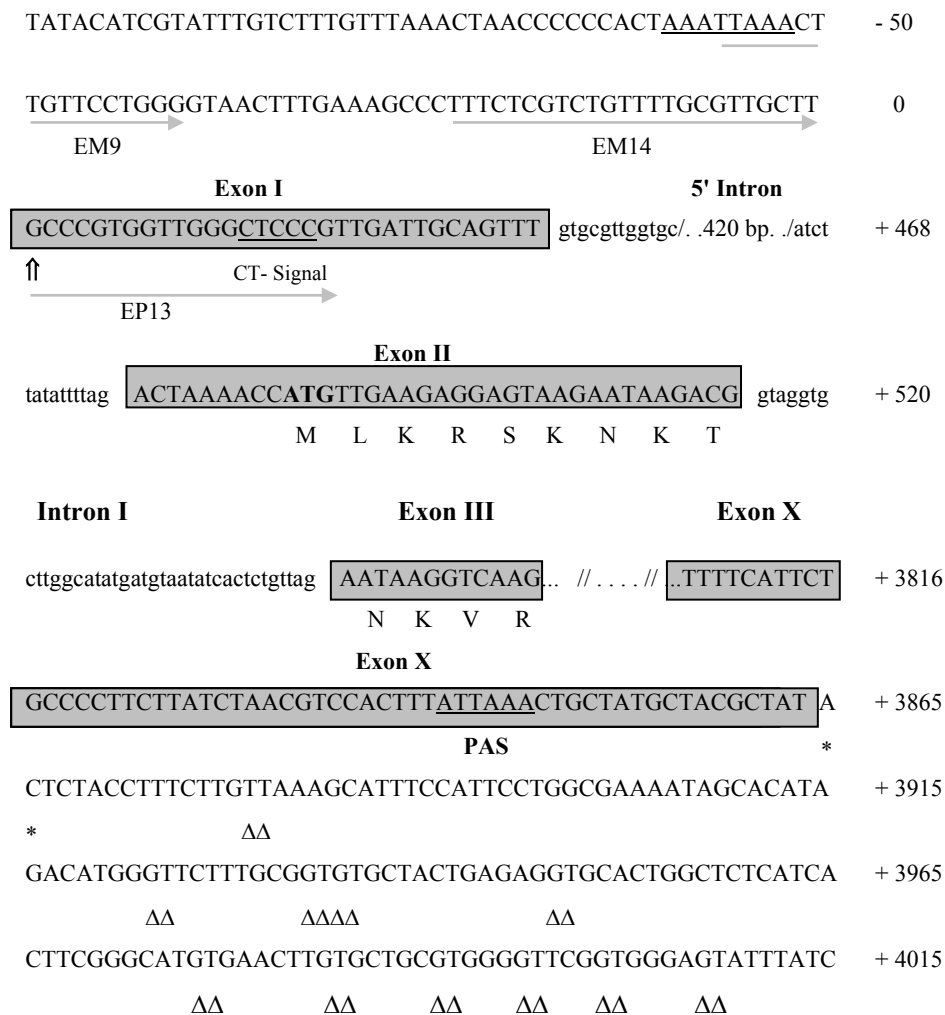


Abb.4 : **Sequenz des 3'- und 5'-Endes von *elp***. Intronsequenzen werden durch kleine Buchstaben und Exonsequenzen in grauen Boxen durch Großbuchstaben repräsentiert. Nicht transkribierte Sequenzabschnitte sind nicht eingerahmt und genau wie die Proteinsequenzen, die unterhalb der jeweiligen Nukleinsäuresequenz angegeben sind, ebenfalls durch Großbuchstaben repräsentiert. Stromaufwärts von bzw. im Exon I sind die für die RT-PCR unter 4.1.1 erwähnten eingesetzten Primer (EM9, EM14 und EP13) durch Pfeile repräsentiert. Der Transkriptionsstart ist durch (↑) markiert. (/ . .420 bp . ./) stellt eine 420 bp lange Sequenz im 5' Intron dar und (//. . . //) einen 3243 bp

langen Sequenzabschnitt der *elp*- kodierenden Region zwischen Exon III und Exon X. Regulatorische Sequenzen am 5'- Ende d.h. mögliche TATA- Box und CT- Signal sind unterstrichen. Auch die Polyadenylierungssequenz im Exon X am 3'- Ende ist unterstrichen und mit PAS markiert. Die Poly-A-Initiationsstelle ist durch (*) hervorgehoben und die GT- Dinukleotide sind durch ($\Delta\Delta$)markiert (die komplette Nukleotidsequenz ist abrufbar in der EMBL, der GenBank™ und der DDJB database unter der Zugangsnummer AJ012663).

4.1.2 Charakterisierung der Promotorregion

Bei eukaryontischen Genen ist der Promotor in der Regel im Bereich von – 200 bis + 50 nt um den Transkriptionsstartpunkt lokalisiert (Picón et al., 1996). Trotz genauer Analyse der chromosomalen Sequenz dieses Bereiches bei *E. multilocularis* konnten keine Konsensuselemente wie TATA-, CAAT-Box oder anderen Initiationselementen auffindig gemacht werden (Larsen et al., 1995). Dies läßt darauf schließen, daß entweder die Promotorkonsensussequenzen von *elp* in *E. multilocularis* von denen meist bisher für Vertebraten bestimmten Promotormotiven abweichen, oder daß *elp* spezielle Regulationsmechanismus zur Genexpression benötigt, wofür bisher keine konservierten Elemente bekannt sind. (Ajioka & Swindle, 1993; Ben Amar et al., 1991; Brown et al., 1992; Nakaar et al., 1994).

Verschiedene alternative Signalsequenzen konnten in dieser Arbeit jedoch identifiziert werden. So befinden sich spezielle AT-reiche Sequenzen 30 bzw. 55 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes von *elp* (TTTGAAA und AAATTAAA), welche als mögliche TATA-Box fungieren könnten. Des weiteren paßt die 14 bp stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes gelegene CTCCCG-Sequenz perfekt zu dem von Larson, Engelbert und Brunak (1995) beschriebenen CTNCNG-Konsensusmotiv für stromabwärts gelegene Promotorsignalsequenzen in eukaryontischen Zellen. Auch konnte ein etwa 10fach erhöhtes Auftreten von CG-Dinukleotiden im wahrscheinlichen Bereich des *elp*-Promotors nachgewiesen werden, was ein Zeichen sein könnte für eine Regulation der *elp*-Expression durch DNA-Methylierung (Cross & Bird, 1995).

4.1.3 Untersuchung der Exon- Introngrenzen

Zur Herstellung einer reifen mRNA müssen in allen eukaryontischen Zellen die Introns der zugehörigen prä- mRNA exakt durch Spleißen entfernt werden. Innerhalb der Introns existieren konservierte Bereiche, die invariant sind, darunter ein 5' gelegenes Splice Donor Motiv sowie ein 3' gelegenes Splice Akzeptor Motiv. *elp* wurde hier in bezug auf drei kurze, intronale, essentielle und konservierte Sequenzelemente untersucht. Hierbei handelt es sich um i) den 3' Splice Akzeptor - ii) den 5' Splice Donor - und iii) die sogenannte Branchpointsequenz, einer Sequenz in der Nähe des 3'Ende eines jeden Intron, die mit der 5' Splice Donorsequenz interagiert. Bei *elp* stimmen die Exon- Intron Übergangssequenzen im Wesentlichen mit den bereits beschriebenen Konsensussequenzen für Splice Donor und Splice Akzeptor in Säugern (Balvay et al., 1993) überein (siehe Tab. 1). Jedes Intron ist flankiert durch ein 5' GT und ein 3' AG Dinukleotid. Sequenzen, die eine eventuelle Branchpointsequenz darstellen, konnten in Intron II bis VIII identifiziert werden. Weder das 5' Intron noch das nur 36 nt lange Intron I weisen Sequenzen auf, die signifikante Übereinstimmung aufweisen mit der UNYURAY-Sequenz (N= alle Nukleotide, Y= Pyrimidin, R= Purin), die als typischer Branchpointkonsensus für Säuger festgestellt wurde (Balvay et al., 1993).

	Splice Donorsequenz	Splice Akzeptorsequenz	Potentielle Branch Point Sequenz und deren Lokalisation (in nt) stromaufwärts der 3' Splice Stelle	
	5' Exon - Intron	Intron - Exon 3'		
5' Intron	<i>UUU</i> - GUG <i>CGU</i>	UUU UAG - A	-	-
Intron I	ACG - GUA <i>GGU</i>	UGU UAG - A	-	-
Intron II	CAG - GUA <i>CUC</i>	UAU CAG - G	UCCUAAU	18
Intron III	CAA - GUA <i>GGU</i>	AUG CAG - G	UCUUGAU	64
Intron IV	<i>UUU</i> - GUA AGU	CCU CAG - A	UACUCAU	32
Intron V	AAG - GUU <i>UUU</i>	UUG CAG - G	<i>GUUUGAC</i>	38
Intron VI	<i>GAG</i> - GUA AGU	<i>AUU</i> AAG - A	GUUUGAU	33
Intron VII	<i>GAG</i> - GUG <i>CGU</i>	UUG UAG - G	UAUUAAC	25
Intron VIII	ACG - GUA AGU	<i>GUU</i> CAG - C	UUUUAAC	22
KONSENSUS	MAG - GUR AGU	(Y)_nN YAG - G	UNYURAY	15-40

Tab. 1: **Tabellarische Darstellung der Exon- Intron Übergangssequenzen und potentieller Branch Point Sequenzen von *elp*.** Für jedes Intron von *elp* sind die letzten 3 nts des vorherigen Exons und die 6 nts der sich anschließenden Intronsequenz sowie die letzten 6 nts des Introns und das erste Nukleotid des darauffolgenden Exons aufgeführt. Der Übergang zwischen Intron- und Exonsequenz ist durch einen Bindestrich dargestellt und alle *elp* Sequenzen, die nicht mit der in der letzten Zeile in Fettdruck angegeben Konsensussequenz für Splice Donor und Splice Akzeptor von Säugetierzellen übereinstimmen, sind kursiv gedruckt. Die möglichen Branch Point Sequenzen sowie deren Lokalisation oberhalb der 3' Splice Akzeptorstelle ist ebenfalls angegeben. Die Sequenzen von *elp* zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Konsensussequenz. Alle Introns sind durch ein GU am 5' Ende und ein AG am 3' Ende terminiert. R=A, G; Y=C, U; N=A, U, G, C; M=A, C

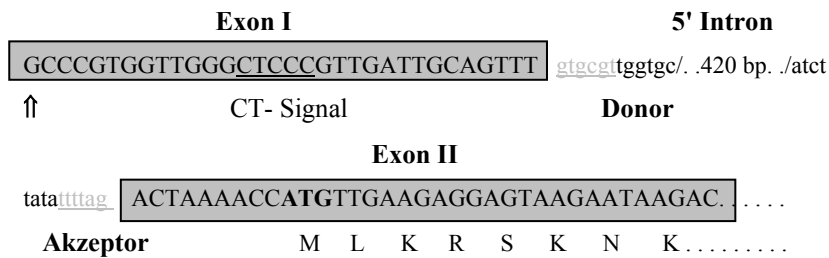
4.2 Charakterisierung des Trans-Splicing Mechanismus bei Echinokokken

4.2.1 Charakterisierung eines alternativen *elp*-Transkriptes

Im Rahmen der Untersuchung zur Charakterisierung des *elp* Transkriptionsstartpunktes konnte ein alternatives *elp* 5'-Ende charakterisiert werden (K. Brehm, persönl. Mitteilung). Neben dem konventionellen unter 4.1.1 beschriebenen hier als Transkript A bezeichneten *elp* Transkript existiert also offenbar ein weiteres *elp*-Transkript, Transkript B (siehe Abb. 5). Die beiden Transkripte unterscheiden sich lediglich in

einem kurzen Sequenzabschnitt am 5'-Ende. Transkript A entsteht durch die Fusion des nicht translatierten 32 nt langen Exon I an das Translationsstartcodon beinhaltende Exon II (siehe Abb. 2). Das alternative Transkript B hingegen weist eine 36 nt lange Sequenz an seinem 5'-Ende auf, die weder Homologien zeigt zu dem zuvor bestimmten 32 nt langen Exon I noch zu einer anderen Sequenz 2 kb stromauf- oder stromabwärts von *elp*. Exon I wird in Transkript B exakt durch dieses 36 nt Exon ersetzt.

Der Vergleich der zwei Transkripte sowie ein Sequenzvergleich der 36 nt Sequenz von Transkript B, in dem signifikante Homologien zu der Spliced Leader (SL) Sequenz besonders von Trematoden zu detektieren waren, legten die Vermutung nahe, daß dieses alternative Exon über den Mechanismus des Trans-Spleißens und speziell des SL-Trans-Spleißens mit Exon II von *elp* verbunden wird, ähnlich dem vorher beschriebenen Mechanismus des Trans-Spleißens bei Trematoden und Nematoden (Davis, 1997). Insbesondere die Anwesenheit eines ATG- Codons am 3'-Ende der 36 nt, welches konserviert in SL-Sequenzen von Trematoden vorkommt, unterstützte diese Annahme (Davis et al., 1995). Es konnte durch weitere Studien in dieser Arbeit gezeigt werden, daß es sich bei der 36 nt Sequenz in der Tat um einen SL handelt.

Chromosomale Sequenz:**Transkript A**

5'-GCCCCGUGGUUGGGCUCCCGUUGAUGCAGUUU - ACUAAAACCAUGUUGAAGAG...

Exon I

M L K.....

Transkript B

5'-CACCGUUAUUCGGUCCUACCUUGCAGUUUUGUAUG - ACUAAAACCAUGUUGAAGAG...

Spliced Leader

M L K.....

Abb.5: **Alternative *elp* Transkripte.** Dargestellt ist die chromosomale Sequenz von *elp* im Bereich des 5'- Introns, sowie die 5' terminale mRNA- Sequenz des konventionell gespleißten Transkript A und des trans- gespleißten Transkript B. Exonsequenzen sind durch Großbuchstaben und Intronsequenzen durch Kleinbuchstaben repräsentiert. Im 5'-Intron sind Splice Donor- und Splice Akzeptor-Sequenz grau hervorgehoben und unterstrichen. Durch (/ .420 bp. ./) ist eine 420 bp lange nicht transkribierte Intronsequenz dargestellt, und im Exon II ist die Proteinsequenz beginnend mit dem AUG- Translationsstartpunkt unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Die alternativen 5'- Exons von Transkript A und B sind unterstrichen und der Übergang zu Exon II durch einen Bindestrich markiert.

Um zu untersuchen, ob beide Transkripte neben den alternativen Exons am 5'Ende noch über weitere alternative Spleißing-Modi exprimiert werden, wurden beide in ihrer gesamten Länge per RT-PCR amplifiziert. Hierzu wurde cDNA aus Gesamt-RNA der Isolate H95 und K188 verwendet. Es wurde ein Primer spezifisch für das jeweilige 5'-Ende (EP13 für Transkript A und SLOLAP für Transkript B) in Kombination mit dem internen Primer PF18 eingesetzt, der am 3'-Ende von *elp* in Exon X bindet. Bei SLOLAP handelt es sich um einen Primer, der an 18 nt des SL und an die ersten beiden nt des Exon II von *elp* bindet und somit spezifisch ist für Transkript B. Die beiden amplifizierten, spezifischen und der zu erwartenden Größe entsprechenden Fragmente konnten direkt sequenziert werden. Die Sequenzierung ergab identische Transkripte für

beide Sequenzen, welche sich daher in der Tat nur durch die unterschiedlichen Exons am 5'Ende unterscheiden.

4.2.2 Charakterisierung weiterer SL-trans-gespleißter mRNAs von *E. multilocularis*

In Trypanosomen weisen alle bisher untersuchten mRNAs einen Spliced Leader an ihrem 5'-Ende auf und in Nematoden wie *C. elegans* und *Ascaris lumbricoides* werden etwa 60-80% aller mRNAs SL-trans-gespleißt (Nilson, 1995; Davis & Hodgson, 1997). Dies legte die Vermutung nahe, daß auch bei *E. multilocularis* noch weitere trans-gespleißte mRNAs existieren. Zu deren Identifizierung und Charakterisierung wurde eine für trans-gespleißte Transkripte spezifische cDNA-Bank konstruiert. Nach der reversen Transkription von *E. multilocularis* Gesamt-RNA (Isolat H95) wurde cDNA hergestellt. Anschließend wurden Fragmente mit einer SL-Sequenz am 5'-Ende über PCR amplifiziert und zwar durch Einsatz eines SL-spezifischen Primers (SL5-PR) und des Primers CD3 zur Bindung an das konstruierte 3'-Ende einer jeden cDNA (siehe Abb.6). Die Analyse ergab, daß auf dem Agarosegel ein homogener Schmier zwischen 0,5 und 4 kb zu detektieren war (Daten nicht gezeigt). Dies gab einen Hinweis auf die Existenz multipler trans-gespleißter Produkte bei *E. multilocularis* und zur weiteren Untersuchung dieser Produkte wurden die amplifizierten Fragmente in *E. coli* kloniert.

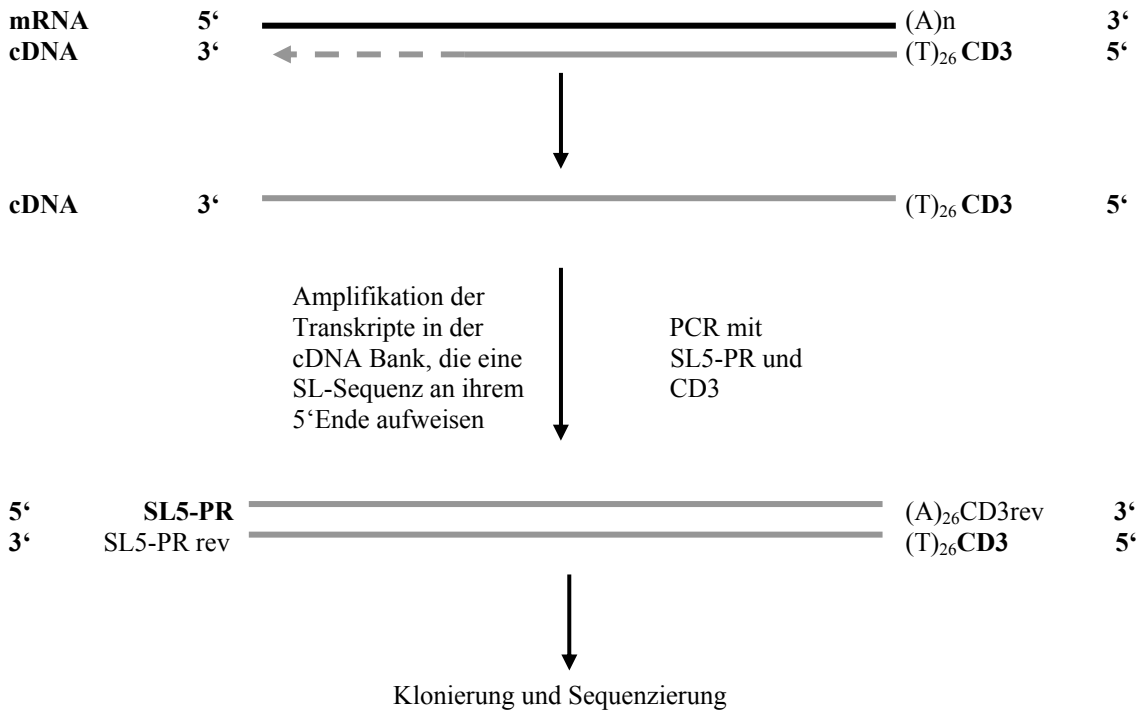
SPLICED LEADER**PCR**

Abb.6: Schematische Darstellung der Identifizierung weiterer trans-gespleißter mRNA Sequenzen aus einer cDNA-Bank per PCR. Mit dem Oligonukleotid CD3, welches an die spezifische Sequenz am 3'Ende einer jeden cDNA bindet, und SL5-PR werden alle cDNAs aus der Bank amplifiziert, die eine Spliced Leader Sequenz am 5'Ende aufweisen und im Bereich der Amplifikationskapazität liegen.

Die PCR Produkte wurden anschließend in *E. coli* kloniert (TOPO-TA Cloning[®] Kit, Invitrogen) und die rekombinanten Plasmide von 40 willkürlich gewählten Kolonien isoliert und sequenziert. Bei allen untersuchten Inserts folgte auf den SL-spezifischen Amplifikationsprimer die Sequenz der restlichen 18 bp des SL von *E. multilocularis*. Dies belegt zum einen, daß wirklich trans-gespleißte Produkte amplifiziert wurden und zum anderen, daß ein und derselbe SL bei allen mRNAs vorlag. ORFs konnten bei 39 Plasmidinserts identifiziert werden, und 17 der Insertsequenzen wiesen im

Aminosäuresequenzvergleich signifikante Homologien zu bereits bekannten Proteinen auf. Sechs waren homolog zu Proteinsequenzen mit unbekannter Funktion. Die restlichen 11 sind in Tabelle 1 aufgeführt. Ihre Sequenzen sind in GenBank™/EBI Data Bank unter dem Zugangscode AJ29365-29377 erhältlich. Es konnte kein allgemeines Merkmal in bezug auf die wahrscheinliche biologische Funktion der Proteine festgelegt werden. Drei der Faktoren sind potentiell am Spleißing Mechanismus beteiligt und die restlichen Faktoren sind potentiell involviert in unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Glykolyse, Pyrimidinmetabolismus, Atmungskette oder die Initiation der Translation (Tab.2).

Klon	cDNA Größe	ORF Länge	% Identität	Identifikation	5'Ende
Em1SL	1053	223	59	Ras-verwandtes Protein Rab4A	ATG GAAAAATCAGGTCTTAAAAATGGAA M E
Em2SL	598	130	50	Ubiquinon Cytochrom c Reduktase Komplex Untereinheit	ATG - GAGGTCTTCTTAACACTGCTCTGA GAATGACC M T
Em3SL	308	83	85	snRNA assoziiertes Sm ähnliches Protein	ATG - CATGCAA M Q
Em4SL	1285	311	79	Translationsinitiationsfaktor 4A	ATG - GTCAATGGCG M A
Em5SL	1301	363	73	Fruktosebiphosphat Aldolase	ATG - AAAAAATGTCT M S
Em6SL	2101	641	52	Spliceosom assoziiertes Protein SAPI14	ATG - TTAACTGATCATGACT M T
Em7SL	590	188	75	U-snRNP assoziiertes Cyclophyllin	ATG - CAGAGAATGGCA M A
Em8SL	1394	433	41	Mannose-6-Phosphat Isomerase	ATG - ATCATGCTT M L
Em9SL	372	82	67	Enhancer eines rudimentären Homologs	ATG - ATGTCG M S
Em10SL	2173	335	30	Cyclin H	ATG - GCTTAC M A Y
Em11SL	432	127	67	Homolog eines High mobility group-like Protein 2	ATG - GCTGAA M A E

Tab. 2: **Trans-gespleißte mRNAs von *E. multilocularis*.** Es wurde eine cDNA-Bank für trans-gespleißte mRNAs von *E. multilocularis* (Isolat H95) wie in Material und Methoden beschrieben erstellt. Die Inserts von 11 rekombinanten Klonen, die signifikante Homologien im BLAST Aminosäuresequenzvergleich erzielten, wurden komplett sequenziert. Für jeden Klon sind angegeben: die Größe der cDNA (in bp;

beinhaltet nicht den Poly-A-Schwanz und die 36 nt SL-Sequenz), die Länge des offenen Leserasters (ORF; in Aminosäuren), die Homologien (in % identische Aminosäuren) der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu der am besten passenden Sequenz in der Datenbank, die der höchsten Homologie entsprechende Identifikation und die 5'-terminale-nt-Sequenz der cDNA. Die potentielle proteinkodierende Region (fettgedruckt) sowie die N-terminalen Aminosäuren der ORFs (unterhalb der nt-Sequenz) sind angegeben. Die Fusionsstelle mit dem SL ist durch einen Bindestrich (-) markiert und das 3' ATG des SL ist links davon aufgeführt. Bei den Klonen Em10SL und Em11SL stellt das SL 3' ATG voraussichtlich den Translationsstartpunkt dar. Das SL ATG der Klonen Em8 SL und Em9 SL paßt auch in dasselbe Leseraster wie das voraussichtliche Translationsstart-ATG, bei allen anderen paßt es nicht in das ORF des Proteins. SP, Swiss-Prot, PRF, Protein-Research-Foundation, GP, GenBank protein.

4.2.3 Klonierung eines SL-RNA Gens aus *E. multilocularis* und *E. granulosus*

Die Tatsache, daß den vorausgegangenen Untersuchungen zufolge ein Teil der mRNAs von *E. multilocularis* am 5'Ende dieselbe 36 nt lange Sequenz aufweisen, stellt einen starken Hinweis dafür dar, daß es sich bei dieser Sequenz um einen Spliced Leader handelt. Um zu beweisen, daß SL-Trans-Spleißen in der Tat hier als Mechanismus verwendet wird, galt es (i) das SL-RNA kodierende Gen auf chromosomaler Ebene zu identifizieren, (ii) zu zeigen, daß die SL-Sequenz auf der DNA direkt gefolgt ist von einer Splice Donor Stelle, und (iii) daß die SL-RNA von Echinokokken dieselben strukturellen Eigenschaften aufweist wie sie bereits für andere Organismen wie Trematoden, Turbellaria und Nematoden beschrieben worden sind (Davis & Hodgson, 1997; Davis et al., 1994; Rajkovic et al., 1990).

In allen bisher untersuchten Organismen, konnte das SL-RNA kodierende Gen als Teil eines 0.6-1.2 kb großen DNA-Fragmentes identifiziert werden. Je Chromosom sind die einzelnen Gene mehr als 100-mal direkt hintereinander (Repeats) angeordnet (Davis et al., 1994; Donelson & Zeng, 1990; Rajkovic et al., 1990). In der Annahme, daß dies auch für *E. multilocularis* und *E. granulosus* zutrifft, wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Sequenz des SL-RNA kodierenden Gens ein PCR-Ansatz gewählt, durch den unter Verwendung zweier SL spezifischer Primer (SLN5 und SLN3), die in entgegengesetzte Richtung orientiert sind, die Sequenz eines Gens und des gesamten Repeats vervielfältigt werden kann (siehe Abb. 7).

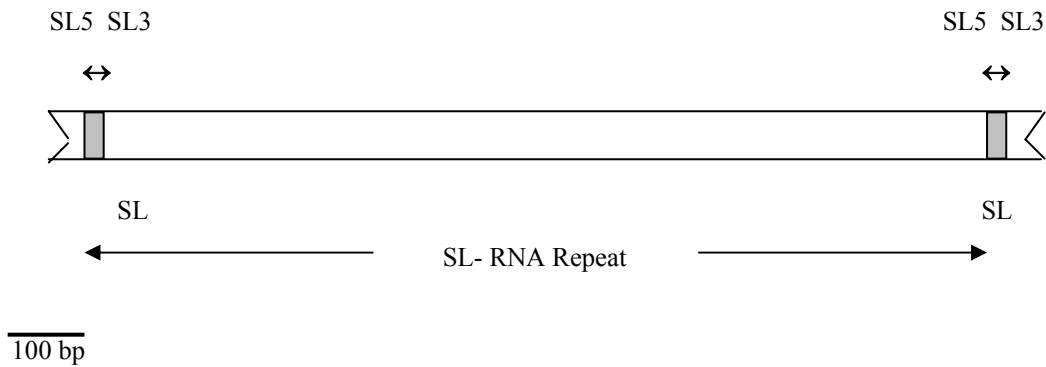


Abb. 7: **Identifizierung des SL chromosomalen Lokus von *E. multilocularis* und *E. granulosus*.** Schematische Darstellung eines SL-Repeats. Gesondert gekennzeichnet sind die SL-kodierende Sequenz (grau schattiert) sowie die zur Amplifikation des Repeats eingesetzten Oligonukleotide SL3 und SL5 (\leftarrow bzw. \rightarrow).

Über PCR konnte so aus chromosomaler DNA von *E. multilocularis* ein 1513 bp großes Fragment amplifiziert, anschließend in *E. coli* kloniert und komplett sequenziert werden. Der gleiche Versuchsansatz mit chromosomaler DNA von *E. granulosus* als Template führte zur Charakterisierung eines 1555 bp langen Fragments, welches zu 87 % homolog (in Prozent identischer Nukleotide) war zu dem Gen von *E. multilocularis* (siehe Abb. 8). Sich direkt der Sequenz des SL anschließend befand sich eine potentielle Konsensus Splice Donor Sequenz (5'-GTGAGT-3'). Im Gegensatz zu den SL-Repeat-Sequenzen von Nematoden, konnte weder bei *E. multilocularis* noch bei *E. granulosus* die kodierende Sequenz für eine 5S rRNA im Bereich des SL-Repeats identifiziert werden. Auch enthielten weder das 1513 bp noch das 1555 bp Fragment eine Hinweise auf die Anwesenheit eines proteinkodierenden Genes. Um die Gesamtgröße der SL-RNA zu bestimmen wurde auf der Basis der gefundenen Sequenzdaten eine Sonde erstellt, welche nach der Hybridisierung mit Gesamt-RNA von *E. multilocularis* eine Größe von 104 nt ergab (K. Brehm et al., 2000). Obwohl für *E. granulosus* aufgrund des fehlenden Parasitenmaterials kein Northern Blot durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, daß aufgrund der hohen Homologien der SL und der SL-RNA Sequenzen von *E. multilocularis* und *E. granulosus* (97 bzw. 98%), die 3' Termini identisch sind. Die SL-RNAs beider Spezies unterscheiden sich lediglich in zwei Nukleotiden, ein Nukleotidaustausch befindet sich im Bereich der SL-Sequenz (Abb.8a).

Auf der Basis dieser Größenbestimmung konnte eine mögliche Sekundärstruktur der SL-RNA computergestützt für *E. multilocularis* und *E. granulosus* erstellt werden (Mathews et al., 1999). Diese weist alle bisher bestimmten phylogenetisch konservierten Merkmale der SL-RNAs von Trematoden und Nematoden auf (siehe Abb. 9b). Hierzu gehören eine aus 2-4 stem loops bestehende Grundstruktur, die Lokalisation des SL im Bereich der ersten stem loop und das Vorliegen einer potentiellen, konservierten Sm-Bindestelle im einsträngigen Bereich meist zwischen der zweiten und der dritten stem loop (Davis et al., 1994; Davis, 1996; Davis, 1997; Donelson and Zeng, 1990). Stem loops sind doppelsträngige Bereiche der einzelsträngigen RNA, die durch das Auftreten selbst-komplementärer Sequenzabschnitte innerhalb der RNA entstehen. Es kommt zur Basenpaarbildung und dadurch zur Entstehung entsprechender Strukturen d.h. zur Formierung von RNA-Schleifen mit einem doppelsträngigem „Stamm“ (siehe Abb. 9a). Bei Sm-Bindestellen handelt es sich um wichtige Bindestellen von U snRNAs (small nuclear ribonucleic acids), die für den Aufbau von U snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles) von Bedeutung sind. Sn RNPs bilden zusammen mit anderen Proteinen das so genannte Spliceosom, welches am Prozeß des RNA Spleißens beteiligt ist (Nilsen, 1993).

Ein in Abb. 9a dargestellter SL-Sequenz-Vergleich von *E. multilocularis* und *E. granulosus* mit bekannten Sequenzen der parasitischen Plathelminthen *F. hepatica*, *S. mansoni* und *S. zebrae* zeigt Homologien auf, die den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen entsprechen. Es konnten keine signifikanten Homologien festgestellt werden zwischen den SLs oder den SL-RNA Sequenzen von *Echinococcus* und denen von kinetoplastiden Protozoen oder Nematoden (nicht dargestellt) wohl aber zu denen von Trematoden und Turbellaria. Abgesehen von einigen konservierten Regionen, besonders im Bereich der Splice Donor Site, konnten Gesamthomologien um 48% zwischen SL-RNAs von Cestoden und Trematoden bestimmt werden, im Bereich des SLs um 55%. Die Homologien zu den Sequenzen von *S. zebrae* sind zwar deutlich geringer, aber immer noch signifikant.

1 CACCGTTAATCGGTCCTTACCTTGCA**A**TTTTGTATGGTGAGTATCGATGCAGCT**C**AGGCT
 1 CACCGTTAATCGGTCCTTACCTTGCA**G**TTTTGTATGGTGAGTATCGATGCAGCT**G**AGGCT

 61 *GTGCCTACGAGCTGACCCAGTATTTGGCTGGTCC**T**CGAGGGCCTAGATGGGAAGC**AA**AG*
 61 *GTGCCTACGAGCTGACCCAGTATTTGGCTGGTCC**T**CGAGGGCCTAGAC**C**GGGAAGCGGAG*

 121 GAAGCAAGGT**AA**AGTAG**A**GCGGAGTGGTGTGACGATGGTGGTGGTGTGGTGGTGCAC**AA**C
 121 **CA**AGCAAGGTGAAGTAGGGCGGAGTGGTGTGACGATGGTGG**C**GGTGTGGTGGTGCACGAC

 181 GCGGTGGCGGCTGGTTCGTGGTTCGTGGTTCGTGCCATCGCCGTCGT**C**GACGTGCCTTAAGC
 181 GCGGTGGCGGCTGGTTCGTGGTTCGTGGTTCGTGCCATCGCCGTCGT**T**GACGTGCCTTAAGC

 241 TGCACGTTGATGAGCTGTGCTGTGCTTTG AT**A**CAC
 241 TGCAC**C**TTGATGAGCTGTGCTGTGCT**G**TGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTACTTTTCATGCAC

 276 GACAACAGGAGGT**AA**CGATGTAATTGTATGC**A**CTACGCCCGACCCTGCTACGT**C**GGG . .
 301 GACAACAGGAGGT**AA**GGATGTAATTGTATGCGCTACGCCCGACCCTGCTACGT**C**TGGTG

 334 GTAA . TGACCTGAGCCACGCCACATTGTCTTGTCTCGTTGCGCCACGACAAAGT . AAGCAG
 361 GTAAATGACCTG**A**CCACGCCAC**A**CTGTCTTGTCTCGTTGCGCCACGACAAAGTGAAGCAG

 392 GGGGAATGCAAATGAGCGAAT**CC**ATCCATCTCGAATCTATCTATCT**A**TCCATCTATCTAT
 421 GGG**CA**ATGCAAATGAG**C**AAATGCATCCATCTCGAATCT**AC**CAATCTCTCTATCCATCTAT

 452 CGAAC**CA**TCAACCCACCCAC**AC**CACACCCGACCGACCGACCGACCGACCGTCCGACCGACCG
 481 CGAACCGTCAACCCACCCACCCACAC . . ACC**C**AC AC ACCGACCG

 512 ACCGAC**C**GACCGGCCGACTGACCGACCGATCAAATGCGCGATGCATTG**AC**CGATGG**A**TTG
 523 ACCGACTGACCG**A**CCGAC**C**GACCGACCGATCAAATGCGCGATGCATTGATGGATGGGTTG

 572 ATTACAACCTTGGCAAGTAGTGCTTTT**C**ACTAACGTAATTGCGGGTTATGCTATTAGAATA
 583 ATTACAACCTTGGCAAGTAGTGCTTTT**C**GCTAACGTAATTGCGG**C**TTATGCTATTAGAATA

 632 TTGGCAGCGCAACACAGCTAGCTCC**CC**ATAACCTTAGCCTTGTCT**C**ACTGCTCTTCTACT
 643 TTGGCAGCGCAACACAGCTAGCTCCTCATAACCTTAGCCTT**GC**TTACTG**C**GCTTCTACT

 692 CGCAAGCATTTC**CG**TCACAA**AT**CAGACA**AG**GTGACACTACTCGAGATGGTGTAGTGCTCT
 703 CGCAAGCAT**CA**CTGTACAACTCAGACACGGTGACACTACTCGAGATGGTGTAGTGCTCT

 752 CGAGTCTGCATCCCTT**CA**CATCTGCGTGCTGCTTTCGTTTATATCCTCCTATGAGCATGCC
 763 CGAGTCT**CA**CATCCCTTCGCATCTGCGTGCTGCTTTCGTTTATATCCTCCTATGAGCATGCC

 812 TTCATGC . **CA**TGTTAT**AAA**GTGCG**A**GCGTGCGAGCGTGCG**A**GCGT**CG**GTGCGTCAATGTG
 823 TTCATGCATGT**ATA**AGTGCGTGCGTGCGTGCGTGCGTGCGTGGGTGCGTCAATGTG

 871 AGTGTAGTGAAATGGGTGTGGTGTAGTGGT**AG**GTGAGTAAGTGTAGT**CG**TAAGAG**AG**TTG
 883 AGTGTAGTGAAATGGGTGTGGTGTAGTGGTGGTGA GTGAGTGT**CG**GAGAGGGTTG

 931 ATT**AG**GTTGAGTGCATTGCGAGGGAGGTAGTGGGAGGCTGAAGTGGTGTAGTGCCTGGTGTG
 939 ATTTGGTTGAGTGCATTGCGAGGG**A**AGTAGTGGGAGGCTGAAGTGGTGTAGTGCCTGGTGTG

 991 AG**AT**TGTTGCTGCGGTGTCTACGCCTGCCTGTAACAAGGACGATGGCGATTGCTTGCCTG
 999 AGGTTGTTGCTGCGGTGTCTACGCCTGCCTGTAACAAGGACGATGGCGATTGCTTGCCTG

 1051 CTTGCTTGCCTTGCCTTGCCTTGCCTT**G**CTAGTGTGGATGTGCGGCTGACCGACTTCC**T**AACT**C**
 1059 **CA**TGCTTGC**A**TGCTTGC**C**TGCTTGT**A**GTGTGGATGTGCGGCTGACCGACTTCC**T**AACT**G**

 1111 **AT**CATTTGTCAATGTGTGAGTGCGTGGTGTATTGGCTTGTGGTGCATGGTGTAGTT**AAA**
 119 CTGATTTGTCAATGTGTGAGTGCG TGTATTGG**C**ATGTTGGTGCATGGTGTAGTT**AA** .

```

1171 ATACGGTGCTGTGACTGGTGGAGATGACGACGGCGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGATGA
1175 .CACGGTGCTGTGAGTGGTGGAGGTGGCGAC.....GTCGTCGTCGTTGATGA

1231 TGATGACGATGATGATGGCGATGATGATGCGTGCATGCATGCATGCATGCCTGAAGGGAG
1222 TGATGACGATGG.....ATGCGCGAAGGCGAG

1291 AGTAGCAGGGAGAGGAGTTTCGCGATAGGGAAGGCGCAGTAGTGGGAGGCGGTACTACTGA
1248 AGTAGCAAGGAGAGGAGTGCGCGATAGGGAAGGCGCAGTAGTGGGAGGCGATACTACTGA

1351 AGGGGAGGTGAGTAGATGGCATGAGTTGTTGGAGGAATGGAGATGGTGGGGTGGATGATG
1308 AGGG.AGGTGAGTGAACGGCATGAGTTGTTGGAGGAACGGCGATGGTGGGGTGGATGATG

1411 CGGAGGTGGATGTGTGTAGAATGTGTAGTGAAGGCGGATGGGTAGGTGGGACGCGCAGT
1367 CGGGGGTGGATGTGCGTAGAGTGTGTAGTGAAGGCGGATGGGTAGGTGGGCGCGCGCAGT

1471 GTGCGTGCAGGGAGCGAAGGCGCGCGGAAG.CGGCGAGAGGGCAAGGCAGTGGTGTGGG.
1427 GTGCGTGCAGGGAGCGAAGGCACGCGGAAGGCGGGAGGGCAAGGCAGTGGTGTGGGG

1529 CGGGAGGGGCGCGAGGTGACCGGGT SL-Repeat-E.granulosus
1487 CGGGAGGGGCGCGAGGTGACAGGGT SL-Repeat-E.multilocularis

```

Abb. 8: Nukleinsäuresequenzvergleich der charakterisierten chromosomalen SL Repeat Sequenzen von *E. granulosus* und *E. multilocularis*. Abschnitte bzw. einzelne Nukleotide in denen sich die Sequenzen unterscheiden sind fett gedruckt. Punkte symbolisieren das Fehlen einzelner Nukleotide. Die SL-RNA kodierende Sequenz von *E. multilocularis* und *E. granulosus* ist kursiv gedruckt und der Spliced Leader zusätzlich unterstrichen. Das voraussichtliche 3'-Ende der SL-RNA von *E. multilocularis* und *E. granulosus* ist durch einen Pfeil (↑) markiert. Die Gesamtlänge eines SL-Repeats von *E. multilocularis* beträgt 1513 bp und die von *E. granulosus* 1555 bp. Im Bereich des SL besteht eine Homologie von 97%, im Bereich der SL-RNA Sequenz eine von 98% und über die gesamte Länge des Repeats von 87%.

```

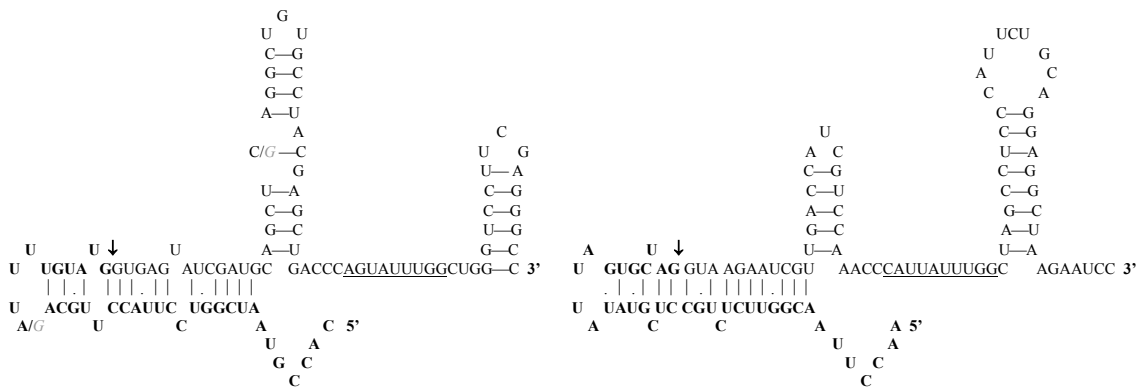
Eg ----CACCGTTAATCGGTCCTTACC-----TTGCAGTTT---TGTATGGTGAGTATCGAT 48
Em -----G-----A----- 48
Fh ----A...T...T...CTG-----CC..T..-A.TAG..C...A..A...T. 48
Sm ----A...-C...-TT.ACT-----TGA...-GT..C...A..A.C..TC 48
Sz TGCCGTATT.G...-TCA.AAATTTGGTGTTTA...AA.A--AT..C...A..C...A.A 63

Eg GCAGC-TCAGGCTGTGC-CTACGAGCTGAC---CCAGTATTTGGCTGGTCCTTCGAGGGCC 104
Em .....G..... 104
Fh .G.C.A..G.T.CAAA.-.C.TT.TT..G.TAG..TCC...CT..A.AGG..AA..AT... 107
Sm -.C.AA..AT.GAA.T-T--TTCTT..G.AGC..TAC.CAC----.GG..A 93
Sz TG.T.----.TG..AT.GTC----.TCTTT-GA..-----C.CGAGG-.....TATAT 110

```

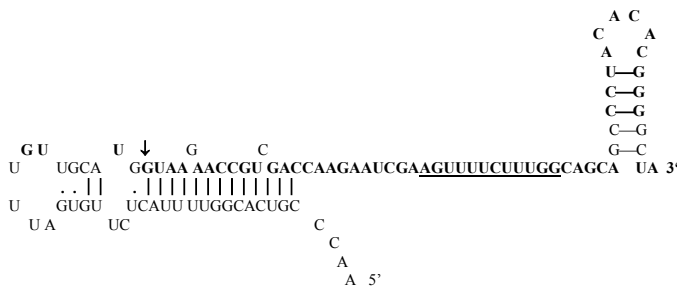
	Länge (in bp) des SL	Länge (in bp) der SL-RNA	Homologien zu folgendem Sequenzabschnitt von <i>E. granulosus</i> :	
			Spliced Leader	SL-snRNA
<i>E. granulosus</i>	36	104	100 %	100 %
<i>E. multilocularis</i>	36	104	97 %	98 %
<i>F. hepatica</i>	37	107	53 %	49 %
<i>S. mansoni</i>	36	93	58 %	47 %
<i>S. zebrae</i>	51	110	30 %	22 %

Abb. 9a: Sequenzvergleich der in dieser Arbeit bestimmten SL-RNA-Gensequenzen von *E. multilocularis* und *E. granulosus* mit bereits an anderer Stelle bestimmten Sequenzen von *S. mansoni*, *F. hepatica* und *S. zebrae* (Davis and Hodgson, 1997; Davis, 1997). Bei Übereinstimmung der Sequenz mit der von *E. granulosus* wurden die Nukleotide als Punkte dargestellt, wohingegen Striche das Fehlen von Nukleotiden an der jeweiligen Stelle symbolisieren. Es sind außerdem aufgeführt die Größe der SLs, der SL-RNAs (in bp) sowie deren Homologien zu der SL bzw. der SL-RNA-Sequenzen von *E. granulosus*.

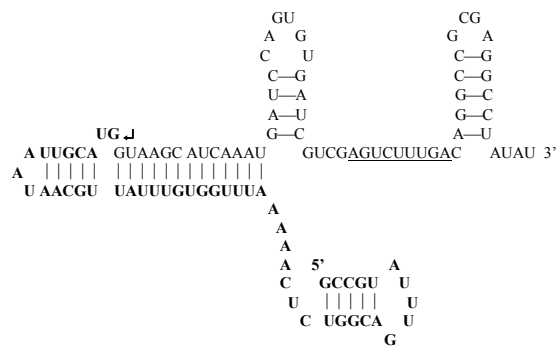


Echinococcus granulosus/multilocularis

Fasciola hepatica



Schistosoma mansoni



Stylochus zebra

Abb. 9b: **Mögliche Sekundärstruktur der SL-RNA von *E. granulosus*, *E. multilocularis* und anderen Plathelminthen.** Bei dem fett gedruckten Sequenzabschnitt handelt es sich um die SL-Sequenz, deren 3'-Ende mit einem Pfeil (↓) markiert ist. Eine mögliche Sm-Bindestelle in der SL-RNA-Sequenz von *Echinococcus*, die hohe Homologie aufweist zu bereits aus anderen Plathelminthen bestimmten Sm-Bindesequenzen (Davis und Hodgson, 1997), ist zwischen der zweiten und dritten Schlinge liegend unterstrichen. Die RNA Strukturen wurden unter Benutzung des Algorithmus von Mathews et al. (1999) erstellt. Zum Vergleich sind außerdem die wahrscheinlichen Sekundärstrukturen von *S. mansoni*, *F. hepatica* und *S. zebrae* dargestellt (in Anlehnung an Davis, 1997).

4.2.4 Untersuchungen der isolatspezifischen Expression der cis- und trans-gespleißten *elp* Transkripte von *E. multilocularis*

Wie bereits unter Punkt 4.4.1 dargelegt konnten zwei unterschiedliche Transkripte, die durch unterschiedliche Spleißingmechanismen am 5'Ende entstanden sind, für *elp* nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, ob diese Transkripte zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Entwicklungszyklus oder in verschiedenen Zellen exprimiert oder aber in der gleichen Zelle co-exprimiert werden. Bisher ist kein anderer Fall bekannt, bei dem ein Protein über zwei unterschiedliche Transkripte, die sich wie bei *elp* lediglich im Bereich des 5'-Endes unterscheiden, kodiert wird. Um diesen ungewöhnlichen Mechanismus näher charakterisieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob es sich um einen stadien- oder isolatspezifischen Mechanismus der Genexpression von *E. multilocularis* handelt. Zur Untersuchung der isolatspezifischen Expression von *elp* wurde Gesamt-RNA der Isolate H95, K188 und T1 isoliert, deren Konzentrationen auf equimolare Mengen abgeglichen und gleiche RNA-Mengen der drei Isolate zur cDNA-Synthese eingesetzt.

4.2.4.1 Analyse über PCR

In einem ersten Versuchsansatz wurden gleiche Mengen cDNA für eine PCR eingesetzt. Als Primer dienten EP13 und EP6 spezifisch zur Amplifikation von Transkript A, SLOLAP und EP6 spezifisch für Transkript B und die intern bindenden Oligonukleotide EM13 und EP6 als Kontrolle für Gesamt-*elp*, d.h. zu Amplifikation des gesamten *elp* unabhängig vom jeweiligen 5'-Ende. Bei allen drei Isolaten ergab die PCR-Amplifikation ein stärkeres Signal für Transkript B als für Transkript A.

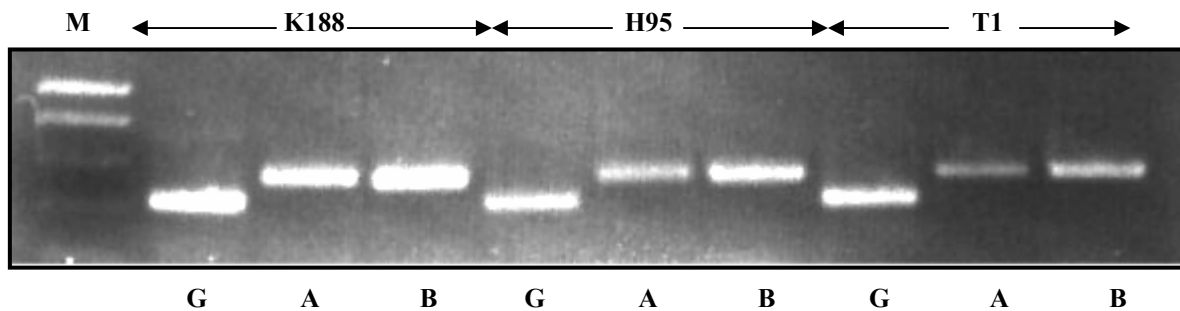


Abb.10: **Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Fragmenten verschiedener Transkripte von *elp*.** Für die PCR-Ansätze wurden gleiche Konzentrationen cDNA der Isolate K188, H95 und T1 eingesetzt (Angaben oberhalb der Abb.). Für jedes Isolat wurden 3 PCRs durchgeführt – gekennzeichnet durch G, A und B. (**G**) markiert dabei die PCR durchgeführt für Gesamt-*elp* (Primerkombination: EP6×EM13), (**A**) die PCR für Transkript A (Primerkombination: EP6×EP13) und (**B**) die PCR für Transkript B von *elp* (Primerkombination: EP6×SLOLAP). Es wurden 15 µl eines jeden PCR-Ansatzes (30 µl) auf das Gel aufgetragen. Für alle drei Isolate läßt sich ein stärkeres Signal für Transkript B gegenüber Transkript A von *elp* erkennen.

4.2.4.2 Analyse per Dot Blot

Der einfache Vergleich der Expressionsverhältnisse per PCR hat nur eine bedingte Aussagekraft, da sich bei Amplifikationen über 30 und mehr Zyklen, die zur Identifizierung des Amplifikats im Agarosegel benötigt werden, die DNA-Mengen einander angleichen. Um die Expressionsverhältnisse von *elp* Transkript A und B noch besser charakterisieren zu können, wurde daher die PCR mit einer geringeren Zykluszahl durchgeführt und anschließend als Dot Blot auf eine Nylonmembran aufgetragen. Diese um ein Vielfaches sensitivere Methode ermöglicht den Nachweis viel geringerer DNA-Mengen, und dadurch eine quantitativ originalgetreue Darstellung der Expressionsverhältnisse.

Gleiche Mengen cDNA aller drei Isolate wurden eingesetzt und die Transkripte A und B mit den entsprechenden Primern (EP6 und EP13 für Transkript A und EP6 und SL-ATG für Transkript B) über 10, 12 bzw. 15 PCR-Zyklen amplifiziert. Zur nicht-radioaktiven Markierung der amplifizierten DNA wurden jedem Ansatz anstelle der normalen dNTPs 2 µl eines speziellen dNTP-Markierungsgemisches (DIG DNA Labeling Mix, Boehringer) zugefügt. Für den quantitativen Nachweis der so markierten

Amplifikate wurden 1µl eines jeden PCR-Gemisches auf eine Nylonmembran als Dot Blot aufgetragen und diese entsprechend den Angaben in Material und Methoden entwickelt. Für alle drei Isolate konnte ein stärkeres Signal für Transkript B detektiert werden. Am ausgeprägtesten stellte sich der Unterschied der Expression der Transkripte bei Isolat T1 dar (siehe Abb. 11).

Diese Untersuchungen auf isolatspezifische Expressionsunterschiede gaben einen Hinweis darauf, daß das trans-gespleißte Transkript B von *elp* wesentlich stärker exprimiert wird als das cis-gespleißte Transkript A und daß dieser Unterschied am deutlichsten für T1 und am wenigsten deutlich für K188 ausgeprägt ist. Da die makroskopische und mikroskopische Betrachtung von aus Wüstenspringmäusen isoliertem Metazestodengewebe zeigt, daß es sich bei T1 um sehr zystenreiches und bei K188 um ein sehr protoskolexreiches Gewebe handelt und daß H95 ein relativ ausgewogenes Verhältnis von Zysten- zu Protoskolexgewebe zeigt, wies dies auf eine mögliche stadienspezifische Expression von *elp* hin.

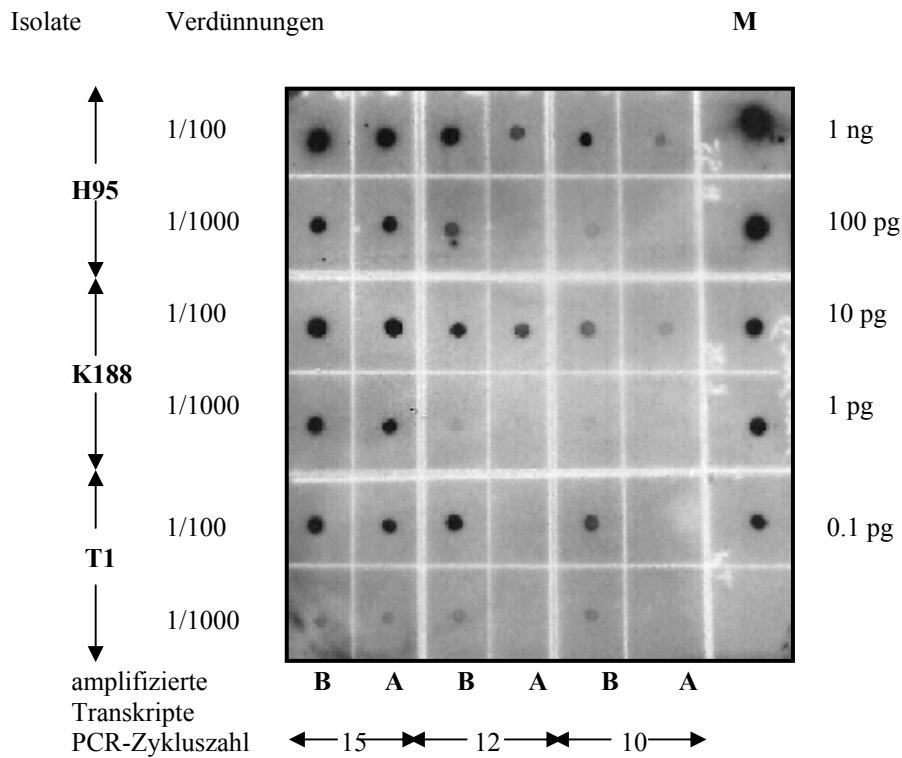


Abb.11: **Dot Blot zur Untersuchung der isolatspezifischen Expressionsverhältnisse von *elp* bei *E. multilocularis*.** Auf die Nylonmembran wurden jeweils 1 μ l einer 10, 12 bzw. 15 Zyklen-PCR aufgetragen. Als Template für die Reaktion wurde cDNA der Isolate H95, K188 und T1 in 1/100 bzw. 1/1000 Verdünnung eingesetzt. Zur Amplifikation von Transkript A von *elp* wurde die Primerkombination EP6 \times EP13 und für Transkript B EP6 \times SL-ATG eingesetzt (unterhalb der Abb. durch A und B für das jeweilige amplifizierte Transkript angegeben). Je 1 μ l des DIG- markierten Markers wurde in der äußeren rechten Spalte (gekennzeichnet durch M) in von oben nach unten exponentiell abnehmender Konzentration aufgetragen. Links neben der Abbildung sind die jeweils eingesetzten Templateverdünnungen der untersuchten Isolate angegeben. Für alle drei Isolate konnte für Transkript B ein vielfach stärkeres Signal auf dem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

4.2.5 Untersuchungen zur stadienspezifischen Expression der *elp* Transkripte

4.2.5.1 Analyse per RT-PCR und anschließender Hybridisierung mit einer *elp*-spezifischen Sonde

Zur genauen Analyse auf eine mögliche stadienspezifische Expression wurde direkt mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kit RNA aus Protoskolizes und aus Metazestodengewebe extrahiert. Die Protoskolizes wurden manuell aus Parasitenmaterial des Isolates K188 und die Zysten aus der *in vitro* Kultur (ebenfalls K188) isoliert. Diese RNA wurde revers transkribiert und mit spezifischen Primern für Transkript A (EM6 und EP13) und B (EM6 und SLOLAP) amplifiziert. Nach Blotten des Gels auf die Nylonmembran wurde mit 100 ng einer *elp* spezifischen DIG-markierten Sonde (zur Sondenherstellung siehe Material und Methoden) hybridisiert.

Über Digoxigenin-Nachweis mit CSPD[®] konnte ein Signal auf dem Röntgenfilm für die über 25 PCR-Zyklen amplifizierten Transkripte aus Zyste und Protoskolex nachgewiesen werden. Dieser Versuch gibt einen Hinweis auf die quantitative Dominanz von Transkript B gegenüber Transkript A für beide Entwicklungsstadien und unterstützt damit die zuvor gestellte Vermutung, daß in Metazestoden vermehrt das trans-gespleißte Transkript B und in Protoskolizes das cis-gespleißte Transkript A exprimiert (siehe Abb. 13).

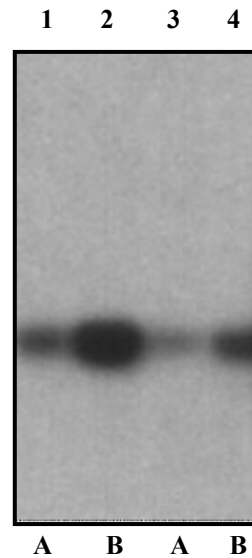


Abb.13: **Analyse der stadienspezifischen Expression von Transkript A und B von *E. multilocularis* durch Hybridisierung mit einer *elp* spezifischen Sonde.** Die aus Metazestoden-RNA über 25 Zyklen amplifizierte *elp* Transkripte A und B, die mit einer DIG-markierten Sonde für Gesamt-*elp* hybridisiert wurden, sind in den Spuren 1 und 2 dargestellt. Spur 3 und 4: Darstellung der unter gleichen Bedingungen durchgeführten Untersuchungen mit Protoskolex-RNA als Template. Die Amplifikation von Transkript A erfolgte mit der Primerkombination EM6×EP13, die von Transkript B mit EM6×SLOLAP. Die jeweiligen Primerkombinationen sind durch A und B in Anlehnung an die amplifizierte Transkripte gekennzeichnet. 10 µl des PCR-Gemisches wurden auf das Gel aufgetragen und der Röntgenfilm für 10 Sek. mit dem Signal auf der Nylonmembran in Kontakt gebracht.

4.2.5.2 Genaue quantitative Analyse des Expressionsverhältnisses per kompetitive PCR

Zur definitiven Untersuchung der stadienspezifischen Expression von *elp* unabhängig von der jeweils eingesetzten RNA bzw. DNA-Menge wurde eine kompetitive PCR in Anlehnung an eine bereits beschriebene Methode (Diviacco et al., 1992; Reddy et al., 1991) durchgeführt (siehe Material und Methoden). Für den Kompetitor wurde eine Verdünnungsreihe in Konzentrationen von 1×10^6 , 5×10^5 , 2.5×10^5 , 1.2×10^5 , 6×10^4 und 3×10^4 Molekülen pro µl erstellt.

Jeweils 1 µl einer der Verdünnungen wurde zusammen mit 1 µl cDNA als Template in einer PCR -Reaktion eingesetzt. Die cDNA wurde nach dem SMARTTM cDNA

Synthese Protokoll (Clontech) aus einer RNA-Präparation (RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen) von 50 Protoskolizes bzw. 30 etwa 1 mm im Durchmesser betragenden Zysten hergestellt. Folgende Primerkombinationen wurden eingesetzt: EM6×EM-CIS5, spezifisch für das Exon I beinhaltende Transkript A und EM6×EM-SL, spezifisch für das den Spliced Leader beinhaltende Transkript B. 10 µl wurden je Reaktionsansatz in einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Das größere Fragment einer jeden PCR im Gel entspricht der Bande des 74 bp größeren Kompetitors und das kleinere Fragment der amplifizierten cDNA.

In der Protoskolex-Fraktion wurde eine Equimolarität zwischen Kompetitor und cDNA erreicht bei einer Konzentration von etwa 1.2×10^5 Molekülen für Transkript A und etwa 2.5×10^5 Molekülen für Transkript B. Für die Metazestoden-spezifischen PCR Ansätze lagen die Konzentrationen entsprechend bei 2.5×10^5 und 5×10^5 Molekülen. Dieses Ergebnis belegt, daß die *elp*-Transkripte A und B in beiden Entwicklungsstadien Zyste und Protoskolex in einem konstanten Verhältnis von 1:2 exprimiert werden. Eine stadienspezifische Expression dieser unterschiedlich gespleißten Produkte konnte zumindest für K188 somit nicht nachgewiesen werden.

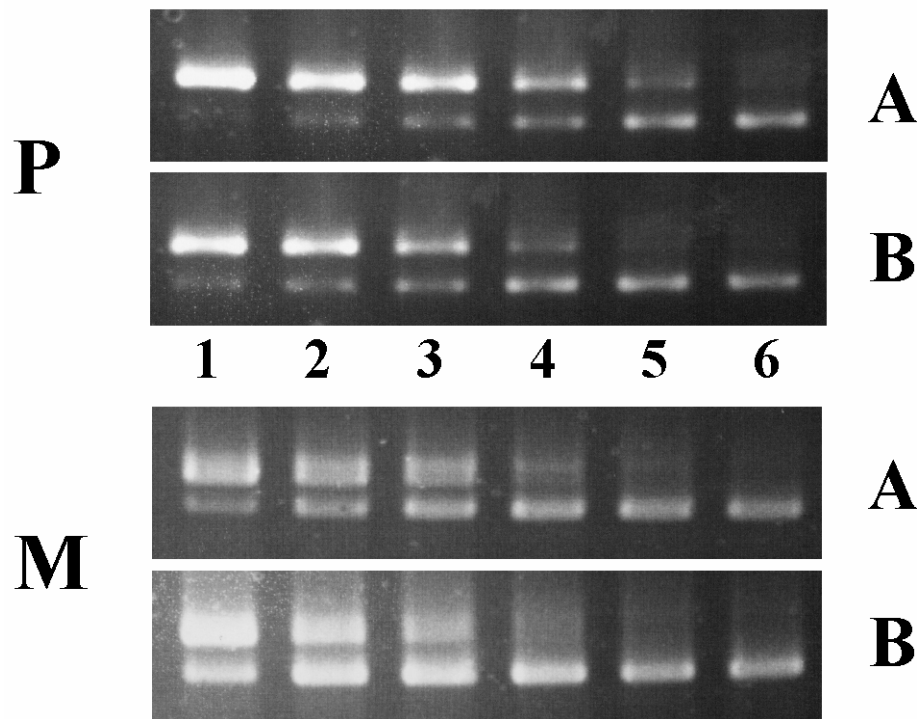


Abb.14: Elektrophoretische Auftrennung der kompetitiven PCR zur Untersuchung der Expressionsverhältnisse alternativer *elp*- Transkripte von Metazestoden und Protoskolizes aus *E. multilocularis*. Nach in vitro Kultivierung von *E. multilocularis* Larven wurden aus 50 Protoskolizes bzw. 30 Metazestoden (Durchmesser etwa 1 mm) die totale RNA isoliert, anschließend mit Hilfe von Oligo-(dT)-Primern revers transkribiert und die entstandene cDNA in ein 50 μ l Volumen aufgenommen. Jeweils 1 μ l der so konstruierten cDNA wurde pro 30 μ l PCR-Ansatz zusammen mit 1×10^6 (Spur 1), 5×10^5 (Spur 2), 2.5×10^5 (Spur 3), 1.2×10^5 (Spur 4), 6×10^4 (Spur 5) bzw. 3×10^4 (Spur 6) Molekülen Kompetitor eingesetzt. Je Reaktionsansatz wurde entweder die Primerkombination EM6 \times EM-CIS5 spezifisch für das Exon I beinhaltende Transkript A oder EM6 \times EM-SL für das den Spliced Leader beinhaltende Transkript B eingesetzt. In einer jeden Spur stellt die obere Bande das Amplifikat des Kompetitors dar. Bei der unteren Bande handelt es sich um das 74 bp kleinere Amplifikat der cDNA. In der Protoskolexfraction wurde eine Equimolarität zwischen cDNA und Kompetitor bei etwa 1.2×10^5 Molekülen für Transkript A und 2.5×10^5 Molekülen für Transkript B erreicht. In der Metazestodenfraction können etwa gleich starke Banden identifiziert werden bei etwa 2.5×10^5 bzw. 5×10^5 Molekülen für Transkript A bzw. Transkript B. Somit besteht für beide Entwicklungsstadien ein etwa 1:2 Expressionsverhältnis von konventionell cis-gespleißtem zu trans-gespleißtem *elp* aus *E. multilocularis*.

4.2.6 Identifikation eines alternativen primären *elp*-Transkriptes

Im Falle von *elp* liegt die ungewöhnliche bisher noch nicht beschriebene Situation vor, daß zwei unterschiedliche Transkripte für ein identisches Protein kodieren. Ob Cis- und Trans-Spleißen an der Splice Akzeptorstelle stromaufwärts von Exon II an derselben prä-mRNA stattfinden, oder ob hierfür ebenfalls zwei unterschiedliche primäre Transkripte zur Verfügung stehen, galt es hier zu analysieren. Conrad et al. (1991 und 1993) haben für *C. elegans* gezeigt, daß abhängig von der Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer Splice Donorstelle stromaufwärts eines bestimmten Splice Akzeptors an dieser Stelle in cis- bzw. trans gespleißt wird. Auf *elp* bezogen könnte dies bedeuten, daß ein langes Transkript mit komplettem 5'-Intron von *elp* existiert sowie ein kürzeres Transkript, welches im Gegensatz zu dem ersten keine Splice Donorstelle stromaufwärts des Splice Akzeptors aufweist.

Via RT-PCR wurde daher hier versucht das 5'-Ende eines alternativen primären Transkriptes von *elp* aus *E. multilocularis* zu identifizieren. Als Primer wurden die Grenzen von Exon IV und V überspannenden stromabwärts gelegenen Primer EM6 in Kombination mit 2 unterschiedlichen stromaufwärts gelegenen Primern (EM19 und EM24) im 5'-Intron verwendet. EM24 befindet sich 30 bp stromabwärts der 5' gelegenen Splice Donorstelle und EM19 13 bp stromaufwärts der Splice Akzeptorstelle am 3'-Ende des 5'-Introns (siehe Abb.15). Mit der Kombination EM6×EM19 konnte ein Fragment amplifiziert und direkt sequenziert werden. Die Sequenzierung ergab, daß das Fragment Intron I, II und III nicht mehr enthielt der 3'-Bereich des 5'-Introns jedoch noch enthalten war. Mit der Primerkombination EM6×EM24 konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden auch nicht bei Einsatz größerer RNA-Mengen als Template. Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Ergebnis, ist die Existenz eines zweiten Transkriptionsstartpunktes im 5'-Intron von *elp* zwischen den Sequenzen der Primer EM 24 und EM19. Dies würde bedeuten, daß mindestens zwei Primärtranskripte von *elp* existieren. Eines davon besitzt keine 5' Splice Donorstelle.

Unter Verwendung noch spezifischerer Oligonukleotide (EM29 und EM31), die im 5'-Intron von *elp* binden, konnte das alternative 5'-Ende der prä-mRNA zwischen 256 und 244 nt stromaufwärts der 5'-Intron Splice Akzeptorstelle lokalisiert werden (siehe Abb. 15). Mit der Kombination EM 6×EM29 konnte ein Fragment amplifiziert werden,

dessen Sequenzierung weder Intron I, II oder III enthielt. Mit der Kombination EM6×EM31 konnte hingegen kein PCR-Produkt amplifiziert werden.

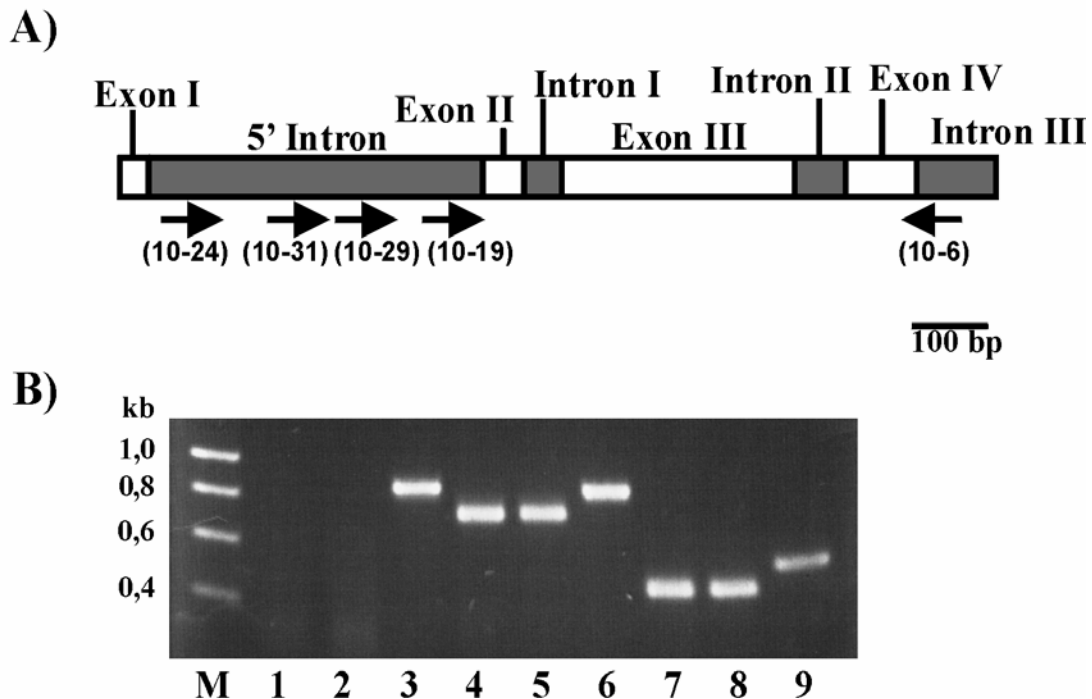


Abb. 15: **Annäherung an den Transkriptionsstartpunkt innerhalb des 5' Introns von *elp*.** A, Schematische Darstellung des chromosomalen Locus im Bereich des 5' Intron von *elp*. Angegeben sind Größe und Lokalisation der Exons (weiß) und Introns (grau). Die Primer zur Eingrenzung des Transkriptionsstartpunktes sind durch Pfeile wiedergegeben. B, PCR und RT-PCR Analyse. 2 µg Gesamt-RNA der Isolate H95 (Spur 1, 4 und 7) und K188 (Spur 2, 5 und 8) von *E. multilocularis* wurden in einem 30 µl Ansatz per RT-PCR (Titan, Roche Molecular Biochemicals) amplifiziert. Es wurden folgende Primerkombinationen eingesetzt: EM6×EM31 (Spur 1 und 2), EM6×EM29 (Spur 4 und 5) und EM6×EM19 (Spur 7 und 8). 10 µl eines jeden Reaktionsansatzes wurden auf das 2%ige Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. Alle PCR-Produkte konnten direkt sequenziert werden. Als Kontrolle wurde chromosomale DNA (des Isolates H95) als Template für eine PCR-Reaktion mit allen 3 Primerkombinationen eingesetzt (Spur 3: EM6×EM31, Spur 6: EM6×EM29, Spur 9: EM6×EM19). Die Sequenzierung der RT-PCR Produkte für beide Isolate ergab Sequenzen, bei denen Intron I, II und III bereits entfernt, das 5' Intron jedoch bis zur Bindungsstelle des Primers EM29 noch vorhanden war (Spur 4, 5, 7 und 8). Keine Fragmente konnten mit der Primerkombination EM6×EM31 amplifiziert werden, obwohl diese Kombination mit chromosomaler DNA als Template ein positives Ergebnis erzielte.

4.3 Versuch der Identifizierung eines weiteren ERM-homologen Gens von *E. multilocularis*

Die für ERM-Proteine kodierenden Gene von Ezrin, Radixin und Moesin werden der Bande 4.1 Superfamilie zugeordnet. Homologe zu dieser Familie konnten bisher in unterschiedlichen Spezies identifiziert werden. So werden alle drei Faktoren z.B. beim Menschen und bei der Maus exprimiert. Die humanen ERM-Proteine weisen untereinander eine 75 %ige Gesamthomologierate und 83 % Homologien im Bereich des Amino-Terminus auf (Bretscher, 1999). *Elp* ist bisher das einzige ERM-ähnliche Protein, das bei *E. multilocularis* nachgewiesen werden konnte (Petra Frosch et al., 1991). In einem letzten Ansatz wurde in dieser Arbeit untersucht, ob *E. multilocularis* neben *Elp* zusätzliche ERM-homologe Faktoren exprimiert, welche möglicherweise ebenfalls durch alternatives Spleißen exprimiert werden und somit Hinweise zur Funktion dieses ungewöhnlichen Splicing Mechanismus geben könnten.

Die degenerative PCR wurde als Methode zur Amplifikation der Sequenz eines weiteren ERM homologen Proteins bei *E. multilocularis* gewählt. Zunächst wurden aus der SwissProt Datenbank die Proteinsequenzen von *elp*, sowie ERM-homologen Proteinen aus *C. elegans*, Drosophila, Mensch und diversen anderen Spezies bestimmt, deren verwandtschaftlichen Beziehungen bestimmt (MegAlign Computerprogramm) und ein Proteinsequenzalignment erstellt anhand dessen die degenerativen Oligonukleotide für die PCR konstruiert wurden. Mit dem ersten Satz degenerativer Primer (siehe Material und Methoden) konnten Fragmente in einem Größenbereich von 100 bis 3000 bp amplifiziert werden. Zur Minimierung des Hintergrundschmieres und der Bandenanzahl auf dem Gel wurde durch Erhöhung der Annealingtemperatur die Spezifität der PCR-Reaktion erhöht. Über Klonierung der PCR sowie Ausschneiden einer Bande aus dem Gel und Reamplifikation wurde versucht Fragmente mit entsprechender Größe gezielt zu isolieren. Außerdem wurde versucht mit einem neuen Satz weniger degenerierter Oligonukleotide die Anzahl der amplifizierten Fragmente reduziert.

Die Sequenzierungen der Klone führten zur Identifizierung einer ERM-homologen Sequenz, was die Funktionsfähigkeit der Methode bestätigt, doch handelte es sich dabei um das bereits bekannte Homolog *elp*. Die isolierten Sequenzen, bei denen es sich nicht

um *elp* handelte, weisen signifikante Homologien zu ganz unterschiedlichen Faktoren auf. Sie sind im Anhang ausführlich mit dem jeweiligen Ausschnitt aus dem Datenbank Proteinsequenzvergleich dargestellt.

5 DISKUSSION

Wie auch bei anderen parasitischen Helminthen sind genregulatorische Mechanismen bei *Echinococcus* bislang kaum oder nur ansatzweise untersucht. Entsprechende Untersuchungen und Kenntnisse wären jedoch wichtig um neben dem bereits etablierten *in vitro*-Kultursystem für Echinokokken auch Methoden zur reversen Genetik etablieren zu können. Entsprechende Versuchsansätze wurden bisher bei *S. mansoni*, *Ascaris lumbricoides* und *C. elegans* durchgeführt, wo über Transfektionsstudien wichtige Erkenntnisse über genregulatorische Mechanismen der untersuchten Organismen gewonnen werden konnten (Davis et al., 1999; Wippensteg et al., 2002).

In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals Studien zur Untersuchung genregulatorischer Mechanismen für einen Faktor von *Echinococcus* durchgeführt. Als Model-Gen wurde *elp* gewählt, das für ein immundominantes Protein kodiert und für das zum Zeitpunkt der Arbeit bereits geeignete Antikörper sowie der chromosomale Locus bekannt waren. Zudem war davon auszugehen, daß *elp*, als wichtige Komponente des kortikalen Zytoskelett, einen relativ stark exprimierten Promotor besitzt.

Ausgehend vom klonierten chromosomalen *elp*-Locus wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Transkriptionsstartpunkt von *elp* bestimmt, um Promotorstrukturen identifizieren zu können. Dabei konnte gezeigt werden, daß sich am 5'-Ende der Sequenz ein relativ ungewöhnliches Intron befindet – ein sogenanntes 5'-Intron, welches zwischen dem Transkriptions- und dem Translationsstartpunkt lokalisiert ist. In anderen Arbeiten konnte bisher gezeigt werden, daß in einigen Fällen Gene mit 5'-Introns über Promotorenwechsel reguliert werden, wobei alternative 5'-Exons als Reaktion auf externe Stimuli alternativ gespleißt werden (Kozak, 1991). Meistens werden hierbei 5'-Exons, die überladen sind mit ATG-Codons, die nicht das „korrekte“ Startcodon des Proteins darstellen, durch Exons, die keine die Translation behindernde ATG-Codons besitzen, ersetzt, so daß eine effektive Translation des Faktors stattfinden kann.

Eine Analyse der potentiellen Promotorregion der chromosomalen Sequenz von *elp* von *E. multilocularis* zeigte, daß keine der typischen konservierten genregulatorischen Sequenzen wie TATA- oder CAAT-Box nachweisbar sind. Dementsprechend ist davon auszugehen, daß *elp* entweder nicht über derartige konservierte Sequenzen wie sie

bisher für Säuger charakterisiert wurden exprimiert wird, oder daß es über noch unbekannte, komplexe, zusätzliche Transkriptionsregulatoren, deren Konsensussequenz sich von den Konsensussequenzen anderer Regulationselementen von Säugern unterscheidet, exprimiert wird. Andererseits konnten diverse Formen AT-reicher Sequenzen 30 bzw. 55 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts von *elp* (TTTGAAA und AAATTAAA) identifiziert werden. Diese können möglicherweise die TATA-Box funktionell ersetzen (Singer et al., 1990). Des weiteren paßt die 14 bp stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts gelegene CTCCCG-Sequenz perfekt zu dem von Larson et al. (1995) beschriebenen CTNCNG-Konsensusmotiv für stromabwärts gelegene Promotorsignalsequenzen in eukaryontischen Zellen. Da im wahrscheinlichen Bereich des *elp* Promotors ein etwa 10fach erhöhtes Auftreten von CG-Dinukleotiden gegenüber den stromauf- und stromabwärts gelegenen Bereichen nachgewiesen werden konnte, besteht außerdem die Möglichkeit, daß die Expression von *elp* über DNA-Methylierung, wie schon für CpG-Inseln beschrieben, reguliert wird (Cross & Bird, 1995).

Für genaue Aussagen über konservierte Promotorelemente bei *Echinococcus* werden weitere Studien benötigt. Nach Etablierung eines Systems für Transfektionsstudien, könnten z. B. die essentiellen Promotorelemente des *elp* Promotors über Deletion bestimmt werden. Außerdem könnte zur näheren Charakterisierung versucht werden Reportergene über *elp* Promotorelemente in Säugierzellen zu exprimieren. Möglicherweise sind Studien zur Funktion des *elp* Promotors in Säugierzellen jedoch nur bedingt auf die Situation bei *Echinococcus* übertragbar, da Helminthen und Mammalia nur einen relativ geringen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Alternativ würden sich für derartige Studien kürzlich isolierte Molluskenzellen anbieten, da diese eine viel engere verwandtschaftliche Beziehung zu den Plathelminthen aufweisen (Adoutte et al., 1999; Basch & DiConza, 1973). Die beste Möglichkeit wäre eine Expression in Echinokokken Zelllinien, an deren Etablierung derzeit verstärkt gearbeitet wird (Brehm, persönl. Mitteilung).

Interessanterweise konnte für *elp* nicht nur das in dieser Arbeit zunächst bearbeitete Transkript (Transkript A) detektiert werden, sondern auch ein alternatives Transkript B, welches sich von dem bereits bekannten Transkript lediglich in einem kurzen

Sequenzabschnitt (36 nt) am 5' Ende unterscheidet (Brehm, persönl. Mitteilung). Um dieses alternative Transkript näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Studien durchgeführt. Anhand der Sequenz des 36 nt langen Exons lag die Vermutung nahe, daß es sich um einen Spliced Leader (SL) handelt, der wie schon bei *S. mansoni* und *T. brucei* beschrieben über Trans-Spleißen an das 5' Ende einer mRNA fusioniert wird (Donelson & Zeng, 1990). Dies wurde dadurch unterstützt, daß die Ansatzstelle des SL sich genau an der Position befand, wo auf der chromosomalen *elp* Sequenz eine Splice Akzeptorstelle lokalisiert ist. Der Mechanismus des Trans-Spleißens war bei Cestoden bislang nicht beschrieben worden. Es wurde sogar anhand von Untersuchungen bei anderen Cestoden davon ausgegangen, daß im Gegensatz zu Trematoden und Turbellaria SL-Trans-Spleißen bei Cestoden nicht zur Genexpression benutzt wird (Davis et al., 1994; Davis, 1997; Davis und Hodgson, 1997; Rajkovic et al., 1990). Daß es sich bei dieser 36 nt Sequenz von *E. multilocularis* jedoch in der Tat um einen SL handelt konnte in dieser Arbeit anhand verschiedener Untersuchungen belegt werden.

Zunächst wurde gezeigt, daß die 36 nt Sequenz nicht nur am 5' Ende von *elp*, sondern auch am 5' Ende einer Reihe weiterer mRNAs, welche an ganz unterschiedlichen biochemischen Prozessen der Zelle beteiligt sind, zu finden ist. Entsprechende Gene für die SL-mRNAs von *E. multilocularis* konnten charakterisiert werden und dabei konnte gezeigt werden, daß direkt stromaufwärts der Fusionsstelle des 36 nt Exons mit der mRNA genau wie bei *elp* eine Konsensus- Splice Akzeptorstelle lokalisiert ist (K.Brehm, persönl. Mitteilung).

Außerdem konnte die Sequenz des zugehörigen Gens für die SL-RNA von *E. multilocularis* in dieser Arbeit identifiziert werden und durch strukturelle Analysen gezeigt werden, daß die Sekundärstruktur des SL von *E. multilocularis* der von anderen bereits charakterisierten SLs entspricht (Blaxter & Lui, 1996; Blumenthal, 1995; Davis, 1996; Nilson, 1993 & 1995). Der SL bildet über Basenpaarung den Hauptteil der ersten stem loop der aus drei stem loops aufgebaut Struktur. Zwischen der zweiten und dritten stem loop befindet sich eine potentielle Sm-Bindestelle, die absolut übereinstimmt mit der bekannten Konsensussequenz der Sm-Bindestellen für Plathelminthen (VRU₁-₄MU₃GR) (Davis, 1997). Anhand dieser Daten kann davon ausgegangen werden, daß es

sich bei dieser 36 nt Sequenz von *E. multilocularis* in der Tat um einen SL aus Cestoden handelt.

Die genaue Analyse des SL bzw. des SL-Gens von *E. multilocularis* in dieser Arbeit führte zur Identifizierung weiterer struktureller Besonderheiten des SL. Der Homologievergleich der SL-mRNA von Echinokokken mit denen von anderen Plathelminthen, Nematoden und Protozoen steht in Einklang mit der phylogenetischen Position der Cestoden. Es bestehen keine Sequenzhomologien zwischen der SL-RNA der Echinokokken zu der von Nematoden und Kinetoplastiden. Es konnten aber signifikante Homologien zu der SL-RNA und SL-Sequenz von Trematoden und Turbellaria aufgezeigt werden. Die signifikanten Homologien zwischen den SL-Sequenzen aller Plattwürmer lassen sogar vermuten, daß alle bisher identifizierten Plathelminthen-SLs von einem gemeinsamen Ursprungsgen abstammen.

Ein hochkonserviertes Merkmal der SL-Sequenz von Plathelminthen ist die Anwesenheit eines AUG-Triplets am 3'-Ende der Sequenz (Davis et al., 1995). Homologievergleiche haben gezeigt, daß dieses 3'AUG der SL von Trematoden und Turbellaria auch bei Cestoden-SL hochkonserviert ist. Dieser Grad der Konservierung läßt eine wichtige Rolle des AUG für die Plathelminthen vermuten. Was sind jedoch mögliche Funktionen des AUG, die eine solche Konservierung begründen könnten? Das 3' AUG des SL könnte nach der „first-ATG-rule“ als Translationsstartpunkt fungieren (Kozak, 1991). Analysen in dieser Arbeit haben gezeigt, daß bei zwei der charakterisierten 12 Transkripte das SL-AUG offensichtlich den Translationsstartpunkt zur Verfügung stellt wohingegen bei sieben anderen eine Funktion als Translationsstart ausgeschlossen werden konnte, da das SL-AUG sich hier nicht im selben Leseraster mit dem wahrscheinliche ORF befindet. Bei drei Faktoren, inklusive *elp*, befindet sich das 3'-AUG des SL in frame mit dem wahrscheinlichen Start-AUG. N-terminale Proteinsequenzierungsstudien an *Elp* haben jedoch gezeigt, daß nicht das AUG des SL, sondern das weiter stromabwärts gelegene AUG als Startcodon fungiert (Brehm, persönliche Mitteilung). Daher ist anzunehmen, daß auch für andere trans-gespleißte mRNAs mit dem SL-AUG in frame mit dem eigentlichen kodierenden Leseraster des Proteins, dieses SL-AUG nicht als Translationsstartpunkt verwendet wird. Dies entspricht im Wesentlichen der Situation wie sie bei *F. hepatica* beschrieben wurde

(Davis et al., 1995). Ob die gelegentliche Bereitstellung eines AUG als Translationsstartpunkt die einzige Funktion des SL-AUG darstellt, muß in weiteren Studien noch gezeigt werden.

Für alle bisher untersuchten SL ist bekannt, daß das ca. 100-150 nt SL-RNA-Gen einen Teil genomischer Fragmente darstellt, die 100-500fach repetiert auf der genomischen DNA in einer Größenordnung von 0,4 -1,35 kb vorliegen (sogenannte SL-Repeats) (Donelson & Zeng, 1990; Nilsen, 1993). Das in dieser Arbeit charakterisierte SL-RNA Gen von *Echinococcus* liegt ebenfalls auf solch einem Repeat, welches mit ca. 1,5 kb im Gegensatz zu den anderen Repeats etwas größer ist. Der phylogenetischen Position der Echinokokken entsprechend, beinhaltet der Repeat keine kodierende Sequenz für eine 5S rRNA wie z.B. bei Nematoden (Nilsen, 1993), Euglena (Keller et al., 1992) und Trypanosomen (Aksoy et al., 1992) beschrieben werden konnte. Auch konnte keine proteinkodierende Sequenz innerhalb des Repeats identifiziert werden, was wiederum mit dem SL-chromosomalen Lokus anderer Organismen übereinstimmt (Nilsen, 1993).

In dieser Arbeit konnte auch ein zu dem SL-RNA-Gen von *E. multilocularis* hoch homologes Gen von *E. granulosus* identifiziert werden. Die Sequenzen des Repeats der beiden Spezies sind auf der gesamten Länge 87% homolog zueinander und im Bereich der SL-RNA-Sequenz beträgt die Homologie 97%. Obwohl der zugehörige Repeat von *E. granulosus* (1555 bp) etwas größer ist als der von *E. multilocularis* (1513 bp), lassen die Sequenzhomologien doch einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung vermuten. Daher ist davon auszugehen, daß auch der Hundebandwurm Trans-Spleißen als Form der Genexpression verwendet. Mittlerweile konnten unter Ausnutzung der in dieser Arbeit identifizierten Sequenzen bereits cDNA Bibliotheken von *E. granulosus* erstellt werden (Fernandez et al., 2002). In Anbetracht der Tatsache, daß sowohl *E. granulosus* als auch *E. multilocularis* SL-Trans-Spleißen verwenden und die SL-Sequenzen von Echinokokken, Trematoden, Trypanosomen und Nematoden hoch homolog sind, ist anzunehmen, daß alle Cestoden zur mRNA-Prozessierung SLs verwenden, die denen von *Echinococcus* ähnlich sind. Unterstützt wird dies dadurch, daß kürzlich bei *Taenia solium* ein zum Echinokokken-SL hoch homologer Faktor identifiziert werden konnte (Brehm et al., 2002).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die für *E. multilocularis* identifizierten trans-gespleißten mRNAs Proteine kodieren, welche an ganz unterschiedlichen Prozessen in der Zelle beteiligt sind. Unter den zwölf hier identifizierten trans-gespleißten mRNAs weisen zwei der kodierten Produkte signifikante Homologien auf zu den aus *F. hepatica* und *S. mansoni* charakterisierten Faktoren Fruktosebiphosphonataldolase und Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase Bindeprotein. Die entsprechenden mRNAs werden zwar bei Echinokokken nicht jedoch bei den genannten Trematoden trans-gespleißt (Davis & Hodgson, 1997; El-Dabaa, 1998). Auch bei einem zu *Elp* hoch homologen Faktor aus *S. japonicum* besteht kein Hinweis, daß dieser trans gespleißt wird (El-Dabaa, 1998). Wie bereits dargelegt, besitzen die SLs von Trematoden und Cestoden wahrscheinlich einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung. Es werden jedoch anscheinend in beiden phylogenetischen Gruppen nicht dieselben mRNAs trans-gespleißt (Davis, 1996). Dies läßt vermuten, daß sich die Spektren der trans-gespleißten Gene nicht oder nur teilweise überschneiden. Unterschiede im Muster der Trans-Splicing-Faktoren können demnach auch innerhalb eines Tierstammes und für SLs desselben phylogenetischen Ursprungs festgestellt werden. Die argumentiert gegen eine generelle Korrelation zwischen Trans-Spleißen einer mRNA und der biologischen Funktion des entsprechenden Proteins.

Die hier durchgeführten Analysen bei *elp* haben gezeigt, daß *elp* über zwei Transkripte exprimiert wird, welche offenbar durch alternatives Cis/Trans-Spleißen an derselben Splice Akzeptorstelle am 5'Intron prozessiert werden. Wie kommt es zu dieser alternativen Expression? Liegen den zwei Transkripten eventuell auch zwei Primärtranskripte zu Grunde, die aufgrund ihrer Struktur cis- oder trans-gespleißt werden oder wird ein einziges Primärtranskript alternativ in cis- und in trans-gespleißt? Analysen in dieser Arbeit haben gezeigt, daß neben dem Transkriptionsstartpunkt stromaufwärts des 5'Introns ein zweiter Transkriptionsstartpunkt existiert, welcher im 5'Intron lokalisiert ist. Vorherige Studien an *C. elegans* haben gezeigt, daß alternatives Cis/Trans-Spleißen davon abhängt, ob stromaufwärts einer Splice Akzeptorstelle eine Splice Donorstelle anwesend ist (Conrad et al., 1991 & 1993). Nicht spezielle Sequenzmotive im Bereich der 3'splice site scheinen demnach verantwortlich zu sein für die Art des Splicingmodus, sondern das alleinige Vorliegen eines 5' splice donor. Es

ist demnach vernünftig anzunehmen, daß das längere Transkript von *elp*, welches sowohl einen Splice Donor als auch einen Splice Akzeptor enthält, über konservatives Spleißen Prozessiert wird und somit als Vorlage für das reife Transkript A dient. Dem entsprechend sollte das trans-gespleißte Transkript B aus dem kürzeren Primärtranskript hervorgehen, welches lediglich den Splice Akzeptor beinhaltet.

Alternatives Cis/Trans-Spleißen an einem internen Intron konnte bereits bei der HMG-CoA-Reduktase von *S. mansoni* nachgewiesen werden (Rajkovic et al., 1990; Hamdan & Ribeiro, 1998). Durch alternatives Spleißen entstehen hier jedoch Transkripte, die für ein vollständiges und ein verkürztes Protein kodieren und daher vermutlich an regulativen Vorgängen auf Proteinebene beteiligt sind. Bei *elp* hingegen wird ein identisches Protein durch zwei alternativ cis/trans-gespleißte Transkripte kodiert. Es stellt sich daher die Frage nach der Signifikanz dieser unterschiedlichen Transkripte bei *elp*.

Es konnte gezeigt werden, daß es durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren zur Expression von *elp* über zwei verschiedene Primärtranskripte kommt. Es wäre demnach möglich, daß einer der *elp*-Promotoren nur in einem Entwicklungsstadium oder in einem Zelltypus verwendet wird und der andere Promotor in einem anderen Zell- oder Entwicklungsstadium. Dies könnte dazu führen, daß *elp* zwangsläufig in einem Entwicklungs- Zellstadium durch Cis-Spleißen und in einem anderen Stadium durch Trans-Spleißen exprimiert wird. Ein entwicklungsspezifischer Promotorwechsel ist jedoch den Untersuchungen dieser Arbeit zufolge nicht anzunehmen, da ein konstantes Expressionsverhältnis von cis- zu trans-gespleißtem *elp* von 1:2 in beiden Larvenstadien, Metazestode und Protoskolex, nachgewiesen werden konnte. Dieses konstante Verhältnis in den morphologisch unterscheidlichen Larvenstadien schließt auch einen zytospezifischen Promotorenswitch weitestgehend aus, da hierfür die entsprechenden Zelltypen in Protoskolex und Metazestode in annähernd gleichem Verhältnis vorliegen müßten. Wahrscheinlich werden cis- und trans-gespleißtes *elp* demnach zur selben Zeit in derselben Zelle exprimiert.

Polycistronische Transkripte werden bei Trypanosomen und *C. elegans* via Trans-Spleißen aufgelöst. (Blumenthal, 1995; Clayton, 1992; Davis; Spieth et al., 1996; Ullu & 1993; Zorio et al., 1994) . Zumindest im Falle von *elp* ist es jedoch unwahrscheinlich,

daß Trans-Spleißen auch bei *E. multilocularis* zur Auflösung polycistronischer Transkripte zum Einsatz kommt, da *elp* als Monocistron exprimiert wird.

Ohne weitere nähere Untersuchungen der *elp* Transkripten können definitive Aussagen zur Signifikanz des alternativen Cis/Trans-Spleißens bei *elp* nicht gemacht. In Anlehnung an Daten von *Ascaris* sollten entsprechende Studien einen Einfluß auf die Transkriptstabilität, die Translationseffizienz sowie den intrazellulären Transport der unterschiedlichen Transkripte von *elp* beinhalten (Davis, 1996; Maroney et al., 1995; Nilsen, 1993). Anhand des besonderen Splicing-Mechanismus bietet sich *elp* als hoch interessantes Modellsystem an, um die biologische Signifikanz des SL-RNA-Trans-Spleißens zu untersuchen.

Neben den bislang durchgeführten Untersuchungen zum ERM-homologen Faktor Elp wurde in der vorliegenden Arbeit auch versucht, weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie zu identifizieren. Die Studien bei Vertebraten hatten ergeben, daß neben Ezrin, Radixin und Moesin auch ein Merlin vorhanden ist (Tsukita et al., 1997; Vaheri et al., 1997). Studien bei *Drosophila* hatten gezeigt, daß hier die Funktion von Ezrin, Radixin und Moesin vermutlich von nur einem ERM-homologen Protein übernommen wird, zusätzlich aber auch ein Merlin-Homologes exprimiert wird (McCartney & Fehon, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte über degenerative PCR nur das bereits bekannte ERM-homologe *elp* bei *E. multilocularis* identifiziert kein weiterer ERM-homologer oder Merlin-homologer Faktor. Es ist demnach davon auszugehen, daß *E. multilocularis* wie *Drosophila* und *C. elegans* nur ein einziges ERM-Homologes exprimiert, was durch Proteininteraktionsstudien von K. Hubert (1999) unterstützt wird, bei denen kein zusätzlicher ERM-homologer Faktor als Bindungspartner für *elp* charakterisiert werden konnte. Ob Echinokokken ein zusätzliches Merlin exprimieren, kann anhand der vorliegenden Daten nicht definitiv bestimmt werden. Da jedoch auch bei *C. elegans* offenbar kein Merlin-Homologes vorliegt, ist dies für Plathelminthen nicht auszuschließen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals ein SL-Gen aus *E. multilocularis* und *E. granulosus* charakterisiert werden und wichtige Daten des Mechanismus dieses Prozesses bei Cestoden beschrieben werden. Die Identifizierung neuer Gene

insbesondere bei parasitischen Helminthen ist u.a. aufgrund des quantitativ begrenzten Ausgangsmaterials schwierig. Durch die Entdeckung des Trans-Spleißens bei Protozoen, Nematoden und Trematoden konnten bereits cDNA-Genbanken trans-gespleißter mRNAs über PCR erstellt werden. Der Nachweis einer SL-Sequenz bei *Echinococcus* ermöglicht somit intensive Analysen der trans-gespleißten Faktoren und sollte zu einer genauen genetischen Charakterisierung des Parasiten beitragen (Blaxter, & Liu, 1996; Blaxter et al., 1996; Davis, 1995; El-Sayed. et al., 1995; Henkle-Duhrsen et al., 1995; Martin et al., 1995; Levick et al., 1996). Weiterhin hat sich gezeigt, daß Trans-Spleißen neben Trematoden und Nematoden auch von Cestoden und damit allen relevanten parasitischen Helminthen zur Expression zellulär wichtiger Faktoren genutzt wird, offenbar jedoch nicht von Säugerwirten. Daher eignet es sich als potentieller Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Chemotherapeutika. Hierfür werden jedoch noch weitere ausführliche, molekularbiologische Studien notwendig.

6 ZUSAMMENFASSUNG

SL-Trans-Spleißen ist ein Mechanismus zur Transkriptprozessierung, welcher bisher bei kinetoplastiden Protozoen, Trematoden und Nematoden beschrieben wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Gen für einen Spliced Leader (SL) aus den Cestoden *E. multilocularis* und *E. granulosus* charakterisiert. Ausgangspunkt waren Studien zur Genregulation des *E. multilocularis* Gens *elp*, welches für einen Faktor der ERM-Familie kodiert. Es konnte gezeigt werden, daß *elp* über mindestens zwei unterschiedliche Transkripte kodiert wird. Für eines dieser Transkripte konnte gezeigt werden, daß ein 32 Nukleotide langes, nicht-proteinkodierendes Exon über konservatives Spleißen mit dem startmethionin-kodierenden Exon II der *elp*-mRNA fusioniert wird. Der entsprechende Transkriptionsstartpunkt und zugehörige Promotorstrukturen konnten auf dem *E. multilocularis* Chromosom identifiziert werden. Ein zweites Transkript enthielt anstelle des 32 nt Exon I von *elp* ein alternatives 36 nt langes Exon am 5'-Ende, welches nicht Teil des genomischen *elp* Locus ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß dieses 36 nt lange Exon einen Spliced Leader (SL) von *E. multilocularis* darstellt. Eine Analyse von *E. multilocularis* cDNA-Bibliotheken ergab, daß sich das 36 nt Exon nicht nur am 5'-Ende der *elp*-mRNA befindet, sondern in identischer Form auch am 5'-Ende von mindestens elf anderen mRNAs von *E. multilocularis*. Das zugehörige SL-RNA-Gen konnte isoliert und vollständig charakterisiert werden. Es befand sich auf einem 1513 bp langen Fragment, welches auf dem *E. multilocularis* Genom als mehrfacher Repeat angeordnet ist. Auf DNA-Sequenzebene konnte gezeigt werden, daß dieses Gen signifikante Homologien zu bereits bekannten SL-RNA-Sequenzen von Trematoden und Turbellaria nicht jedoch zu solchen von Nematoden und kinetoplastiden Protozoen aufweist. Die Sekundärstruktur der kodierten SL-RNA besitzt zudem strukturelle Charakteristika, die für SL-RNAs anderer Organismen bereits bekannt sind. Zusammengenommen lassen diese Daten den Schluß zu, daß es sich bei dem 36 nt langen Exon in der Tat um einen SL von *E. multilocularis* handelt.

Die für *E. multilocularis* identifizierten trans-gespleißten mRNAs kodieren für Faktoren, welche an einer Reihe unterschiedlicher Prozesse in der Zelle beteiligt sind. Signifikante Unterschiede in den Spektren der trans-gespleißten Faktoren bei *Echinococcus* und anderen Plathelminthen können als Hinweis gewertet werden, daß

keine generelle Korrelation besteht zwischen Trans-Spleißen einer bestimmten mRNA und der biologischen Funktion des Faktors.

Ein zum SL-Gen von *E. multilocularis* hoch homologes Gen konnte zudem auf chromosomaler DNA des Hundebandwurms *E. granulosus* identifiziert werden. Trans-Spleißen wird demnach nicht nur vom Fuchsbandwurm, sondern auch vom Hundebandwurm zur Genexpression genutzt.

Im Falle von *elp* besteht die ungewöhnliche Situation, daß ein identisches Protein zwei verschiedene Transkripte kodiert von denen eines konventionell und das andere transgespleißt wird. Der Regulationsmechanismus dieses alternativen Cis/Trans-Spleißens wurde in dieser Arbeit untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, daß den zwei *elp* Transkripten auch zwei unterschiedliche Primärtranskripte zugrunde liegen. Die dabei erlangten Daten stehen in Einklang mit dem gegenwärtigen Modell, daß alternatives Cis/Trans-Spleißen an einer Splice Akzeptorstelle ausschließlich vom Vorhandensein einer stromaufwärts gelegenen Splice Donorstelle abhängt. Weitere Studien haben gezeigt, daß die Expression der trans-oder cis-gespleißten *elp*-mRNA weder stadien- noch isolat-oder zytospezifische ist. Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit erstmals umfassende Daten zum Mechanismus des Trans-Spleißens bei einem Cestoden erlangt werden, was sich für weitere molekularbiologische Untersuchungen an diesem Organismus hervorragend ausnutzen läßt.

In einer abschließenden Studie wurde versucht einen weiteren ERM-homologen Faktor, der eventuell auch über alternatives Cis/Trans-Spleißen exprimiert wird, über PCR mit degenerativen Primern zu identifizieren. Es konnte jedoch neben *elp* kein anderer homologer Faktor bestimmt werden. Dieses Ergebnis entspricht den bereits bei anderen niederen Eukaryonten durchgeführten Untersuchungen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, de Rosa R (1999) Animal evolution the end of the intermediate taxa? *TIG* 15, 104-108

Agabian N (1990) Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61, 1157- 1160

Aksoy S, Shay GL, Villanueva MS, Bears CB, Richards FF (1992) Spliced Leader RNA sequences of *Trypanosoma rangeli* are organized within the 5 S rRNA-encoding genes. *Gene* 113, 239-243

Ammann R, Eckert J (1995) Clinical diagnosis and treatment of *Echinococcus* in humans. In: Thompson R C A (ed.) *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. Allen & Unwin, London., pp. 411-459

Baker BS (1989) Sex in flies: the splice of life. *Nature* 340, 521- 524

Basch PF, DiConza JJ (1973) Primary culture of embryonic cells from the snail *Biomphalaria glabrata*. *Am J Trop Med Hyg* 22, 805-813

Blaxter M and Liu L (1996) Nematode spliced leaders-ubiquity, evolution and utility. *Int. J. Parasitol.* 26, 1025-1033

Blumenthal T (1995) Trans-splicing and polycistronic transcription in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet.* 11, 132-136

Boch J, Supperer R (1983) *Veterinärmedizinische Parasitologie*, 3. Auflage. Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg

Bogitsh BC, Cheng T C (1990) *Human Parasitology*. Saunders College Publishing, Philadelphia

Brehm K, Jensen K, Frosch M (1999) Characterization of the genomic locus expressing the ERM-like protein of *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol.* 15, 147-152

Brehm K, Kern P, Hubert K, Frosch M (1999) Echinococcosis from every angle. *Parasitol Today.* 15, 351-352

Brehm K, Jensen K, Frosch M (2000) mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. *J Biol Chem.* 275, 38311-38318

Brehm K, Hubert K, Sciutto E, et al. (2002) Characterization of a spliced leader gene and of trans-spliced mRNAs from *Taenia solium*. *Mol Biochem Parasitol.* 122, 105-110

Bretscher A (1999) Regulation of cortical structures by the ezrin- radixin- moesin protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 109- 116

Carranza S, Bangua J, Riutort M (1997) Are the Platyhelminthes a Monophyletic Primitive Group? An Assessment using 18S rDNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14, 485-497

Chen F, Wilusz J (1998) Auxillary downstream elements are required for efficient polyadenylation of mammalian pre-mRNA. *Nucl Acids Res* 26, 2891-8.

Clayton C (1992) Control of gene expression in trypanosomes. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 43, 37-66

Craig P S (1994) Epidemiology of alveolar echinococcosis in china. Tagung „Immunogenetics and Epidemiology of A.E.“ Ulm. Abstracts S.14

Craig PS, Deshan, L., MacPherson CN, Dazhong S, Reynolds D, Barnish G, Gottstein B, Zhirong W (1992) A large focus of alveolar echinococcosis in central china. *Lancet*, 340 (8823), 826-831

Craig PS, Rogan M T, Allen JC (1995) Hydatidosis and cysticercosis- larval cestodes. In: *Medical Parasitology- A practical approach.* (Gillespie, S. H. und Hawkey, P. M.) Oxford University Press

Conrad R, Thomas J, Spieth J, Blumenthal T (1991) Insertion of Part of an Intron into 5' Untranslated Region of *Caenorhabditis elegans* Gene Converts It into a *trans*-Spliced Gene. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1921-1926

Conrad R, Liou RF, Blumenthal T (1993) Conversion of *trans*-spliced *C. elegans* gene into a conventional gene by introduction of a splice donor site. *EMBO J.* 12, 1249-1255

Cross SH, Bird A P (1995) CpG islands and genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 309-314

Davis RE, Singh H, Botka C, Hardwick C, Ashraf el Meanawy M, Villanueva J (1994) RNA *trans*-splicing in *Fasciola hepatica*. Identification of a spliced leader (SL) RNA and SL sequences on mRNAs. *J. Biol. Chem.* 269, 20026-20030.

Davis RE, Hardwick C, Tavernier P, Hodgson S, Singh H (1995) RNA *trans*-splicing in flatworms. Analysis of *trans*-spliced mRNAs and genes in the human parasite, *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem* 270, 21813-21819

Davis RE (1996) Spliced Leader RNA *Trans*-splicing in Metazoa. *Parasitol. Today* 12, 33-40

Davis RE (1997) Surprising diversity and distribution of spliced leader RNAs in flatworms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87, 29-48

Davis RE, Hodgson S (1997) Gene linkage and steady state RNAs suggest trans-splicing may be associated with a polycistronic transcript in *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 89, 25-39

Davis RE, Parra A, LoVerde PT, Ribeiro E, Glorioso G, Hodgson S (1999) Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 8687-8692

Diviacco S, Nori P, Zentilin L, Menzo S, Clementi M, Biamonti G, Riva S, Falaschi A, Giacca M (1992) A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. Gene 122, 313-320.

Donelson JE, Zeng W (1990) A Comparison of Trans-RNA Splicing in *Trypanosomes* and Nematodes. Parasitol. Today 6, 327-334.

Duewell S, Marincek B, von Schulthess GK, Ammann R (1990) MRT und CT bei der alveolären Echinokokkose der Leber. Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin 152, 441- 445

Eckert J, Kutzer E, Rommel M, Bürger HJ, Körtig W. (1992) Veterinärmedizinische Parasitologie. Paul Parey Verlag

Felleisen R, Gottstein B (1993) *Echinococcus multilocularis*: molecular and immunochemical characterization of diagnostic antigen II/3-10. Parasitology 107, 335-342

Fernandez C, Gregory WF, Loke P, Maizels RM (2002) Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. Mol Biochem Parasitol (in press)

Filice C, Brunetti E (1997) Use of PAIR in human cystic echinococcosis. Acta Trop. 64, 95- 107

Frohmann MA, Dush MK, Martin GR (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.

Frosch M, Lucius R. (1994) Immunologische und molekulare Parasitologie. Gustav Fischer Verlag-Jena

Frosch PM, 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

- Frosch PM, Mühlshlegel F, Sygulla L, Hartmann M, Frosch M (1994)** Identification of a cDNA clone from the larval stage of *Echinococcus granulosus* with homology to the *E. multilocularis* antigen EM10-expressing cDNA clone. *Parasitol. Res.* 80, 703- 705
- Gottstein B (1992)** Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 248-261
- Gottstein B, Eckert J, Fey H (1983)** Serological differentiation between *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* infection in man. *Z. Parasitenkd.* 69, 347- 365
- Gottstein B, Mowatt M (1991)** Sequencing and characteriyation of an *Echinococcus multilocularis* DNA probe and ist use in the polymerase chain reaction (PCR). *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 183- 194
- Gottstein B, Witassek F, Eckert J (1986)** Neues zur Echinokokkose. *Schweiz. Med. Wschr.* 116, 810- 817
- Hahn H, Falke D, Kaufmann-Ullmann SHE (1999)** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 3. Auflage. Springer Verlag
- Hamdan FF, Ribeiro P (1998)** Cloning and sequence analysis of a lysophospholipase homologue from *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 84, 839-842
- Helbig M, Frosch P, Kern P, Frosch M (1993)** Serological differentiation between cystic and alveolar echinococcosis by use of recombinant larval antigens. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3211- 3215
- Hemmings L, McManus, DP (1991)** The diagnostic value and molecular characterization of an *Echinococcus multilocularis* antigen gene clone. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 53- 62
- Huang X- Y, Hirsh D (1992)** RNA trans-splicing. In *Genetic Engineeing*. New York, Plenum, 211- 229
- Hubert K, Cordero E, Frosch M, Solomon F (1999)** Activities of the EM10 protein from *Echinococcus multilocularis* in cultured mammalian cells demonstrate funktional relationships to ERM family members. *Cell Motil Cytoskeleton* 42 (3), 178-188.
- Jayagopala Reddy NR, Wilkie BN, Mallard BA (1996)** Construction of an internal control to quantitate multiple porcine cytokine mRNAs by RT-PCR. *BioTechniques* 21, 868- 875
- Katraci N, Elmas N, Yilmaz F, Mentec A (1999)** Correlative CT, MRT and histological findings of hepatic *Echinococcus multilocularis*: a case report. *Comput. Med. Imaging Graph.* 23 (3), 155- 159

Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, Jakowska-Anyshka M, Aamodt EJ, Blumenthal T, Rhoads RE (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 275, 10590-10596

Keller M, Tessier LH, Chan RL, Weil JH, Imbault P (1992) In *Euglena*, spliced-leader RNA (SL-RNA) and 5S rRNA genes are tandemly repeated. *Nucl. Acids Res.* 20, 1711-1715

Kern P, Frosch P, Helbig M, Wechsler JG, Usadel S, Beck K, Kunz R, Lucius R, Frosch M (1995) Diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 109 (9), 596- 600

Kimmig P (1992) Epidemiologie der Echinokokkose in Baden-Württemberg. *Ärzteblatt Baden-Württemberg.* 47: 574-582.

Kozak M (1991) An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell. Biol.* 115, 887-903

Kurtis JD, Ramirez BL, Wiest P M, Dong KL, El-Meanawy A, Petzke MM, Johnson JH, Edmison J, Maier RA, Olds GR (1997) Identification and molecular cloning of a 67-kilo dalton protein in *Schistosoma japonicum* homologous to a family of actin-binding proteins. *Infekt. Immun.* 65, 344-347

Larson NI, Engelbrecht J, Brunak S (1995) Analysis of eukaryotic promotor sequences reveals a systematically occurring CT-signal. *Nucl. Acids Res.* 23, 1223-1230

Leducq R, Gabrion C (1992) Developmental changes of *Echinococcus multilocularis* metacestodes revealed by tegumental ultrastructure and lectin binding-sites. *Parasitology* 104, 129- 141

Loose- Frank B, Lucius R (1992) Merkblatt zur Biologie, Vorbereitung und Diagnose des kleinen Fuchsbandwurmes *Echinococcus multilocularis* in Mitteleuropa. Sonderdruck aus der Schriftreihe für Ökologie, Jagd und Naturschutz

Maroney PA, Denker JA, Darzynkiewicz E, Laneve R, Nilsen TW (1995) Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are trans-spliced: a role of spliced leader addition in translational efficiency. *RNA* 1, 714-723

Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288, 911- 940.

McCartney BM, Fehon RG (1996) Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the *Drosophila* homologues of moesin and the neurofibromin 2 tumor suppressor, merlin. *J. Cell Biol.* 133, 834-852

- Mentha G, Morel P, Buhler L, Huber O, Klopfenstein CE, Rohner A** (1991) Traitement chirurgical de l'hydatidose hépatique. *Schweiz. Med. Wschr.* 121, 1231-1237
- Murphy WJ, Watkins KP, Agabian N** (1986) Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: Evidence for trans splicing. *Cell* 47, 517- 525
- Muthukrishnan S, Both GW, Furuichi Y, Shatkin AJ** (1975) 5'-terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translational control. *Nature* 255, 33-7
- Nilsen TW** (1993) Trans-Splicing of nematode premessenger RNA. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 413-440
- Nilsen TW** (1995) trans-splicing: an update. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 1-6
- Rajkovic A, Davis RE, Simonsen JN, Rottman FM** (1990) A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8879-8883.
- Rausch RL, Wilson JF** (1973) Rearing of the adult *Echinococcus multilocularis* from steril larvae from man. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 22, 357-360
- Reddy KB, Yee D, Osborn CK** (1991) Sequencing the Termini of Capped Viral RNA by 5'-3' Ligation and PCR. *Bio.Techniques* 10, 485-486
- Rickard MD, Lightowlers MW** (1986) Immunodiagnosis of hydatid disease. In: Thompson R. C. A. (ed.) *The Biology of Echinococcus and Hydatid disease*. Allen & Unwin, London, pp. 217- 240
- Rogan MT, Richards KS** (1987) *Echinococcus granulosus*: changes in the surface ultrastructure during protoscolex formation. *Parasitology* 94, 359- 367
- Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S** (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucl. Acids Res.*, 26, 1628-1635.
- Ross LH, Freedman JH, Rubin CS** (1995) Structure and expression of novel spliced leader RNA genes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 270, 22066- 22075
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Hguchi RG, Horn GT, Mulli KB, Ehrlich HA** (1988). Primer detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-491.
- Sambroek J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, N.Y.

- Schad V, Veit P, Bilger B, Schäfer J, Frank W, Lucius R (1987)** Sensitivity/resistance of *Echinococcus multilocularis* eggs to environmental conditions. Veröffentlichung der Universität Hohenheim, Institut für Parasitologie
- Schantz PM, Brandt FH, Dickinson CM, Allen CR, Roberts JM, Eberhard ML.** (1990) Effects of albendazol on *Echinococcus multilocularis* infection in the Mongolian jird. *J. Infect. Dis.* 162, 1403- 1407
- Schantz PM, Gottstein B (1986)** Echinococcosis (Hydatidosis) In: Immunodiagnosis of parasite disease (Wall, K. W., und Schantz, P. M. eds.), vol. I, 69-107, Academic Press, Orlando, FL
- Singer VL, Wobbe RC, Struhl K (1990)** A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes Dev.* 4, 636- 645
- Slais J, Vanek, M (1980)** Tissue reactions to spherical and lobular hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786). *Folia Parasitologica* 27, 135- 143
- Smyth JD (1969)** Parasites as biological models. *Parasitology*, 43, 383-387
- Southern, EM (1975).** Detection of specific Sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. *J. Mol. Bio.*, 98, 503- 517.
- Spieth J, Lea K, Brook G, Blumenthal T (1993)** Evidence of polycistronic transcription units in *C. elegans*. *Cell* 73, 521-532
- Stover N A, Steele RE (2001)** Trans-spliced leader addition to mRNAs in cnidarian. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5693- 5698
- Takeuchi K, Kawashima A, Nagafuchi A, Tsukita S (1994)** Structural diversity of the band 4.1 superfamily members. *J. Cell. Sci.* 107, 1921-1928
- Tessier LH, Keller M, Chan R, Fournier R, Weil JH, Imbault P (1991)** Short leader sequences may be transferred from small mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. *EMBO J.* 10, 2621-2625
- Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S (1997)** ERM-proteins: head to tail regulation of actin- plasma- membrane interaction. *Trends Biochem. Sci.* 22, 53- 58
- Ustunsoz B, Akhan O, Kamiloglu MA, Somuncu I, Ugurel MS, Cetiner S (1999)** Percutaneous treatment of hydatid cysts of the liver: long term results. *Am. J. Roentgenol.* 172, 91- 96
- Vaheri A, Carpen O, Heiska L, Helander TS, Jääskeläinen J, Majander-Nordenswan P, Sainio M, Timonen T, Turunen O (1997)** The ezrin protein family: membrane cytoskeleton interactions and disease associations. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 659-666

Vandenberghe AE, Meedel TH, Hastings KEM (2000) mRNA 5'-leader trans-splicing in the chordates. *Genes Dev.* 15, 294- 303

Von Keyserlingk M, Welzel A (1992) Kein Grund zur Panik. *Niedersächsischer Jäger* 15, 796- 800

Wippersteg V, Kapp K, Kunz W, Jackstadt WP, Zahner H, Grevelding CG (2002) HSP70-controlled GFP expression in transiently transformed schistosomes. *Mol Biochem Parasitol* 120, 141-150.

Zorio DAR, Cheng NN, Blumenthal T, Spieth J (1994) Operons as a common form of chromosomal organization in *C. elegans*. *Nature* 372, 270-272

8 ANHANG

Im Rahmen der Suche nach einem weiteren ERM-homologen Protein von *E. multilocularis* identifizierte Sequenzen mit den jeweiligen Proteinsequenzvergleichen.

Sequenz Nr. 1:

```
TACTTCGGAA TCCAGTACGT CGACAAAGAC GGCAATCCAA CCTTTCTAAG
ACTGGATAAG AAAATTTCTGA GTAACGATTT TGCACCTGGT TCTGAATACG
ACTTCAAGTT CATGGTCAAG TTCTACCCCG AGAATGTCTGA GGAGGAACTC
ATTCAAACCTT GCACAATCAC TCATTTCTAC CTTCAGGTCA AGAGCGACAT
AATGTCTGGC AAAATCTACT GCCCAACTGA CACTGCTGTC CTGCTGGCGT
CGTATGCCTG TGTTGCCAAG TATGGTCCGT ACGACCCACA GTCGTGCCCT
AAGAGTTTGC CTATCGATCG ACTGATTACC AGCAGGGACA GTACGATCAA
ACCGACGAGC AATGGTACGA GCGGATCATA GCATACTACA AGGACTACCA
TGACATGTCT CGCGAAGATG CAATGGTTCA GTATCTACAA ATT
```

cytovillin homolog - tapeworm (*Echinococcus multilocularis*)

ezrin-like protein [*Echinococcus multilocularis*]

antigen II/3 [*Echinococcus multilocularis*]

Length = 559

Score = 237 bits (599), Expect(2) = 1e-78

Identities = 110/113 (97%), Positives = 113/113 (99%)

```
Query: 1 YFGIQYVDKDGNTFLRLDKKISSFAPGSEYDFKFMVKFY PENVEEELIQCTITIFY180
      YFGIQY+DKDGNTFLRLDKKISSFAPGSEYDFKFMVKFY PENVEEELIQCTITIFY
Sbjct: 49YFGIQYIDKDGNTFLRLDKKISSFAPGSEYDFKFMVKFY PENVEEELIQCTITIFY108
```

```
Query: 181 LQVKS DIMSGKIYCPTDTAVLLASYACVAKYGPYDPQSCP KSLPIDRLITSRD 339
      LQVKS DIMSGKIYCPTDTAVLLASYACVAKYGPYDPQSCP KSLPIDRLITS++
Sbjct: 109 LQVKS DIMSGKIYCPTDTAVLLASYACVAKYGPYDPQSCP KSLPIDRLITSKE 161
```

Score = 77.6 bits (188), Expect(2) = 1e-78

Identities = 34/35 (97%), Positives = 35/35 (99%)

Query: 339 QYDQTDEQWYERIIAYYKDYHDMSREDAMVQYLQI443
 QYDQTDEQWYERIIAYYKD+HDMSREDAMVQYLQI
 Sbjct: 162 QYDQTDEQWYERIIAYYKDHHMSREDAMVQYLQI 196

Sequenz Nr. 2:

```
AATTCGCCCT TACTATTGGT CTGCGTGAGA TCTGGCCAGC GCTTATCCGA
AACCTCCAGA GGAGGAGGCG GGATGTCATA AGCACGACGC CAGACTTTAA
CTTGAGCTTC ACCATGCTTT GCGGCTGTTT CGGATTTGTT CAATCCCTGC
AAGCCACCGT ACATTCGCTC ATTCAAACGC CATGACTTAT AGACTGGAAT
CCAGTGCAAG TCATTCACTT CAAGCACACG ACCTCGAGAT GTACCGGAAG
GGCGAATTCT G
```

phosphoglycerate mutase 1 [Mus musculus]

Length = 254

Score = 104 bits (258), Expect = 2e-22

Identities = 47/69 (68%), Positives = 59/69 (85%), Gaps =
 9/69 (13%)

Query:227LEVNDLHWIPVYKSWRLNERMYGGGLQGLNKSETAAKHGEAQVKVWRRAYDIPPPPLE54
 L+ D W+PV ++WRLNER YGGL GLNK+ETA AKHGEAQVK+WRR+YD+PPPP+E
 Sbjct:70 LDAIDQMWLPVVRTWRLNERHYGGLTGLNKAETA AKHGEAQVKIWRRSYDVPPPPMEP129

Query: 53 -----VSDKRWPDLTQ 21
 D+R+ DLT+
 Sbjct: 130 HPFYSNISKDRRYADLTE 147

Sequenz Nr. 3:

```
TAAGGTCGGC CGCGCTGACG AAGGAGTGCA ACGAGTTCCT TTGAGCCGGT
AGTGTAACCA CCCAGAAGCT CCACCCATCG CCTTACCCAG GGTGAGTTT
ATTATGGTCA CTTTGCCTTG CAATCCATAG TACTCCTCAG TTCCACGACC
CGTCTCCCCG AAGAAGCCAG TAGCATGGCA TTCATCGATG AAAGTGATGG
CCTTATGCTT TTCCGCCAGC TACACGTATG CGAGCTTTAC CCTTGGGCAC
AACCGGATAG CTGAAGCCGA TCACGTAAAT GCCGTGTTGC AGCATTGCAT
CGGCGAATTG AGCAGCCAAA CGAGCGTCTT CGAGCATCAC CGGGGCGATA
GGATGGCAAT AATCACCAGA AAGCTTGAAA CCACGCTCAG TCATTGTGTC
ACGGAAGAGT TTGACATTGG CATGCAGCTT TTGAGGCAGG CTAGAGCTCT
CGATGAGAAA GGTCGAATGC TTCCATGGCT GCACCAACGA CGG
```


probable glycine C-acetyltransferase (EC 2.3.1.29)**Caenorhabditis elegans****2 T25B9.1 gene product [*Caenorhabditis elegans*]**

Length = 366

Score = 88.5 bits (216), Expect = 4e-17

Identities = 47/79 (59%), Positives = 55/79 (69%), Gaps =
1/79 (1%)

Query:457 ESSSLPQKLHANVKLFRDPTMTERGFKLSG-DYCHPIAPVMLEDARLAAQFADAMLQ 281
 SS L NV FR +M GF + G D HPI PV+L DA+LAA AD +L+
 Sbjct:259 NDSSFIGSLQTNVSHFRKSMAANGFTILGNDPHPICPVLLGDAKLAATMADELLK 318

Query: 280 IYVIGFSYPVVVPGKARIRV 221
 IYVIGFS+PVVPGKARIRV
 Sbjct: 319 IYVIGFSFPVVVPGKARIRV 338

Score = 76.1 bits (184), Expect(2) = 7e-18

Identities = 36/53 (67%), Positives = 43/53 (80%)

Query: 219 LAEKHKAITFIDECHATGFFGETGRGTEEYGGKVTIINSTLGKAMGGA 61
 LAEK+ A+ FIDECHATGFFG+TGRGT E GG+ +INSTLGKA+GG+
 Sbjct: 168 LAEKYNALLFIDECHATGFFGKTGRGTAEAVGGRPDVINSTLGKALGGS 218

Score = 35.6 bits (80), Expect(2) = 7e-18

Identities = 15/21 (71%), Positives = 17/21 (80%)

Query: 65 LGGYTTGSKELVALLRQRGRP 3
 +GGYTTG K L+ LLRQR RP
 Sbjct: 217 MGGYTTGPKPLIDLRLRQRS RP 237

Sequenz Nr. 4:

TGGAATTCGC CCTTACTATT GGTCTGCGTG AGATTTGGTC GAAAAATTAA
 CTTTGTCAAT CAACTGAATG AACTGTCGGT TGATATGCAT CTGGATCAGA
 TTCCAATCCC TCAACGAGTT CGAATTTATG ATACCAGTCT GGTTCGATTG
 AAAAGCTCCC GGACCCCTCA GACTGGGTGG TCAGCTGGGT AGTGCAACAG
 CTAACAGCC TCCAATCTTT CGCCAAACAC CCGCCCATGA CCTGGAAGAT
 GTACCGGAAG GGCGAATT

1 dJ127B20.1 (Rho GTPase activating protein 8) [Homo sapiens]

Length = 333

Score = 41.0 bits (94), Expect = 0.003

Identities = 21/55 (38%), Positives = 29/55 (52%)

Query: 1 PLLLVCVRFGRKINFVNQLNELSVDMHLDQIPIQVRVRIYDTSLVRLKSSRT 165
 L+ +FG+K ++ N L+EL + DQ+ IP V YD L L RT
 Sbjct: 21 LKPLISHKFGKKVIYFNYLSELHEHLKYDQLVIPPEVLRVRYDEKLQSLHEGRT 75

Sequenz Nr. 5:

TTGGTGACAA CGGGCGTAGA CAGATCGGGG AATTGTTTAT TGCTGTGGTT
 GCCCCAGACA CATACTTCT TCACACACGT GTTGGGAACT CCAGCCTTGG
 CAGCGAACCT GGTAGATGGC GCGATTATGG TCCAGACGGC TAAGAGCCGT
 AAAGTTTCTCT TTCGGAATGG AAGGAGCGTA CTTGCTCATG ATGAGACAGT
 TAGTGTTAGC AGGATTATCC ATGGACAGAC CATCTACCAC CTTGTAGTGT
 CCATCCTTGA TGGTAACTGG AAAGCTGAAG TAGATGTCCT TGGGGGCACC
 ATAGTGATCA CCGGTGCTGT AAACAGACAT GGAAACCCAT TCACCCTCCT
 TGGTGCCAAA CCACCAGTCG CGCATCTGAT CGACAATTGC CTTGGCGGCC
 GAAGCGGCGC TACTGAGTTT TCGCAAGCCG ATGACCGCGG CACCACGATT
 TTGAACGCAT TGGAGTGAAC ACCTTCTTAA CCACTTTTTA TCGGTGATCA
 ACTC

Malate dehydrogenase - Echinococcus granulosus

Length = 332

Score = 186 bits (467), Expect = 2e-46

Identities = 87/96 (90%), Positives = 90/96 (93%)

Query:504 LITDKKWLRRCSLQCVQNRGAAVIGLRKLSSAASAACAIVDQMRDWWFGTKEGEWV 325
 LI D+KW+ + CVQNRGAAVIGLRKLSSAASAACAIVDQMRDWWFGTKEGEWV
 Sbjct:211 LINDEKVVKEVFTPCVQNRGAAVIGLRKLSSAASAACAIVDQMRDWWFGTKEGEWV 270

Query: 324 VYSTGDHYGAPKDIYFSFPVTIKDGHYKVVVDGLSMD 217
 VYSTGDHYGAPKDIYFSFPVTIKDGHYKVVVDGLSMD
 Sbjct: 271 VYSTGDHYGAPKDIYFSFPVTIKDGHYKVVVDGLSMD 306

Score = 83.9 bits (204), Expect = 1e-15

Identities = 46/83 (55%), Positives = 56/83 (67%), Gaps = 7/83 (8%)

Query: 303 APKDIYFSFPVTIKDGHY----KVVDGLSMDNPANTNCLIMSKYAPSIPKENFTA 145
 A +D+ S K+ KV L + PANTNCLIMSKYAPSIPKENFTA
 Sbjct: 95 AARDLLSSNVKIFKEQGEALDKKVTKALVVGQPANTNCLIMSKYAPSIPKENFTA 154

Query: 144 LSRLDHNRAIYQVRCQGWSSQHVCEERMCL 55
 L+RLDHNRAIYQV+ + C++ C+
 Sbjct: 155 LTRLDHNRAIYQVAACA-GVPNTCVKNVCI 183

Score = 71.8 bits (173), Expect = 5e-12

Identities = 31/34 (91%), Positives = 32/34 (93%)

Query: 104 AAKAGVPNTCVKNVCVWGNHNSNKQFPDLSTPVVT 3
 AAKAGVPNTCVKNVC+WGNHNSNKQFPDLS VVT
 Sbjct: 168 AAKAGVPNTCVKNVCIWGNHNSNKQFPDLSHAVVT 201

Sequenz Nr. 6:

GATTGGGAAG CCGCTTGTTT TGAACCCAG CTTGAAGGTG TTCAACGTGT
 TTTCGTCCGA ACGGTATCG TTCTTCAAA GAATGGAGGA GCTCTCTCAA
 AAATGTATCC AGCCACCGT CTTGGCTTAG GCGGTCCCAT TGGGCAGTGG
 ACAAGCAGTG GCTTCTCGTG GATCCATATT GACGATCTTG TCAACCTTCA
 TTGCTTTTTG A

cell division inhibitor XF0286 [imported] - Xylella fastidiosa (strain 9a5c)

Length = 298

Score = 57.4 bits (136), Expect = 2e-08

Identities = 30/70 (42%), Positives = 39/70 (54%)

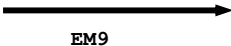




Query: 1 EAACSGTQLEGVQRVFRVTGIVLSKNGGALS KMYP AHR LGLGGPIGQSSGFSWI 180
 E G Q +R GIVL++ GGAL+ M PA R G+GG G SWI
 Sbjct: 142 ENEALRISALGSQVSLIRIGIVLERDGGALGQMLPAFRFGVGGFRGNQHWMSWI 200

Query: 181 DDLVNLHCFL 210
 +DL+N+ + L
 Sbjct: 201 EDLINMIWL 210

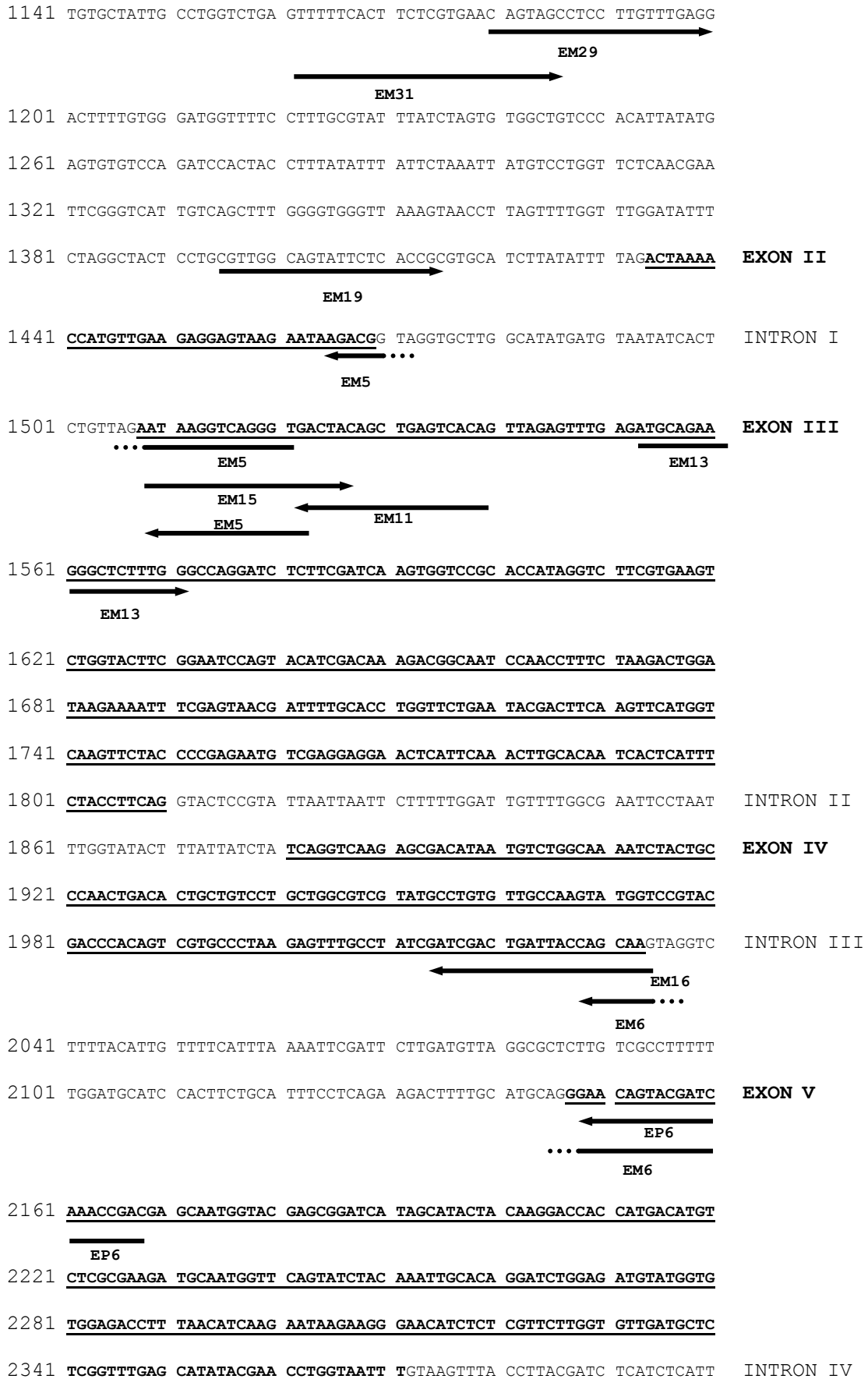
Chromosomale Sequenz des *elp*-Lokus mit Angabe der verwendeten Primer

Die Primer sind als fettgedruckte Pfeile unterhalb der entsprechenden Sequenz angegeben.

```

1   TCGATGCTCT TCAAGCAATT GTAAAGGATC TTTTACTTG AGAACAGCAT GGCGAACAGC
61  AATTCTCTGC TTTTATTTT TCTTAAGCTC TCTCTTCGGA GCCTCTTTC TAGCTTGATC
121 AGTGGGATTC ATATACTTCC CACTTTTAGT TGTGTTAAT GATCTACGCC CCATTTCACA
181 AAAAACCAGA CACAGACTGT CAAGACCAA TAAAAACCG CACCAACTGC TTGAGACGGC
241 ATGTAAACAA TTCTGACCAT TTAAAGCATA AAAAACCATT GGTACGCCCT AGTACAAC TA
301 AGGCAAATTT GGATCGACTT TATTCGTTT TACTAACTTT TGAGTCACAA GTGAGGTTTT
361 CACTATAACT GGAAACCAAG TTTTCATAA ACAGGTATCA AACATATAAA CAGACATTAA
421 TTTAAGCGTA TTAATGCTTT TAAACGCCAT CTGCCAGAAA TCTTTAAAGG ACGAAAGTGA
481 AGATTCTTTT ACTTTGAACA ATAGAGCACT ACATTTTTAT ATAAGTGAAA AACTAGTGTG
541 TCCATTATTT TAAAACCATT AATGTAGCAT GGAATGCTT ACCTGCTTCA ATGTATCTGG
601 CAATCACTCA GAGCCTTCGA TGATCATGGA AGATGATAAG GTCCATTAAT GCAAAGTGTG
661 CACAAATGCA TTGATTTTCA TAAACTTTAT GGTTTTCAAG CTTTTTGTTF ACTTGTTTTG
721 TGTTCTTTTC TGGTAAATTC AAAGATAAAT CGCAGTGAGA GAAACAAAT TGACATTTAT
781 TTTTATTA AAAGTCTTTGT TTTGGAGATA ACATAGTTAT TCATATTTAA AGTAAGTACC
841 TAAAATATTA ATAGTTATAC ATCGTATTTG TCTTTGTTTA AACTAACCCC CCACTAAATT
901 AAACTTGTC CTGGGTAAC TTTGAAAGCC CTTTCTGTC TGTTTGCGT TGCTTGCCCG EXON I
      
      EM9
961 TGGTTGGGCT CCCGTTGATT GCAGTTTGTG CGTTGGTGCT TTATGTTTAC CATCACATAT 5' INTRON
      
      EP13
      
      EM3
      
      EMCIS5
1021 TAGATGATGC TCCGCATAAT CCACACATTC GTAGACCCCT CTAGCCATTT CATGTTCTAC
      
      EM24
1081 ATGCCTTCTC GTTTTACTGC TTTGCCTTCT CACTTGTGTC ATTATTCAGC AGAACTTACC

```



2401 TACTCATCTG TGAGGACTTT AAGTTTTATT TCTCCTTTTA CCTCAGATTG GACCCTAAAA **EXON VI**
 2461 TTGGTTTTCC TTGGTCGGAA ATTCGAAATC TCTCTTTTCA CGACAAGAAG TTCATCATCA
 2521 AACCGGCAGA CAAGTCCGCA AAGGTTTTTT TCCAGATGCT TGTTTGACTA AGTTTCACTA INTRON V
 2581 AGCTCTACCT AAACCTTCTTCT TTCACTTTGC AGGAGTTTTT CTTCTTGGTG GAAAAATCCA **EXON VII**
 2641 AGATTAACAA GCGCATTTTG GCATTGTGTA CTGGCAACCA TGAGCTCTAC ATGCGTAGAA
 2701 GAAAGTCAGA CTCTATTGAG GTGCAACAGA TGAAGATTCA GGCCAAGGAG GAACGTGAAT
 2761 TGAAGGAGGC TGAGAGGTAA GTCATCAGTA TTCCCTTGTA TCTTGCCCAA ATTCTACTTC INTRON VI
 2821 CCCGGGGCCG TATTCGATGT TTGATGACGT GTTTAGTGAC TAAGTGAATG TGGTTGACTT
 2881 TTTTATTAAG ACAACGCCTG AAGGAGGAAC GATTGCAACG TATGGAAAAT GAACAGAAAC **EXON VIII**
 2941 TGCGGGAGCT TCGTGCTCAA ATGGTCGAAA AGGAGTCTGA CTTAGCGGAT ATGAAGAATA
 3001 AGGCATCTGC CTATGAGAGT AAGATTGCGG AGCTGGAGAT GCTGCTACAG CAGGAGCGAC
 3061 ATGCGCGTGA GAGTCTTCAG AAGAGCCAAG ACAAACTGGC GGAGATGAAC AGAAAGCTGA
 3121 AGGAGGTGCG TACGCGATGA CTGACTAAAA ATATTGGTGT GAATTTCTAC CCCTCCCTGT INTRON VII
 3181 ACGCAGATTT AGCTTGGAAG CCCATCTGAC AAATGAACAC CAAGCTAATT CGGCGCATGA
 3241 TAATAATGTG GATTGAATTA CTGATTGAAC TGGATGTGAT CCCACTGGGA GTCTTACTGG
 3301 GCTTATTTTT ATGATGATTT AGACAGATTT TAGCGGACTG CTGTCGAGAA AGTATCACTT
 3361 TGTTTACTGA TTCTGTACTT CATTTAGGTT TGACAATAGT TGGTTTTGTG TATCTATTAA
 3421 TGCTTTGGT GCCCTAACAT GCTGATTTCC TGCATTAGCT GTTACCTGTT CAACTCAGCC
 3481 AGTTTACGGA GCGCTTCTGG GTTACTAATC TTGCCGCCG AAGAAGGTT TCAGAATCCT
 3541 ACGAGCTCGA TTTCATATCT TGCCATTTTT TAGCTTACAA TTGGAATCC TAGTCTTCC
 3601 ATGATGGATA TCAACTCAA CCGATATTT TTGAGTGAAT GTTGCAATAA CGTTTTACTA
 3661 ATGGAATATG TTTGTGCGAG ACGTTACGCA TTGAGCTGTA TTGAAATAAT GAATAATGGA
 3721 GTCTTGCTCA AAGAAATAAA GCTTTCGAAG AAGTTCCTGT AAGCTCTTTT TTGGTATGCA
 3781 TTAGAGGTCT TTCCAGATCC TGAGTTGAGC AGTCTAACTG CTCCGTTGTC TCCTCTACTT
 3841 TTTGTTTTTG ATTAGCGGAT ATGCTTCTG TCAGTTGGAA ATCATATCAT GCGTGTGTAC
 3901 ACACGTATGA TGACGGTTCT GAGTTGGTAC TTCTTGCATC AATGAATCGG TATTACCTTG
 3961 CGGATGTTAC TGAACCTTCT CTTGTAGGAG ACTGCGGCAT CAGCCGAAGA GCGCGACCGT **EXON IX**
 4021 CTGATGGCCC AGCGTGACGA AGTGCAACGC GAAGTTGAGG CTCAGAAGGT CGCCATGGCC
 4081 AAGAAGGAAG CTGAAAAGGC TCAGGCTGAA GCTGAGCTTC GCAGAATGCG TGAGAAACAC

4141 GATGCAAAGC ACAAGTCCCA GGTCAATGGC AGTGGTGACG GTAAGTAGAG TGATGGTACT INTRON VIII

4201 GGGCTTACTT TGCCGTTTGT CATGCACTGT CTAGTGCCAT TAAAGTATTC GAGAGCGGAG

4261 ATCGAGACAT GGAATGAGTT TTTGGAAGTG GAATTTTGCC CCCTGTTTTT AACACTTGCC

4321 TCGTTTTTTTT CTCCGTTCA GCTGCTTCGC AGGATGATGA AAGTGAAGCC AAGGAACTTG EXON X

PF66 →

4381 AGGTGATACC AAATGTGAGG CGGACGGAGG AATCGAGGGT GACGGCCGTC TCTAAGAATG

4441 AGACGCTCCA GACGAAGCTG GCCAACCTCA AAATGGAGTT GAGCTCGACA CGCGATCAGT

4501 CGAAAATGCG CGACATTGAT CGTCGTCATG AGTACAATGT GCGGGAGGGT AATGACAAGT

4561 ACAAGACACT GCGCAACATT CGCAAGGGCA ACACCATGTG TCGTGTGAA CAGTTTGAGT

← PF18

4621 CGATGTAGAA ATGTTACAGT TGTCTTCATT CCCCTCATCT TTCTGCAATT TTGGACCCTC

4681 TATCACTACG GTTACTTCCT CAATCATGCT GCTACAGTGC TATCCAACAT TCCATTTTTA

4741 TTCTCGCGAT GCACACCTGT CTTTTCATTC TGCCCTTCT TATCTAACGT CCACTTTATT

4801 AAAGTCTAT CGTACGCTAC TCTACCTTC TTGTTAAAGC ATTTCCATTC CTGGCGAAAA

4861 TAGCACATAG ACATGGGTTC TTTGCGGTGT GCTACTGAGA GGTGCACTGG CTCTCATCAC

4921 TTCGGGCATG TGAAGTTGTG CTGCGTGGGG TTCGGTGGGA GTATTTCAAA TGATTCATCA

4981 TCACTCGGTA GTGAATGTAA GTTGGGTGTT CGTTTTCTTG AGCTTATCAT CGCCCTAATT

5041 GAGTCAGGGC GTGCTGTCTT CAAGGGTTGC GCCTACCTGG TGCAAATTC CACTTCAGTG

5101 AGCAGCTCAC GGTGTGTGGC GAAGCTTGCA GATACGCTGA CGCAAGATAG TTCAAGTTTA

5161 GCGGAGGGAG CACTGCTTTA AGGCGCAAGC CATCCGTGGG GCGGTTAAGA GCCCAAGTTC

5221 TTCAGTGAC AGAGATCGAG AAGGCCTTTG GCTGGGTGAT AGGCGTGGAA CTCCGCCGCC

5281 AGTGCGGGGG GTAGAGTAAG ACTAGTTCCA ACCTACCGCG TGGTCTCCCT CTTGATTTAA

5341 GCTTCGTCCC TGACCTTCTC CGTGGTCTGT CTCCACTGC TCCGAAACGT CCTCCTGATC

5401 TGATA

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Matthias Frosch, Leiter des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Herrn Dr. rer. nat. Klaus Brehm danke ich besonders für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich Kerstin Kronthaler, Heike Jura und Kerstin Hubert für konstruktive Anregungen sowie ständige Bereitschaft zu fachlicher und persönlicher Diskussion.

Herzlichen Dank an Christoph Wunderlich und Kurt Hauck für moralische Unterstützung, konstruktive Beiträge und grenzenlose Geduld, sowie an meine Schwester Kirsten Jensen für die Bereitstellung mikroskopischer Bilder.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

