

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

**Molekulare Charakterisierung eines Tropomodulin- Homologen des
Fuchsbandwurms *E. multilocularis***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Heidi Beland
aus Memmelsdorf i. Ufr.

Würzburg, Juli 2002

Referent: Professor Dr. med. M. Frosch

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

Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2003

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Biologie von <i>Echinococcus</i>	1
1.2 Lebenszyklus von <i>E. multilocularis</i>	2
1.3 Molekularbiologie und Biochemie von <i>E. multilocularis</i>	5
1.4 Epidemiologie von <i>E. multilocularis</i>	6
1.5 Das Krankheitsbild der „Alveolären Echinokokkose“	7
1.6 Diagnosestellung der AE	7
1.7 Therapie der AE	8
1.8 Biochemische und zellbiologische Funktion von Tropomodulin	9
1.9 Ziel der Arbeit	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Geräte	13
2.2 Verbrauchsmaterial	14
2.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme	14
2.4 Puffer und Lösungsmittel	15
2.5 Antikörper	16
2.6 Plasmide	16
2.7 Oligonukleotide	17
2.8 Parasitenmaterial	19
2.9 Techniken zum Arbeiten mit Bakterien	20
2.9.1 Bakterienstämme	20
2.9.2 Nährmedien	20
2.9.3 Kulturbedingungen	20
2.9.4 Transformation von Bakterien	21
2.10 Techniken zum Arbeiten mit dem Parasiten	24
2.11 Techniken zum Arbeiten mit RNA	25

2.12 Techniken zum Arbeiten mit DNA	26
2.12.1 DNA- Präparationen	26
2.12.2 Agarose- Gelelektrophorese für DNA (nicht denaturierend)	29
2.12.3 Automatisierte DNA- Sequenzierung	31
2.12.4 Klonierungsmethoden	31
2.12.5 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	32
2.12.6 Synthese komplementärer DNA (cDNA)	34
2.12.7 RT- PCR	36
2.12.8 “Easy Gene Walking” mittels “Nested PCR”	36
2.13 Differential Display Methode	38
2.13.1 cDNA- Bibliothekherstellung	38
2.13.2 Differential Display- PCR	40
2.13.3 Polyacrylamidgele für Nukleinsäuren	40
2.13.4 Silberfärbung der PAA- Gele	41
2.13.5 Isolierung und Charakterisierung der differentiell exprimierten DNA- Fragmente	41
2.14 Techniken zum Arbeiten mit Proteinen	42
2.14.1 Polyacrylamid- SDS- Gelelektrophorese	42
2.14.2 Western- Blot	43
2.15 Techniken zum Arbeiten mit Hefen	44
2.15.1 Kultur von Hefen	44
2.15.2 Hefe Two Hybrid Versuch	44
2.15.3 LexA- basiertes Two Hybrid System	45
2.15.4 Gal4- basiertes Two Hybrid System	55
3 Ergebnisse	61
3.1 Untersuchungen zu stadienspezifisch exprimierten Genen in Protoskolex und Metacestode, zwei der Larvenstadien von <i>E.multilocularis</i>	61
3.2 Vergleich der Expression in Metacestode und Protoskolex mit RT- PCR	65

3.3 Molekulare Charakterisierung eines <i>E. multilocularis</i>	
Tropomodulin- Gens (<i>emto</i>)	66
3.3.1 cDNA- Sequenz	66
3.3.2 Homologie- Vergleich mit verschiedenen Tropomodulin- Homologen	70
3.3.3 Chromosomale Sequenz von <i>emto</i>	73
3.4 Versuche zur <i>in vivo</i> Detektion von Interaktionen zwischen EmTO und EmTY mittels Yeast Two Hybrid Analysen	78
3.4.1 Interaktionen im LexA- basierten Yeast Two Hybrid System	80
3.4.2 Two- Hybrid- Versuch im GAL4- basierten System	84
4 Diskussion	90
5 Zusammenfassung	97
6 Literaturverzeichnis	98
7 Anhang	113
7.1 Genfragmente aus Differential Display- Versuch	113
7.1.1 AAxR24GA, T14AAxR24TC	113
7.1.2 T14AAxR24GA	113
7.1.3 T14AAxR24GC	114
7.1.4 T14AAxR24TG	114
7.1.5 T14AAxR24CA	115
7.1.6 T14CGxR24AA	115
7.1.7 T14GAxR24AA	116
7.1.8 T14GAxR24TT	116
7.2 Chromosomale Sequenz von <i>emto</i>	117
8 Abkürzungsverzeichnis	120

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Biologie von *Echinococcus*

Echinokokken sind kleine Bandwürmer einer Länge von 3- 5 mm, welche phylogenetisch dem Tierstamm der *Plathelminthes* (Plattwürmer), der Klasse der *Cestoda* (Bandwürmer) und der Unterklasse der *Eucestoda* (echte Bandwürmer) zugeordnet werden (Thompson, 1988).

Man kann vier Spezies unterscheiden: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthus* und *E. vogeli*. Primär trifft man die Unterscheidung dieser vier Arten anhand der morphologischen Eigenschaften ihrer Adult- und Larvenstadien sowie ihrer unterschiedlichen Wirtsspektren (Rausch et al, 1984). Der Lebenszyklus mit einem strobilärem Adultstadium sowie den drei Larvenstadien Onkosphäre (Sechshakenlarve), Metacestode (Finne) und Protoskolex ist allen *Echinococcus*- Arten gemeinsam. Erste Unterschiede lassen sich im Wirtsspektrum ausmachen: Der Fuchs beispielsweise fungiert als Hauptendwirt, kleine Nager als Zwischenwirte von *E. multilocularis*, während bei *E. granulosus* hauptsächlich Hunde als Endwirte und domestizierte Tiere wie Schafe, Pferde oder Kamele als Zwischenwirte dienen (Thompson, 1988). Mit den unterschiedlichen Wirtsspektren ist auch die geographische Verbreitung der *Echinococcus*- Arten zu erklären: *E. granulosus* ist weltweit verbreitet, *E. multilocularis* nur in der nördlichen Hemisphäre, *E. oligarthus* und *E. vogeli* vor allem in Mittel- und Südamerika (Thompson et al, 1995).

Den Menschen als Fehlzwischenwirt können zwar alle *Echinococcus*- Arten außer *E. oligarthus* befallen, von signifikanter humanmedizinischer Bedeutung sind jedoch nur die beiden Arten *E. granulosus* und *E. multilocularis*. *E. granulosus* verursacht die cystische Echinokokkose, *E. multilocularis* ist der Erreger der weitaus gefährlicheren alveolären Echinokokkose (AE). Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit den sich im Zwischenwirt entwickelnden Larvenstadien von *E. multilocularis* gearbeitet wurde, wird im folgenden nur auf diese Spezies eingegangen.

1.2 Lebenszyklus von *E. multilocularis*

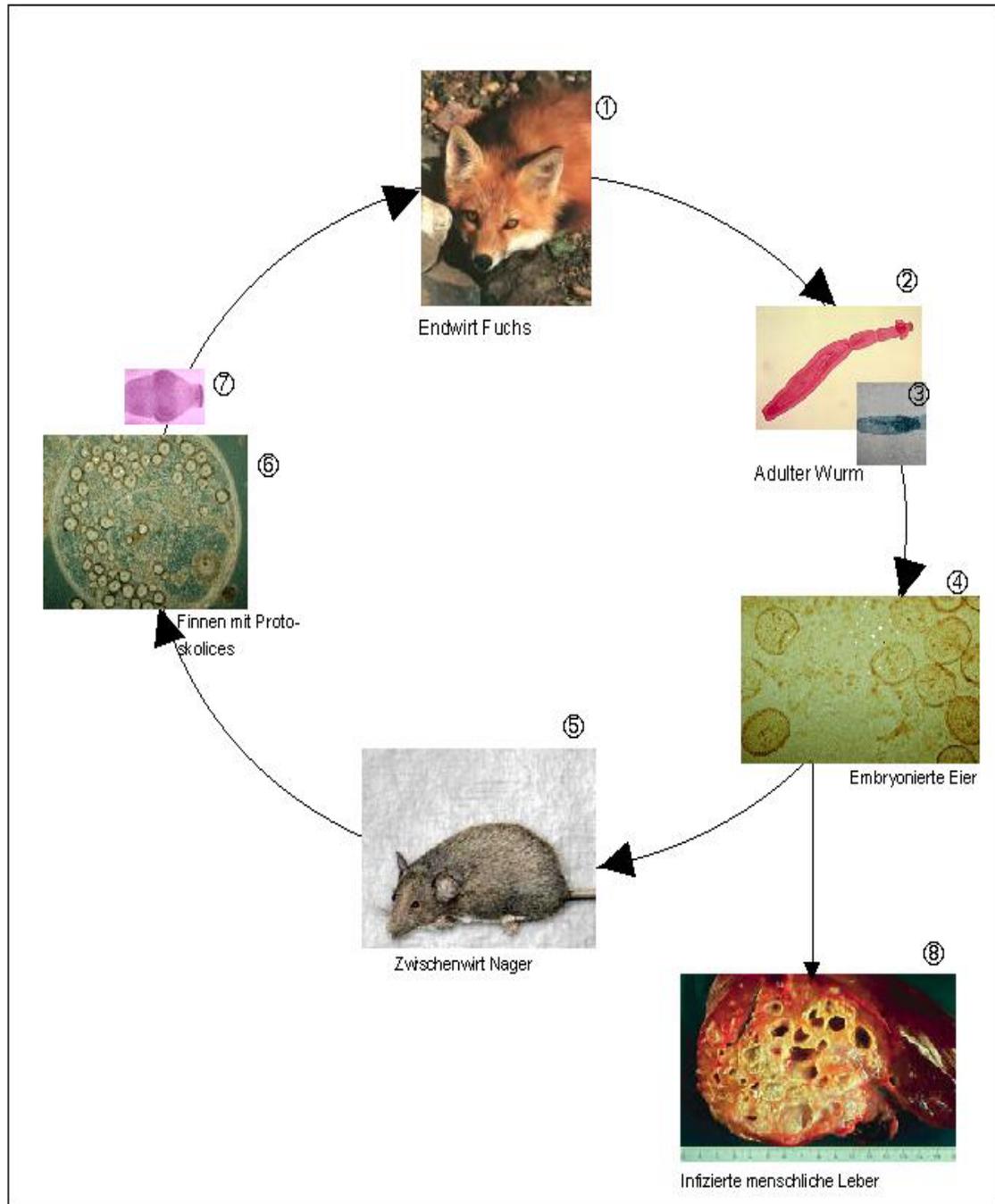


Abb.1: **Lebenszyklus von *E. multilocularis***. Nach dem Verschlingen eines Beutetiers durch den Endwirt (1) evaginieren die Protoscolices und entwickeln sich zu adulten Bandwürmern (2), die im Dünndarm des Fuchses haften; (3) Terminale Proglottide mit Uterus; (4) embryonierte Eier, die die infektiöse Onkosphäre enthalten, werden mit dem Fuchskot ausgeschieden; Werden die Eier vom Zwischenwirt Nagetier (5) oder dem akzidentiellen Zwischenwirt Mensch oral aufgenommen, dringt die im Dünndarm freierwende Onkosphäre durch die Darmwand und wird über den Blutstrom in innere Organe, meist die Leber (8), transportiert, wo sich zystische Metacestoden (6) und anschließend Protoscolices (7) bilden.

E. multilocularis ist zur Vollendung seines Lebenszyklus auf zwei Säuger als Wirte angewiesen: Einen Endwirt, in welchem die sexuelle Vermehrung des adulten Wurms stattfindet und einen Zwischenwirt, in dem sich die Metacestode asexuell vermehrt und Protoscolices bildet. Die natürlichen Endwirte sind stets Karnivore. Als Hauptendwirt fungiert der Rot- und Polarfuchs, aber auch in Hunden und, seltener, in Katzen kann sich der adulte Wurm entwickeln (Schantz, 1982; Thompson & Eckert, 1982a). Die Infektion des Endwirts erfolgt durch orale Aufnahme lebensfähiger Protoscolices, die sich zu adulten Würmern einer Größe von 3 bis 5 mm entwickeln. Im Verlauf der Infektion des Endwirts verankert sich der Skolex mit Hilfe seiner Haken und Saugnäpfe in den Lieberkühnschen Krypten der hinteren Region des Dünndarms. Dort beginnt die Entwicklung des adulten Wurms, welche ungefähr 6 Wochen in Anspruch nimmt. Morphologisch ist das Adultstadium in drei Abschnitte gegliedert: den Skolex oder Kopf mit einem Hakenkranz (Rostellum) und vier Saugnäpfen, einer Proliferationszone, in der die Neubildung von Bandwurmgliedern (Proglottiden) erfolgt, und der Strobila (Gliederkette), die aus ca. 3-5 Proglottiden besteht. Nach Selbst- oder Fremdinsemination der hermaphroditischen Adultstadien entwickeln sich in der endständigen (oder graviden) Proglottide mehrere hundert Eier, welche das erste Larvenstadium, die Onkosphäre, enthalten (Thompson & Eckert, 1982b). Die Onkosphäre ist ein mehrzelliger, mit Muskeln und Haken ausgestatteter Organismus. Die infektiösen Eier gelangen mit Fuchs- Fäzes in die Umgebung, wo sie wegen ihrer Resistenz gegen verschiedene Umwelteinflüsse für eine gewisse Zeit überleben können. Nach Aufnahme durch natürliche Zwischenwirte, kleinen Nagern, „schlüpft“ die Onkosphäre im Dünndarm aus ihrer Eihülle und penetriert die Darmwand (Swiderski, 1983). Über lymphatische oder venöse Wege erreicht die Onkosphäre schließlich die inneren Organe, wobei in über 90 % der Fälle die Leber als bevorzugtes Zielorgan fungiert. Dieser Organ-Tropismus läßt sich nicht allein mit dem Infektionsweg über Darm und Pfortader erklären. Der nahe Verwandte *E. granulosus* benutzt zum Beispiel den gleichen Infektionsweg, das Zielorgan ist jedoch neben Leber auch die Lunge. Bei der Zystizerkose, ausgelöst durch das Finnenstadium von *Taenia solium*,

entwickeln sich die Metacestoden bevorzugt in der Haut, im Herzen und der Skelettmuskulatur, nicht aber in der Leber (Rahalkar et al, 2000). Welche Faktoren diesen Organ- Tropismus bedingen ist eine wichtige Fragestellung der derzeitigen Forschung.

In der Leber des Zwischenwirts entwickelt sich aus der Onkosphäre die Metacestode, das zweite Larvenstadium. Die Metacestode ist eine flüssigkeitsgefüllte Blase, die von einer azellulären Laminatschicht aus einem Polysaccharid- Protein- Komplex umgeben ist (Gottstein et al, 1992). Diese Schicht gibt der Metacestode strukturelle Festigkeit und ist maßgeblich am Schutz gegen das Wirts- Immunsystem beteiligt (Ewald et al, 1992). Direkt unterhalb der Laminatschicht befindet sich die zelluläre Keimschicht. Diese besteht aus einem synzytialen Tegument, welches durch Plasmabrücken mit darunterliegenden Zellagen verbunden ist. Die Metacestode vergrößert sich asexuell durch exogene Sprossung von Tochterzysten, die miteinander in Verbindung stehen und Hydatidenflüssigkeit enthalten. Auf diese Weise wächst die Metacestode multivesikulär infiltrierend durch Ausstülpungen von schlauchähnlichen Strukturen in das Wirtsgewebe ein (Vogel, 1978). Metastasierung kann in Lunge, Knochen und Gehirn stattfinden. Eine echte Wirts- Parasit- Barriere im Sinne einer Lamina adventitia wie bei der cystischen Echinokokkose kann der Wirt nicht ausbilden.

Schließlich kommt es, ausgehend von der Keimschicht der Metazestode, zur Entwicklung des dritten Larvenstadiums, des Protoscolex. Diese sind die Vorform des Adultwurms, bestehend aus einem Skolex mit Haken und Saugnäpfen, jedoch noch ohne Proliferationszone. Die Dauer der Entwicklung bis zur Protoskolex- Produktion ist mit zwei bis vier Monaten wahrscheinlich an die kurze Lebenszeit der Zwischenwirte angepasst (Rausch, 1975). Der Lebenszyklus schließt sich, wenn der Zwischenwirt durch einen Endwirt gerissen wird und so die Protoscolices im Darm ein geeignetes Milieu zur Reifung zum adulten Wurm finden.

Interessanterweise erfolgt im erkrankten Menschen zwar eine Entwicklung der Metacestoden, Bildung von Protoscolices wird aber lediglich in ca. 5% aller AE- Fälle beobachtet (Gottstein, 2000; Miguet et al., 1989), weshalb man den

Menschen als Fehlwirt für *E.multilocularis* betrachtet. Die Ursache hierfür ist noch unbekannt, möglicherweise fehlen notwendige Differenzierungsfaktoren zur Entwicklung der Protoskolices. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, daß nach Übertragung von protoskolexfreiem Metacestodengewebe vom Menschen auf einen natürlichen Zwischenwirt dieses wieder zur Bildung von Protoskolices befähigt ist (Brehm, persönl. Mitteilung).

1.3 Molekularbiologie und Biochemie von *E. multilocularis*

Die Differenzierung der verschiedenen Echinokokkus- Spezies erfolgte über lange Zeit nur über epidemiologische und ultrastrukturelle Studien. Über die molekularbiologischen Grundlagen war im Gegensatz dazu sehr wenig bekannt. Erst Mitte der 80er Jahre wurden erste Echinokokken- cDNA- Banken hergestellt mit dem vorrangigen Ziel, Antigene zur serologischen Diagnose der Echinokokkose zu gewinnen. Dabei wurden unter anderem das Em2a- Antigen von Gottstein (1985) sowie das rekombinante Em10-Antigen von Frosch et al (1991) beschrieben. Die Funktionen dieser Echinokokken- Antigene konnte jedoch nicht näher aufgeklärt werden.

Mit der Entwicklung verschiedener *in vitro* Kultursysteme (Hemphill & Gottstein, 1995; Jura et al, 1996) für die Larvenstadien des Parasiten ist mittlerweile eine Identifizierung von Faktoren, die beim Wachstum und der Entwicklung von *E. multilocularis* in der Leber eine Rolle spielen, sowie deren nähere Untersuchung mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden möglich.

1.4 Epidemiologie von *E.multilocularis*

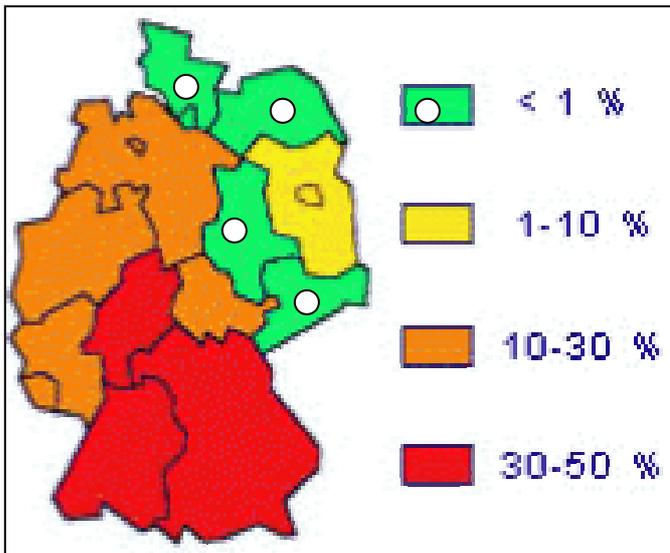


Abb.2: Vorkommen von *E. multilocularis* bei Füchsen in Deutschland. Stand 1997. Die höchsten Infektionsraten bei Füchsen kommen in Süddeutschland vor. (www.bordier.ch/echinomultilo/germany_foxes.htm)

Das Vorkommen von *E. multilocularis* ist hauptsächlich auf die Verbreitungsgebiete des Endwirts, des Rot- und Polarfuchses, beschränkt. Deshalb ist die AE fast nur in der nördlichen Hemisphäre zu finden, vor allem in Europa mit Fokus Mitteleuropa, nordöstliches Asien und Nordamerika aber auch in Osteuropa (Gottstein, 2000). Dabei ist die Häufigkeit des Fuchsbefalls sehr unterschiedlich, in Hochendemiegebieten wie der Schwäbischen Alb oder der Schweiz können bis zu 60% der Füchse befallen sein (Gottstein, 2000). Die Befallsraten der Fuchspopulation mit dem Adultstadium von *E.multilocularis* korreliert mit der Inzidenz der AE beim Menschen (Gottstein et al, 2001). Diese schwankt von 0,14-0,7 von 100000 Einwohner, beobachtet 1988 in der Schweiz, Deutschland, Frankreich und Österreich (WHO, 1997), bis hin zu 28 von 100000 Einwohner in Alaska (Wilson & Rausch, 1980). Die AE hat charakteristischerweise eine Inkubationszeit von 10 bis 15 Jahren. Durch diese lange Inkubationszeit ist der Infektionsweg meist nicht mehr nachzuvollziehen. Man vermutet eine orale Aufnahme der Eier, die sich an ungekochten Waldfrüchten oder Pilzen befinden könnten (Seitz & Frosch, 1994).

1.5 Das Krankheitsbild der „Alveolären Echinokokkose“

Die alveoläre Echinokokkose (AE) ist eine sehr schwierig zu therapierende Parasitose. Der Begriff „Alveoläre Echinokokkose“ leitet sich vom schwammartigen Erscheinungsbild des Metacestoden- Gewebes ab. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine asymptomatische Inkubationszeit von 10 bis 15 Jahren und einen anschließenden chronischen Verlauf. Die Metacestode wächst tumorartig- infiltrierend, verursacht eine Symptomatik ähnlich der einer Leberneoplasie und kann die Leber nahezu vollständig infiltrieren. Histiozyten und Lymphozyten umgeben das Parasitengewebe (Miguet & Bresson- Hadni, 1989), später findet eine chronische Entzündungsreaktion statt (Amman & Eckert, 1995). Im fortgeschrittenen Stadium findet man ein Nebeneinander von infiltrativem Wachstum, Kalzifizierungen, zentralen nekrotischen Höhlen und Fibrosierung (Gottstein, 1992). Die Beschwerden der Patienten sind bei Diagnosestellung zu einem Drittel uncharakteristische Oberbauchschmerzen, ein Drittel weist Cholestasezeichen auf und bei einem weiteren Drittel wird die Diagnose zufällig gestellt bei medizinischen Untersuchungen wegen Müdigkeit, unklarem Gewichtsverlust oder Hepatomegalie (Ammann et al, 1988). Beim weiteren chronischen Verlauf kommt es zu schweren Krankheitsbildern durch den raumverdrängenden Prozess und durch Obstruktionen vitaler Organstrukturen, wie z.B. Lebervenen oder Gallengänge (Gottstein, 2000).

1.6 Diagnosestellung der AE

Die Diagnostik basiert auf Anamnese und klinischer Untersuchung, bildgebenden Verfahren und Immunodiagnostik. Sonographie und Computertomographie (s. Abb. 3) stellen auch kleinste Läsionen in der Leber sehr gut dar, wobei die Differenzierung zu Lebermalignomen schwierig sein kann (Haertel et al, 1980; Choji et al, 1992).

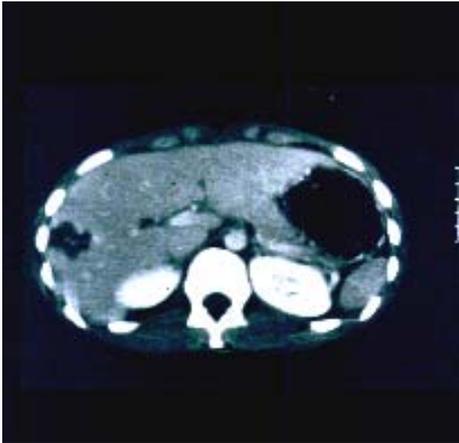


Abb.3: **CT eines an AE erkrankten Patienten.** Die Leber ist durch Infiltration stark vergrößert, sowohl im linken als auch im rechten Leberlappen sind Parasiten- Infiltrationen zu erkennen.

Im Routinelabor sind keine *E. multilocularis*- spezifischen Veränderungen zu finden (Bub et al, 1975).

Mit einem antigenspezifischen ELISA- Test kann der Nachweis der AE mit hoher Wahrscheinlichkeit erfolgen, außerdem kann damit in unklaren Fällen die AE von der CE differenziert werden. Hierbei werden monoklonale Antikörper gegen parasitenspezifische Antigene im Patientenserum eingesetzt. Das von Frosch et al (1991) klonierte EM10 (kodiert durch das Gen *e/p*) wird als GST-Fusions- Protein als Antigen zur AE- Detektion mit einer Spezifität von 99% und einer Sensitivität von 89% angewendet (Siles-Lucas & Gottstein, 2001). Daneben wurden noch weitere Antigene zur Serodiagnostik charakterisiert wie zum Beispiel EM2 aus der Laminatschicht (Gottstein et al, 1992), EM13 (Frosch et al, 1993) oder EM18 und EM16 (A. Ito et al, 1995)

PCR- Methoden zur Diagnosestellung der AE sind zur Zeit nicht von praktischer Bedeutung (Brehm et al, 1999a).

1.7 Therapie der AE

Unbehandelt führt die Erkrankung in über 90% der Fälle innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung zum Tod (H.J.Schicker, 1976; Ammann et al, 1999). Grundsätzlich gilt: Je früher die Diagnose gestellt wird, desto größer ist die Chance einer Heilung. Die einzige Möglichkeit einer kurativen Therapie stellt die operative Totalresektion des Parasitengewebes mit begleitender zweijähriger Chemotherapie (Benzimidazol-derivate) dar, was jedoch wegen des infiltrativen Wachstums des Parasiten und der meist späten Diagnosestellung

nur in 20- 30% der Fälle möglich ist (Ammann, 2000). Palliative Teilresektionen sind heutzutage kaum mehr indiziert (Ammann et al, 1999), Lebertransplantationen sind sehr umstritten wegen der hohen Rückfallrate unter Immunsuppression (Kern et al, 1994). Für Fälle, in denen die Radikaloperation nicht möglich ist, stehen die Benzimidazole Albendazol und Mebendazol als Antihelminthika zur Verfügung. Durch Bindung der Benzimidazole an Helminthen- spezifische Regionen in β - Tubulinen wird deren Einlagerung in die Mikrotubuli gehemmt (Brehm et al, 2000a; Jura et al, 1998). Wegen der lediglich parasitostatischen Wirkung auf *E. multilocularis* müssen die Chemotherapeutika, außer nach einer Totalresektion des Parasitengewebes, über viele Jahre eingenommen werden (WHO, 1997). Durch die Möglichkeit der Chemotherapie erhöhte sich die 10- Jahre- Überlebensrate von unter 10 % bei unbehandelten Patienten auf über 90 % bei behandelten Patienten (Wilson et al, 1992; Ammann et al, 1999)

1.8 Biochemische und zellbiologische Funktion von Tropomodulin

In dieser Arbeit wurde ein Protein aus *E. multilocularis* charakterisiert, welches hohe Homologien zu dem humanen Tropomodulin (Fowler, 1987) aufweist. Weitere Tropomodulin- Homologe sind beschrieben in Ratten (Woo & Fowler, 1994; Watakabe et al, 1996), Hühnchen (Gregorio & Fowler, 1995), Mäusen (M. Ito et al, 1995), *C. elegans* (GenBank Accession No. U97193) sowie in *Drosophila melanogaster*, in diesem Organismus Sanpodo genannt (Dye et al, 1998; Park et al, 1998), nicht jedoch in Hefen (Dye et al., 1998).

Diese Proteine spielen eine große Rolle in der Organisation des Zytoskeletts. Das hauptsächlich aus Aktinfilamenten bestehende Zytoskelett hat viele sehr unterschiedliche Aufgaben wie z.B. Erhaltung und Veränderung der Zellform, Zell- Zell- Interaktionen, Endo- und Exozytose, Zellbewegung und -teilung, Signaltransduktion, Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien, Wachstumsregulierung und Zelldifferenzierung (Lin et al, 1997). Um diese vielfältigen Aufgaben erfüllen zu können, unterliegt es komplexen Regulationsmechanismen, die bis heute nicht in allen Einzelheiten geklärt sind.

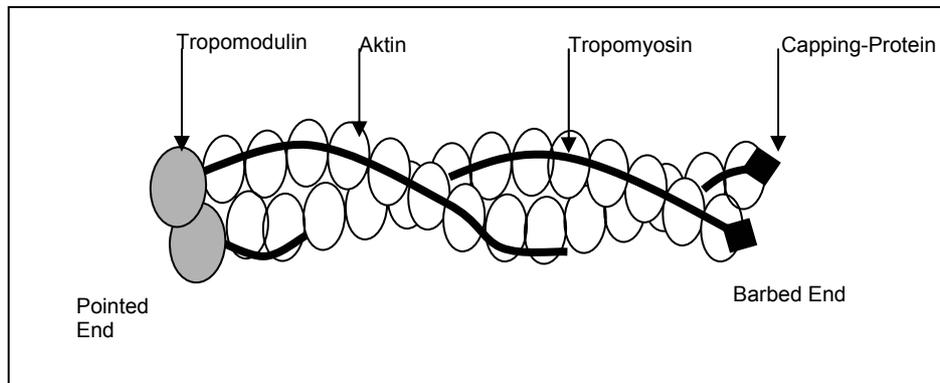


Abb.4: **Schematische Darstellung von Nichtmuskel- Aktinfilament** mit Tropomodulin als Capping- Protein am langsam wachsenden, sog. „pointed end“. Die Aktinmonomere legen sich gedreht umeinander, das stabförmige Tropomyosin legt sich an das Aktinfilament an. „Capping- Protein“ fungiert als Cappingprotein am schnell wachsenden Aktinfilament- Ende, dem sog. „barbed end“ (Schafer & Cooper, 2001).

Nichtmuskuläre Mikrofilamente sind aus filamentösem Aktin aufgebaut. Die Veränderung der Formgebung der Zelle geht einher mit einer komplex regulierten Polymerisation und Depolymerisation der Filamente (Lin et al, 1997; Fowler, 1996). Aktinfilamente weisen je ein spitzes und ein stumpfes Ende auf. Der Hauptnukleationspunkt für die Polymerisation und Depolymerisation befindet sich am stumpfen Ende, jedoch auch an den spitzen Enden findet eine Längenregulation statt (Schafer & Cooper, 1995; Pollard et al, 2000).

In Muskelzellen sind Aktinfilamente zusammen mit Myosinfilamenten entscheidend am Mechanismus der Zellkontraktion beteiligt (Gleitfilamenttheorie). Im Gegensatz zu den Nichtmuskelzellen ist hier die Länge hochkonstant, was einen äußerst exakten Regulationsmechanismus voraussetzt (Littlefield & Fowler, 1998). Aktinfilamente haben im Muskel eine Länge von 1 μm und eine Dicke von 5 nm (Schmidt & Thews, 1995) Die Längenveränderung durch Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente wird in der Zelle durch eine Vielzahl von zytoskelettassoziierten Regulationsfaktoren gesteuert. Eine besondere Bedeutung kommt regulatorischen Faktoren der spitzen und stumpfen Enden der Aktinfilamente zu. Diese Proteine werden Capping- Proteine genannt. Als Capping- Proteine

der stumpfen, schnell wachsenden Enden sind unter anderem Cap Z, Gelsolin, Adseverin und Villin bekannt, Tropomodulin und Spectrin/ Bande 4.1 regulieren das Längenwachstum an den spitzen, langsam wachsenden Enden (Schafer und Cooper, 1995; Weber et al, 1994; Fowler et al, 1993; Littlefield et al, 2001; Weber 2000). Lateral der Aktinfilamente befindet sich der Aktinstabilisator Tropomyosin sowie ERM- Proteine (Schafer & Cooper, 1995).

ERM-Proteine (Ezrin/ Radixin/ Moesin-Proteine) fungieren als Zytoskelett-Membran- verbindende Proteine und sind an der Signaltransduktion zwischen Zytoskelett und Zellmembran beteiligt (Bretscher, 1999; Vaheri et al, 1997; Tsukita & Yonemura, 1999; Bretscher et al, 1997).

Tropomyosin stabilisiert Aktinfilamente sowohl im Muskel wie auch in den Nichtmuskelzellen (Lin et al, 1997; Schafer & Cooper, 1995). In den Muskelzellen wirkt es überdies über die Interaktion mit Troponin an der Muskelkontraktion mit (Schmidt & Thews, 1995; Zot & Potter, 1987).

Für die Wirkung von Tropomodulin ist Tropomyosin ein sehr wichtiger Partner (Ursitti & Fowler, 1994), ohne Tropomyosin ist die Tropomodulin-Wirkung stark abgeschwächt (Gregorio & Fowler, 1995; Fowler, 1990).

Interessanterweise weist das bei *Drosophila melanogaster* vorkommende Sanpodo (SPDO), welches an der Entwicklung beteiligt ist, ebenfalls hohe Homologien zu EmTO auf. Die genauen Mechanismen, wie SPDO in den Entwicklungsvorgang eingreift, sind noch nicht bekannt, vorstellbar wäre eine Beteiligung an der Signaltransduktion zwischen Zellmembran und Zytoskelett (Dye et al, 1998; Skeath & Doe, 1998; Park et al, 1998).

1.9 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, über eine Differential-Display- Methode stadienspezifisch exprimierte Gene der zwei *E. multilocularis*-Larven Metacestode und Protoskolex zu identifizieren. Durch Analyse der Funktionen differentiell exprimierter Gene aus *E. multilocularis* hat man beispielsweise die Möglichkeit, neue Kenntnisse über einzelne Stadien der Larvenentwicklung zu gewinnen. Durch deren Funktionsanalyse könnte man

Rückschlüsse auf besondere physiologische und biochemische Mechanismen in den einzelnen Larvenstadien ziehen.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde unter anderem ein Homologes zu Tropomodulin aus Säugern identifiziert, dessen Gen im Weiteren *emto* und dessen abgeleitetes Protein EmTO genannt wird. Die entsprechenden Proteine aus Säugern und Insekten spielen, wie bereits oben erwähnt, eine große Rolle für die Zytoskelett- Regulation. Besonders interessant ist EmTO im Zusammenhang mit schon aus vorhergehenden Arbeiten bekannten Proteinen aus *E. multilocularis*, die hohe Homologien zu den Zytoskelettproteinen Tropomyosin sowie ERM- Proteinen aus Säugern zeigen (Hubert, 2001; Frosch et al, 1991; Brehm et al, 1999b). Hubert (2001) konnte eine Interaktion zwischen *E. multilocularis*- Tropomyosin (im Weiteren EmTY genannt) und Elp nachweisen, was bis jetzt für keines der ERM- Homologe aus Säugern belegt werden konnte. Dies könnte auf eine parasitenspezifische Interaktion hindeuten. Möglicherweise kann durch die Interaktion von EmTY mit Elp die aktinstabilisierende Konfiguration aus EmTO und EmTY gehemmt werden und zur Destabilisierung des Aktingerüsts führen. Unter diesem Hintergrund war es das weitere Ziel dieser Arbeit, das Tropomodulin- Orthologe aus *E. multilocularis* molekularbiologisch zu charakterisieren und auf funktioneller Ebene im Hinblick auf Interaktionen mit EmTY sowie Elp zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Autoklav; Brutschränke (verschiedene Fabrikate); Zentrifugen: Biofuge 15, Biofuge 15R; Omnifuge 2.0 RS, Kühlzentrifuge RC-5B	Heraeus	Hanau
DNA- Elektrophoresekammern für horizontale Gele in verschiedenen Ausführungen; Geräte zur Elektroporation, Gene Pulser™ , Pulse Controller™	BioRad	München
Gel- Dokumentationssystem Midi-Doc	Herolab	Wiesloch
Heizblock: Dri-Block, DB3	Techne	Cambridge, UK
PAA- Gelkammern, Mini- Gel- Twin, Maxigel- Long; DNA- Elektrophoresekammern für vertikale PAA- Gele Spannungsgeräte: Power Pack P24, P25; Thermocycler Trio-Thermoblock™	Biometra	Göttingen
pH- Meter	WTW	Weilheim
Schüttelinkubatoren TH 30, KS 10	Bühler	Tübingen
Sequenziergerät: ABI Prism™ Sequencer 377	Perkin Elmer	Weiterstadt
Speed Vac®Plus SC110A	Savant	New York USA
Spectrophotometer U-2000	Hitachi	San José USA
Tisch- Ultrazentrifuge TL- 100, Ultrazentrifuge L7	Beckman	München
Ultra- Turrax T25	Janke & Kunkel	Staufen
Ultraschallgerät, Sonifier®II Ultraschall Desintegrator, Mod. 250 mit Standard- Mikrospitze, konisch, 3mm	Branson	Danburg
UV Croßlinker, Stratalinker®1800	Stratagene Europe	Amsterdam, NL
Westernblotgerät	Phase	Lübeck

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

2.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Dickes und dünnes Blotting- Papier, 58 cm x 58 cm, 70 mm x 100 mm; Nitrocellulose, Prot BA85; Sterilfilterhalter, 0,45 µm	Schleicher & Schüll	Dassel
Elektroporationsküvetten, 0,2 cm	Eurogentec	Seraing, Belgien
Nylonmembran <i>porablot NY plus</i>	Macherey & Nagel	Düren
Spritzen und Kanülen	Braun AG	Melsungen
Reaktionsgefäße, 0.5, 1.5 und 2.0 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Röntgenfilm Hyperfilm™- MP	Amersham	Braunschweig
15 ml Röhrchen (steril)	Greiner	Nürtingen
15 und 50 ml Zentrifugengefäße	Falcon	Heidelberg
Sterilfilter, 150 ml Bottle Top Filter, 0,45 µm	Nalgene	New York
<i>Quickseal™</i> Zentrifugengefäße 25 x 89 mm; Polyallomer Zentrifugengefäße, 13 x 51 mm	Beckman	München

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendetes Verbrauchsmaterial.

2.3 Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Agar- Agar; Glucose; Agarose NEE0; Bacto- Peptone; Hefeextrakt; Galactose; dNTPs lyophilisiert	Roth	Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS); EDTA; Ethidiumbromid; Tween® 20; TEMED; Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
Acrylamid 30, 40; Aminosäuren; Ampuwa; Antibiotika; DEPC; Dimethylformamid (DMF); Orange G; Paraffinmineralöl; Ponceau S	Sigma	Deisenhofen
Ampicillin Binotal®	Bayer	Leverkusen
Ampli Taq®; Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready- Reaction Mix	Perkin Elmer	Weierstadt
Bacto Agar; Bacto Peptone; Bacto Yeast Extract; Raffinose; Yeast Nitrogen- Base ohne	Difco Laboratory	Augsburg

Aminosäuren		
Cäsiumchlorid ultraPure™; LB Agar „Lennox L Agar“; LB Broth Base “Lennox L Broth Base”; RNA Längenstandard (0,24- 9,5 kB)	Life Technologies	Karlsruhe
ECL Chemiluminescence	Amersham Buchler	Braunschweig
Goldstar <i>Taq</i> DNA Polymerase; Smart- <i>Ladder</i>	Eurogentech	Seraing, Belgien
Isopropyl- β- Thiogalaktosid (IPTG); X- Gal; Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem	Heidelberg
Kanamycin	Sigma	Deisenhofen
Klenow Enzym Superscript II	Boehringer	Mannheim
MMLV Reverse Transkriptase Deoxynucleotide Mix 100mM (25mM je dNTP)	Stratagene	Heidelberg
PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom	Berlin
QIAprep Spin Miniprep Kit QIAquick; QIAquick PCR Purification Kit ; Qiagen Gel Extraction Kit; QIAquick Gel Extraction Kit; RNeasy® Mini Kit	Qiagen	Hilden
Restriktions- und DNA modifizierende Enzyme	New England Biolabs (NEB)	Schwalbach
Topo- TA Cloning® Kit	Invitrogen	Groningen, Niederlande

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Reaktionskits und Enzyme.

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a. Qualität von Merck, Darmstadt oder Serva, Heidelberg bezogen.

2.4 Puffer und Lösungsmittel

Alle Puffer und Lösungen, die autoklaviert oder steril- filtriert wurden, wurden mit einmal destilliertem H₂O angesetzt. Für alle enzymatischen Reaktionen und für die Herstellung kompetenter Bakterien etc. wurde autoklaviertes doppelt destilliertes H₂O (ddH₂O) verwendet. Für Arbeiten mit RNA wurde dieses Wasser zusätzlich mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Zum Lösen von DNA wurde der pH Wert des autoklavierten ddH₂O auf pH 8 eingestellt. Beachte: Der

pH Wert sinkt nach ungefähr einer Woche durch Reaktion mit Kohlendioxid aus der Luft erneut auf pH 5- 6 und muß deshalb evtl. neu eingestellt werden.

2.5 Antikörper

Primäre Antikörper:

mAK2810: monoklonaler Antikörper gegen Elp 1:500- 1:1000 für Western-Blot (Helbig et al, 1993)

12CA5: monoklonaler IgG- Antikörper gegen den HA- Tag und POX- konjugierter 12CA5 (Boehringer, Mannheim)

Anti- Myc: monoklonaler IgG Antikörper gegen den Myc- Tag (Clontech, Heidelberg) und POX- konjugierter anti- Myc (Boehringer, Mannheim)

Sekundäre Antikörper:

POX- anti- mouse: Peroxidase conjugated AffiniPure Goat Anti- Mouse IgG, (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.)

POX- anti- rabbit: Peroxidase conjugated AffiniPure Goat Anti Rabbit IgG (H+L) + IgM (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.)

2.6 Plasmide

pPCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen)

linearisierter Vektor mit 3'- Thymidin- Überhängen zur Klonierung von PCR- Produkten mit 3'- Adenosin- Überhängen, f1 *ori*, ColE1 *ori*, *lacZ*, multiple Klonierungsregion (*MCS*) flankiert von T7- RNA- Promotor, Amp^R, Kan^R

pNLexA (Finley und Brent, 1996) (s. Ergebnisse 2.3.1)

pJG4-5 (Finley und Brent, 1996) (s. Ergebnisse 2.3.1)

pSH18- 34 (Finley und Brent, 1996)

Plasmid, welches das lacZ- Reporter- Gen enthält mit P_{GAL1} fusioniert an lacZ, vier colE1 Operatoren, 2μ ori, URA3, pBR ori, Amp^R.

pJK101 (Finley und Brent, 1996)

Plasmid zur Messung der Repression durch LexA- Fusionen. Es enthält den größten Teil der UAS_G und einen colE1- Operator zwischen UAS_G und die GAL1- TATA- Box, pBR ori, Amp_R, URA3 und 2μm ori.

pSH17- 4 (Finley und Brent, 1996)

Derivat des pEG202- Vektors, exprimiert LexA- GAL4- Fusionsprotein, welches an die LexA operatoren upstream der Reportergene bindet und Transkription des *LEU2*- bzw. *lacZ*- Reporters aktiviert.

pRFHM1 (Finley und Brent, 1996)

Derivat des pEG202- Vektors, exprimiert die LexA- BD fusioniert an ein transkriptional inertes Fragment aus der Sequenz des Drosophila Bicoid Produktes.

pGADT7- Vektor (Clontech) (s. Ergebnisse 2.3.2)

pGBKT7- Vektor (Clontech) (s. Ergebnisse 2.3.2)

2.7 Oligonukleotide

Sämtliche der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von ARK Scientific, Darmstadt, bezogen.

Primer zur SMART- cDNA- Synthese:

CD3RT: ATC TCT TGA AAG GAT CCT GCA GGA CTT TTT TTT TTT TTT
TTT TTT TTT TTT VX

CD5RT: TAT AAG CTG CAG ACA CGG ATC CAA CGC GGG

CD3: ATC TCT TGA AAG GAT CCT GCA GG
CD5: CCG ATG GCT GGC ATG CAC CA
CD5G: GCA GAC ACG GTA CCA ACG CGG GG

Elp (EM10)- Primer:

EM10-SL: TCC TTA CCT TGC AGT TTT GT

Primer für Differential Display Untersuchungen:

HT14V: CGA CGA CGC AAG CTT TTT TTT TTT TTT V
DNP 256: GTT CGA GAC CTC TCA CCG CAG ATC NNN N
HT14: CGA CGA CGC AAG CTT TTT TTT TTT TTT
DP256: GTT CGA GAC CTC TCA CCG CAG ATC
T14VN: TGC GAA GCT TTT TTT TTT TTT TVN
R24NN: CCT CTC ACC GCA GAT CNN

Emto- Primer:

Tmod-M4-5': GCA TCA ACG AGG CCT TGG AC
Tmod-M3-3': GTC CAA GGC CTC GTT GAT GC
Tmod a: GAA GCG AGT TGT CCG GGT CG
Tmod 5': CTG GTT GAT GCG CTT ATT TG
Tmod b: CGA ATC GTA TTT GTC CAG CG
Tmod-I3-5': ACT CTT CCG TCC CTT GAA GG
To-RT-5': CAA AGA ATG ATC CAG ACT GG
To-RT-3': CCG CTG CGA GCT TCT TAA TG

Primer für die Nested-PCR:

T7NHSP: CAC TAT AGG GCG AXX XCA TG
T7NALUR: CAC TAT AGG GCG AXX XTG CA
T7SAU: CAC TAT AGG GCG AXX XGA TC
Tmoda : GAA GCG AGT TGT CCG GGT CG
Tmodb : CGA ATC GTA TTT GTC CAG CG
TOPO-T7 : TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA
Tmod-I2-5': GAC GAG TTT AGC TGA TCT GG

Primer zur Klonierung der Fusionsproteine in Two- Hybrid- Vektoren:

Primer zur Klonierung von *emto* in den Vektor pJG4-5:

E1-tromo-5': CCG **GAA TTC** TCT AAC AAG ACG CTG TTC GG

X1-tromo-3': CCG **CTC GAG** CTA GGC ACC CTT ATT GAC AC

Primer zur Klonierung von *emto* in den Vektor pNLexA:

E1-troV2: CCG **GAA TTC** ATG TCT AAC AAG ACG CTG TTC

X1-troV2: CCG **CTC GAG** GGC ACC CTT ATT GAC ACG G

Primer zur Klonierung von *emto* in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7:

TO5'-Nde1: CCG **CAT ATG** TCT AAC AAG ACG CTG TTC GG

TO3'-BamH1: CCG **GGA TCC** CTA GGC ACC CTT ATT GAC AC

Primer zur Klonierung von *emty* in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7:

KH13: CCG **CAT ATG** GAT TCC ATC AAA AAG AAG ATG ATG

KH14: CCG **GGA TCC** TCA GAA GGA AGT GAG CTC CG

Vektorprimer:

Primer für den Vektor pPCR2.1[®]TOPO:

M13: GTA AAA CGA CGG CCA GT

M13r: CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Primer für den Vektor pJG4-5:

JG4-5-5': GAT GCC TCC TAC CCT TAT GAT G

JG4-5-3': TTG GAG ACT TGA CCA AAC CT

Primer für den Vektor pGADT7:

T7 Sequencing Primer: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC

3'AD Sequencing Primer: AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG

Primer für den Vektor pGBKT7:

T7 Sequencing Primer s. oben

3'BD Sequencing Primer: TAA GAG TCA CTT TAA AAT TTG TAT

2.8 Parasitenmaterial

Das *E. multilocularis*- Larvenmaterial wurde in kontinuierlicher Passage in den Wüstenspringmäusen *Meriones unguiculatus* als Zwischenwirte gehalten.

2.9 Techniken zum Arbeiten mit Bakterien

2.9.1 Bakterienstämme

E. coli DH5 α (Hanahan, 1983)

F⁻ *endA1 hsdR17*(r_K⁻, m_K⁻) *supE44 thi-1* □⁻ *recA1 gyrA relA1* Δ (*lacIZYA-argF*)U169, *deoR1*. Φ 80/*lacZ* Δ M15

E. coli TOP10 (Invitrogen)

F⁻ *mcrA* (Δ *mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endAI nupG**

2.9.2 Nährmedien

Luria- Broth- Medium

(LB- Medium): 1,0 % Bacto- Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1,0 % NaCl, pH 7,5

LB- Agar: LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar

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

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

Bei Antibiotikazusatz wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Ampicillin 100 μ g/ml in H₂O gelöst;

Kanamycin 30 μ g/ml in H₂O gelöst.

2.9.3 Kulturbedingungen

Alle Inkubationen finden bei 37 °C statt. *E. coli* wird auf LB- Agar inkubiert. Bei rekombinanten Bakterienstämmen werden dem Medium die zur Selektion notwendigen Antibiotika zugesetzt.

2.9.4 Transformation von Bakterien

Als Transformationskompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. *E. coli* können durch Modifikationen der Zelloberfläche kompetent gemacht werden.

Elektroporation von *E. coli*

Elektroporation ist eine Methode zur Transformation von DNA in die unterschiedlichsten Zell- Typen. Man nutzt dabei die Möglichkeit, daß Zellen exogene DNA aus der umgebenden Lösung aufnehmen können, wenn sie einem elektrischen Schock unterworfen werden, der kurzzeitig Löcher in der Membran verursacht. Die Transformationseffizienz bei der Elektroporation ist sehr hoch (bis 10^{10} cfu/ μ g DNA), weshalb sie gegenüber anderen Methoden bevorzugt wird. Diese Methode eignet sich gut zur Transformation von großen Plasmiden (>10 kb).

Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation (Böttger, 1988)

Eine Übernacht- Flüssigkultur der Bakterien wird zu 700 ml LB- Medium gegeben, um die OD₆₀₀ auf 0,1- 0,2 einzustellen. Anschließend wird die Suspension bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nachdem die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt worden sind, werden sie 15 min bei 2700 x g und 4°C abzentrifugiert, einmal in 1000 ml und einmal in 500 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Danach Aufnahme der Zellen in 20 ml eiskaltem Glycerin (10 % V/V) und erneute Zentrifugation für 15 min bei 2700 x g. Resuspension der kompetenten Zellen in 1,5 ml eiskaltem Glycerin (10 % V/V) und Aufteilung in 40 μ l- Portionen. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis werden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

Vorbereitung der DNA für die Elektroporation

Da salzhaltige Lösungen bei der Elektroporation zu Kurzschlüssen führen, ist es notwendig, die Salzkonzentrationen zu minimieren. Dazu können die

Ligationsansätze zunächst phenolisiert werden und nach Ethanolfällung in ddH₂O aufgenommen werden. Die bei dieser Reinigung entstehenden unvermeidlichen Verluste sind für die Ligation der cDNA zu groß, so daß der Ligationsansatz im Verhältnis 1:3 mit ddH₂O verdünnt wird, um die Salzkonzentration zu verringern. Es wird 1 µl des verdünnten Ligationsansatzes pro 40 µl Zellen elektroporiert.

Durchführung der Elektroporation
(Calvin & Hanawalt, 1988)

40 µl der kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe der DNA wird die Mischung zunächst 5 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm) pipettiert. Die Elektroporation findet mit folgenden Einstellungen statt: 400 Ω, 25 µF, 2,5 kV/cm. Sofortige Überführung der elektroporierten Bakterienzellen in 1 ml SOC- Medium und Inkubation für 1 h bei 37 °C unter Schütteln. Der Elektroporationsansatz wird in geeigneten Aliquots auf Antibiotika- haltigem LB- Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation von CaCl₂- kompetenten Zellen

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

CaCl₂/ Glycerinlösung: 7 Teile 50mM CaCl₂, 1 Teil 100% Glycerin
Von einer über Nacht bei 37 °C mit *E. coli* inkubierten LB- Agarplatte werden mit einer Impföse einige Kolonien abgenommen und in 100 ml LB- Medium überführt. Die Bakterien werden unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt. Aliquots à 20 ml werden 10 min bei 5000 x g zentrifugiert, die Bakteriensedimente jeweils in 10 ml eiskalter 100 mM MgCl₂- Lösung resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Das gesamte Bakteriensediment wird jetzt in 10 ml eiskalter 50

mM CaCl_2 - Lösung resuspendiert und wieder zentrifugiert. Abschließend nimmt man die Bakterien in jeweils 1 ml eiskalter CaCl_2 / Glycerin- Lösung auf und läßt sie für 20 min auf Eis stehen. Die Bakterien werden in Aliquots à 100 μl / 200 μl auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Transformation (Hanahan, 1983)

100 μl CaCl_2 - kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 100- 200 ng Plasmid- DNA bzw. mit einem Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Das Volumen des Ligationsansatzes darf 1/10 des Volumens der kompetenten Zellen nicht überschreiten. Zellen und Plasmid- DNA gehen bei niedrigen Temperaturen (0- 5°C) eine Wechselwirkung in Gegenwart von Ca^{2+} - Ionen ein, die DNA lagert sich an die Zellwand an. Im Anschluß erfolgt ein Hitzeschock für 40 s bei 42°C , wodurch die direkte Aufnahme der DNA erleichtert wird. Nach einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis wird der Transformationsansatz in 3 ml LB- Medium überführt und 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Selektion der Transformanden werden die Zellen in geeigneten Aliquots auf Antibiotika- haltigem Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Klonierung mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen)

Ansatz: 0.5-2 μl PCR- Produkt
 1 μl PCR[®]- TOPO- Vector
 1 μl Salt Solution
 ddH₂O ad 6 μl

→ mischen, für 5- 10min auf Eis inkubieren.

Zum Sequenzieren der klonierten Fragmente wurden entweder die Klonierungsprimer und Vektorprimer benutzt oder es wurden Primer aus den Insert- Sequenzen gewählt.

One Shot™ Transformationsreaktion

Die Ca²⁺- kompetenten One Shot Zellen werden auf Eis aufgetaut. Die Zugabe von 2 µl des Klonierungsansatzes erfolgt durch vorsichtiges Mischen, nicht durch Pipettenspitze ziehen. Es findet eine 30 minütige Inkubation auf Eis statt. Anschließend werden die Zellen bei 42°C für 40 Sek einem Hitzeschock ausgesetzt, für 2 Min auf Eis abgekühlt und mit 250 µl auf Raumtemperatur angewärmten SOC-Mediums versetzt. Die Zellsuspension wird eine Stunde lang bei 37°C im Schüttler inkubiert. Kurz vor der Beimpfung LB- und Ampicillin-Platten mit dem Versuchsansatz wird 40 µl X- Gal (in DMF) auf den Platten ausgestrichen.

Die Agarplatten inkubieren bei 37°C über Nacht im Brutschrank. Es bilden sich weiße und blaue Kolonien. Die weißen Kolonien haben das gewünschte Fragment aufgenommen und können weiter verarbeitet werden. Die blauen Kolonien sind ohne Fragment und können daher ignoriert werden.

2.10 Techniken zum Arbeiten mit dem Parasiten

Metacestoden von *E. multilocularis* werden kontinuierlich in mongolen Wüstenrennmäusen *Meriones unguiculatus* gehalten. Für diese Arbeit wurden die Isolate T1 (Fuchsisolat aus Tirol), H95 (Fuchsisolat aus Hohenheim) und K188 (Fuchsisolat aus Kärnten in Österreich) verwendet. Die Infektion von 8- 10 Wochen alten Mäusen erfolgt durch intraperitoneale Injektion von 0.5 ml homogenisiertem Parasitengewebe in sterilem 1 x PBS. Das Heranreifen des Parasiten erstreckt sich über einen Zeitraum von ca. zwei Monaten.

Isolierung und Aufbereitung von *E. multilocularis* Larvengewebe

Das Larvengewebe wird aus der Bauchhöhle infizierter Wüstenspringmäuse mit sterilem Skalpell und Pinzette entnommen. Mit dem Skalpell und durch Spülen mit PBS werden als Meriones- Gewebe und Blut erkennbare Reste entfernt.

Das Larvengewebe wird dann mit Hilfe eines Pistills (Rückseite eines sterilen 10 ml Spritzenkolbens) durch ein autoklaviertes Plastik-Küchensieb homogenisiert und dreimal mit 1 x PBS in einem 50 ml- Plastikfalkon gewaschen.

2.11 Techniken zum Arbeiten mit RNA

Sämtliche Lösungen und Puffer zum Arbeiten mit RNA werden über Nacht mit 0,1% DEPC versetzt und anschließend autoklaviert. Glasgefäße und Metallgegenstände werden bei 240°C für 5 h hitzesterilisiert, Eppendorfgefäße und Pipettenspitzen werden zweimal autoklaviert. Alle Einmalgebrauchsgegenstände werden unbedingt aus ungeöffneten Packungen entnommen. Es wird ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet!

RNA- Präparation

Lösungen:

GITC: 4 M Guanidiniumisothiocyanat, 50 mM Tris- Hcl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8, 2 % (v/v) Na- N- Lauroylsarkosin, 1% (v/v) β- Mercaptoethanol

CsCl: 5,7 M CsCl (w/v), 20 mM Tris- Hcl pH 7,5; 2 mM EDTA pH 8

Mindestens fünf Milliliter homogenisierter Tumor werden mit 50 ml GITC- Puffer mit β- Mercaptoethanol versetzt und im Ultraturrax für 3 x 15 sek auf Eis aufgebrochen. Vor Benutzung des Ultraturrax das autoklavierte Messer dreimal abwechselnd mit mit GITC- Puffer und DEPC- H₂O reinigen. Zum Scheren der genomischen DNA wird die Suspension dreimal durch 25 G- und einmal durch 27G- Kanülen gezogen. Nach anschließender Zentrifugation bei 4000 x g wird der Überstand in 12 ml Ultrazentrifugenröhrchen auf 3,5 ml 5,7 mol Cäsiumchloridkissen aufgetragen. Die Ultrazentrifugation erfolgt bei 32 000 rpm bei 18°C für mindestens 16 h. Das RNA- Pellet wird unter sterilen Bedingungen isoliert. Dazu werden mit einer Pasteurpipette erst ca. 5 ml des Überstandes abgenommen und dann mit einer zweiten Pasteurpipette der Überstand bis 1 cm vor dem Boden des Gefäßes abgezogen. Das Gefäß wird auf den Kopf

gestellt, um den restlichen Überstand zu entfernen. Der Boden wird mit einem in der Flamme erhitzten Skalpell abgeschnitten und das RNA- Pellet mit DEPC-H₂O auf Eis resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wird durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na- Acetat, pH 5,2 und 2 Vol. 100 %igem eiskaltem Ethanol über Nacht bei -80 °C gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation mit 15000 x g bei 4 °C wird das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend bei 37 °C getrocknet und in 200 µl DEPC- ddH₂O aufgenommen. Quantität und Qualität der RNA werden photometrisch bzw. mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

Denaturierende Agarose- Gelelektrophorese für RNA

10 x Laufpuffer: 200 mM MOPS, 10 mM EDTA, 50 mM Na-Acetat, pH 6,7-7,0 mit NaOH einstellen

Probenpuffer: 12 µl Formamid:Formaldehyd: 10 x Laufpuffer im Verhältnis 2 : 1 : 1, 2,5 µl 20 % Ficoll/ Orange- G- Lösung

50 ml eines 1 % Gels werden hergestellt mit 1 x Laufpuffer, DEPC- H₂O, 0,65 % (ca. 0,9 ml) Formaldehyd, Ethidiumbromid (2,5 µl Ethidiumbromid einer Konzentration von 1 mg/ ml) und 0,5 g Agarose. 4 µl RNA werden mit dem Probenpuffer versetzt. Nach 5 min Denaturierung bei 65 °C werden die Proben auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1 x Laufpuffer bei 60 V bis die Orange- G- Front 2/3 bis 3/4 des Geles durchwandert hat.

2.12 Techniken zum Arbeiten mit DNA

2.12.1 DNA- Präparationen

Schnellmethode zur Plasmid- DNA- Isolierung

TENS: 9,5 ml ddH₂O, 100 µl 1 M Tris pH 7,5, 100 µl 10 N NaOH, 20 µl 0,5 M EDTA, 250 µl 20% SDS

Diese Plasmid- Isolierung dient vor allem der schnellen Überprüfung von Transformanten einer Transformation in *E. coli*. 3 ml LB- Selektivmedium

werden mit einer *E. coli*- Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur werden im Eppendorf- Gefäß für 10 s bei 14000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf ca. 100 µl entfernt und das Bakterienpellet wird durch Vortexen für 3 min resuspendiert. Zu dieser Suspension gibt man 300 µl frisch angesetztes TENS zur Zellyse und mischt durch leichtes Über- Kopf- Schütteln. Es darf bei diesem Schritt nicht gevortext werden. Es folgt eine Zentrifugationsschritt für 8 min bei 14 000 x g und bei RT. 450 µl des Überstandes werden in ein neues 1, 5 ml RG überführt und mit 900 µl Ethanol (100 % v/v, RT!) versetzt und gemischt. Das DNA- Pellet wird durch Zentrifugation für 15 min bei 14000 x g und 4 °C gewonnen. Nach einem Waschschrift des DNA- Pellet mit 500 µl Ethanol (70 % v/v) wird der Überstand sorgfältig entfernt und die DNA im Vakuum für 5 min getrocknet. Das DNA Pellet kann in 20 µl ddH₂O mit 20 µg/ml RNase aufgenommen werden.

Mini/ Midi- Präparation von Plasmid- DNA

Für präparative Arbeiten und Sequenzierungen ist die Reinheit und Menge, der aus der Schnellpräparation gewonnenen Plasmid- DNA meist nicht ausreichend, so daß hierfür eine Präparationsmethode verwendet wird, bei der die DNA nach alkalischer Lyse der Bakterienzellen über spezielle Silicagel-Anionenaustauschersäulen aufgereinigt wird. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden mit dieser Methode von der Plasmid- DNA getrennt. Diese Plasmidpräparationen werden mit dem QIAGEN® Plasmid- DNA- Isolierungskit von Qiagen nach Anleitung durchgeführt.

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

Puffer: 0,1 M Tris pH 8, 0,5 M NaCl, 0,05 M EDTA

Das Larvenmaterial wird aus dem Zwischenwirt isoliert und mit Stickstoff zu einem weißlichen Pulver zermörsert, welches in der ca. achtfachen Menge an Puffer aufgenommen wird. Das Gemisch wird 4- 5 x durch eine Glaspipette gezogen und anschließend mit 0,5 % SDS tropfenweise versetzt. Für 15min bei

65°C inkubieren lassen. Nach einer 30 min Abkühlung auf RT gibt man 100 µg/ml Proteinase K zu und läßt das Gemisch über Nacht bei 37°C inkubieren. Am nächsten Tag wird die DNA zweimal mit Phenol, einmal mit 1:1 Phenol/Chloroform und zweimal mit 24:1 Chloroform/ Isoamylalkohol extrahiert. Der wäßrige Überstand wird mit 100 % EtOH für 30 min bei -80°C gefällt und anschließend bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wäscht man mit 70 % EtOH, läßt es trocknen und löst die DNA in H₂O. Die Mengenkontrolle der chrom. DNA findet an einem Photometer statt.

Phenolisierung und Ethanol-fällung von DNA

Um aus DNA- haltigen Reaktionsansätzen für nachfolgende Reaktionen störende Proteine (Enzyme), Primer und Puffer zu entfernen, werden die entsprechenden Proben phenolisiert und die DNA anschließend präzipitiert.

Das Ausgangsvolumen wird mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) versetzt, gründlich gemischt und zur Phasentrennung 2 min bei 15000 x g zentrifugiert. Wenn man nur mit geringen Mengen DNA arbeitet, kann man die Konzentration der DNA in der wäßrigen Phase erhöhen, wenn man die organische Phase einmal mit 100 µl mit ddH₂O rückextrahiert. Die wäßrige Phase wird abgenommen, mit einem Zehntel des Volumens der wäßrigen Phase 5 M NaCl versetzt und die DNA nach Zugabe des doppelten Volumens Ethanol (100 % V/ V) 30 min bei -70 °C gefällt. Nach 20 minütiger Zentrifugation (15000 x g, 4 °C) wird der Überstand verworfen, das Sediment mit Ethanol (70 % V/ V) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das resultierende DNA- Sediment wird vakuumgetrocknet und in ddH₂O aufgenommen.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR- Ansätzen

Die Extraktion von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen wird mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits durchgeführt. Die Isolierung amplifizierter DNA- Fragmente aus PCR- Ansätzen erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Beide Verfahren basieren auf der selektiven Bindung der DNA an

Silikagel- Membranen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen bei einem pH-Wert von $\leq 7,5$. Die DNA wird in pH8- H_2O gelöst. An ein Absorptions- Säulchen können bis zu 10 μg DNA binden. Bei der Gel- Extraktion können Fragmente von 70 bp bis 10 kb isoliert werden, im PCR- Purification Kit trennt man 100 bp- 10 kb- große Fragmente von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen. Die gereinigte DNA ist für jegliche weitere Anwendung geeignet, inklusive Sequenzierungen, Hybridisierungen und Transformationen.

2.12.2 Agarose- Gelelektrophorese für DNA (nicht denaturierend)

1 x TAE: 100 mM TRIS-HCl, pH 8.3

6 x Proben-Puffer: 6 g Saccharose (100 %) in 10 ml H_2O lösen,
Bromphenolblau, Xylencyanol

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgt in Agarosegelen, wobei die Agarosekonzentration in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente gewählt wird; z.B. 0,8 % Agarosegele für 0,8 - 12 kb, 1 % Agarosegele für 0,5 - 10 kb und 1,5 % Agarosegele für 0,2- 3 kb.

Die jeweilige Agarosemenge wird in 1x TAE unter Erhitzen gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in horizontale Gelträger gegossen. Die zu analysierenden DNA- Lösungen werden vor dem Auftragen mit 6 x Puffer verdünnt. Die Lauffront wird dabei von Bromphenolblau und Xylencyanol bestimmt. Als DNA- Größenstandard wird die Smart- Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei 100- 200 V bei RT. Um die DNA- Banden sichtbar zu machen, werden die Gele für 10 min zum Anfärben in eine Ethidiumbromidlösung (2 mg/ l) gelegt und anschließend unter UV- Licht (302 nm) betrachtet. Aufgrund der konstanten Menge an Größenmarker, die verwendet wird, lässt sich die Menge der zu analysierenden DNA- Fragmente visuell abschätzen.

Marker für die Gelelektrophorese

Zur Beurteilung der Größe unbekannter DNA- Fragmente werden zusätzlich zu den Proben in der Gelelektrophorese Spaltansätze, die schon bekannte Fragmentgrößen beinhalten, aufgetragen. Für diese Arbeit wurden der 1 kb-Marker 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		Bandengröße; ng/Bande	
1kb-Marker:	3000 kb	Smart-Ladder:	10000 kb	100
	2000 kb		8000 kb	80
	1600 kb		6000 kb	60
	1000 kb		5000 kb	50
	519 kb		4000 kb	40
	506 kb		3000 kb	30
	396 kb		2500 kb	25
	344 kb		2000 kb	20
	298 kb		1500 kb	15
	220 kb		1000 kb	100
	201 kb		800 kb	80
	154 kb		600 kb	60
	134 kb		400 kb	40
			200 kb	20

Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

(Sambrook et al, 1989)

Zur Messung werden 4 µl RNA bzw. 5 µl DNA eingesetzt bei 260 nm Wellenlänge. 1 OD entspricht bei RNA ca. 40 µg/ml, bei DNA ca. 50µg/ml.

2.12.3 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Die DNA- Sequenzierung erfolgt mit dem automatischen Sequenzierungsgerät "ABI Prism™ Sequencer 377" (Perkin Elmer) nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy- Methode (Sanger et al, 1992). Der Sequenzieransatz enthält 0,4 µg Plasmid- DNA oder 0,1 µg PCR- Produkt, 5- 10 pmol spezifischen *Primer* sowie 2 µl Sequenzier- Mix.

Sequenzanalysen

Die ermittelten DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit der Lasergene-Sequenzanalyse- Software (DNASTar, Madison, USA) analysiert.

Sequenzvergleiche erfolgten mit der Clustal V- Methode des MegAlign- Programms (Higgins und Sharp, 1989). Sequenzvergleiche mit der GenBank- und der SWISS- PROT- Datenbank erfolgten über den *Server* des *National Center for Biotechnology Information* (Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>).

2.12.4 Klonierungsmethoden

Restriktionsverdau von DNA

Alle Restriktionsverdauungen erfolgen in den von den Herstellern (NEB) empfohlenen Pufferbedingungen. Der Reaktionsansatz von 10 µl mit 1- 2 U Enzym/ µg DNA wird für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgt die Kontrolle auf einem Agarosegel.

DNA- Ligation

Die Ligation von DNA- Fragmenten in linearisierte Vektoren erfolgt mit Hilfe der T4- DNA Ligase unter Zusatz von ATP. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung zwischen einer 3'- Hydroxyl- und einer 5'- Phosphatgruppe zu einer Phosphodiesterbindung.

Die Ligation in 1 x Ligase-Puffer (NEB) wird über Nacht bei 16 °C in einem Reaktionsvolumen von 10- 20 µl mit 1 µl (400 U/ µl) T4- Ligase durchgeführt.

Die Mengen von Vektor und zu ligierendem DNA- Fragment sollten dabei 50-100 ng im Verhältnis 1 (Vektor) : 3 (DNA) betragen.

Anschließend wird die Transformation mit der gewünschten Transformationsmethode durchgeführt (s. Mat. & Meth., 2.9.4).

Transformanden- Kontrolle mittels PCR

Diese Methode dient der Überprüfung von Transformanden. Mit spezifischen Primern aus dem Vektor und dem DNA- Insert kann erstens getestet werden, ob der Transformand die transformierte DNA aufgenommen hat und zweitens, ob das DNA- Insert in der richtigen Richtung bei der Ligation in den Vektor inseriert ist. Dazu wird eine Kolonie vom Selektionsagar gepickt und in ein 500 µl- Eppendorfgefäß mit 50 µl flüssigem Selektionsnährmedium gegeben. Nach Homogenisieren der Kolonie mit dem Medium durch ca. dreimaliges Aufziehen mit der Pipette werden 30 µl der Mischung in ein Glasgefäß mit 3 ml flüssigem Selektionsnährmedium gegeben und zur evtl. Weiterverarbeitung über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die verbleibenden 20 µl werden abzentrifugiert und das Bakterienpellet als 2 µl- Template für die nachfolgende PCR im 25 µl- Ansatz genutzt. Nach Überprüfung der PCR- Produkte im Agarose- Gel kann mit den Klonen, die das Fragment aufgenommen haben, weitergearbeitet werden.

2.12.5 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al, 1988)

Mit Hilfe der Polymerase- Kettenreaktion können definierte DNA- Abschnitte mit spezifischen Oligonukleotiden (Primern) unter Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (TAQ- Polymerase) amplifiziert werden. Die Primer werden so gewählt, daß sie den gewünschten Bereich flankieren. Die *in vitro*- Vervielfältigung der DNA- Abschnitte wird im *Thermocycler* durchgeführt.

Reaktionsablauf im *Thermocycler*:

- | | | |
|-------------------|----------|---|
| 1. Denaturierung | 120-300s | bei 94 °C |
| 2. Hybridisierung | 60 s | bei der <i>Primer</i> - spezifischen <i>Annealing</i> -
Temperatur |
| 3. Extension | | bei 72 °C |
| 4. Denaturierung | 60 s | bei 94 °C |
| 5. Hybridisierung | 60 s | bei der <i>Annealing</i> - Temperatur |
| 6. Extension | 600 s | bei 72 °C (abschliessende Auffüllreaktion) |

Die Hybridisierungstemperatur der *Primer* richtet sich nach dem A/T- und G/C- Gehalt der Oligonukleotide. Sie wird 2- 4°C unterhalb der nach der 2 + 4- Regel (2°C pro AT- bp, 4°C pro GC- bp) berechneten Schmelztemperatur gewählt. So erfolgt die Anlagerung der Primer nur an die *Primer*- spezifischen DNA- Abschnitte und eine Amplifikation unspezifischer DNA- Fragmente wird verhindert. Die Dauer der Polymerase- Reaktion richtet sich nach der Länge des DNA- Fragmentes, das amplifiziert werden soll. Innerhalb 1 min erfolgt ein Einbau von ca. 1000 Nukleotiden. Für Sequenzen, die mehr als 1,5 kb enthalten, muß eine MgCl₂- Konzentration verwendet werden, die höher als 1,5 mM ist. Die Schritte 2- 5 werden in einer Normalreaktion 36 mal durchlaufen. Die letzte Extensionszeit gibt mit 10 min der Polymerase Zeit, die Enden des amplifizierten PCR- Produktes aufzufüllen.

PCR- Ansatz mit der Goldstar DNA- Polymerase:

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

- | | |
|-----------|---|
| 10- 20 ng | Plasmid- DNA, chromosomale DNA oder cDNA als <i>Template</i> |
| 10 µl | 10 x PCR- Puffer |
| 6 µl | MgCl ₂ (25 mM), Endkonzentration 1,5 mM |
| 10 µl | dNTPs, Endkonzentration von je 20 µM von dATP, dGTP, dCTP, dTTP |
| 1 µl | <i>Primer</i> A, Endkonzentration 2 µM |

1 μ l *Primer B*, Endkonzentration 2 μ M
0,5 μ l *Taq- DNA- Polymerase* (5 U/ μ l)
mit ddH₂O ad 100 μ l

Der Reaktionsansatz wird zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl überschichtet.

Dieser Standardreaktionsansatz wurde benutzt zur weiteren Verwendung des PCR- Produkts als Klonierungsfragment oder zur Sequenzierung. Dazu erfolgte die Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit zur Entfernung von Primerresten. Wird das PCR- Produkt nicht weiterverwendet zum Sequenzieren oder Klonieren, sondern dient zur Überprüfung z.B. von Transformanten oder DNA, dann genügt ein PCR- Ansatz von 25 μ l mit entsprechenden Endkonzentrationen.

2.12.6 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

SMART cDNA- Synthese Protokoll

(Switching Mechanism at 5'end of RNA Transcripts)

(Clontech)

Die SMART Methode bietet eine Möglichkeit, vollständige cDNA durch reverse Transkription, herzustellen.

Dies ergibt sich aus dem Zusammenwirken von MMLV RT (Reverser Transcriptase, Superscript II) und dem SMART Oligonucleotid.

Bei Erstellung der cDNA Abschrift von einem mRNA Strang zeigt MMLV RT eine „Terminale Transferase“ Aktivität, die an das 3'- Ende der cDNA einige weitere Nucleotide anknüpft. In den meisten Fällen handelt es sich um 3- 5 dCs. Diese Ergänzung wird durch das SMART Oligonucleotide genutzt, dessen endständige dGs an das dC- reiche cDNA Ende binden können und so als verlängertes Template für die Reverse Transkriptase (RT) dienen.

Nachdem die RT das Template von der original RNA zum SMART Oligonucleotid gewechselt hat, wird eine komplette cDNA zusätzlich mit der definierten SMART Sequenz am Ende gebildet.

Da die Ergänzung von dCs durch die RT am effektivsten am Ende des RNA Stranges stattfindet, wird das SMART Oligo typischerweise nur zu kompletten cDNAs hinzugefügt. Daraus ergibt sich eine hohe Ausbeute an vollständigen 5'-Sequenzen.

1. 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	Superscript II Polymerase

Die reverse Transkription wird bei 42°C für 60 Min durchgeführt. Zur Minimierung der Verdunstung wird das Reaktionsgemisch mit Mineralöl beschichtet und nach Ablauf der Reaktion mit Ampuwa- Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

2. 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 (Goldstar)
77	µl	Ampuwa- Wasser

Nach 1 min Denaturierung bei 94°C werden für die übrigen Denaturierungsschritte sowie für das *Annealing* bei 65°C 30 Sek. festgelegt. Die Polymerasereaktion erfolgt bei 72°C für 5 min und nach Ablauf des letzten Zyklus nochmals für 10 min. Es wird über eine Anzahl von 20- 30 Zyklen amplifiziert, und das Produkt zur weiteren Verwendung mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt.

2.12.7 RT- PCR

Nach der SMART- Methode hergestellte einzelsträngige cDNAs aus Zyste und Protoskolex werden mit den Primern CD3 und EM10- SL in 20 Zyklen amplifiziert, gereinigt und am Photometer auf eine Konzentration von 100 ng/ µl eingestellt. Serielle Verdünnungen (1:10; 1:100;..) dieser cDNAs werden benutzt, um RT- PCRs zu fahren. Dabei verwendet man die genspezifischen Primer der zu testenden Gene und fährt eine PCR bei 30 Zyklen. Im Agarose-Gel wird schließlich die Bandenintensität beurteilt. Als Kontrolle für die eingesetzte cDNA von *emto* wurde hier das Gen Transketolase verwendet, welches konstitutiv exprimiert wird (Brehm et al, Manuskript in Vorbereitung). Die spezifischen Primer für *emto* für die RT-PCR waren To-RT-5' und To-RT-3'.

2.12.8 “Easy Gene Walking” mittels “Nested PCR”

Eine leicht modifizierte Version der Methode nach Harrison et al (1996) wurde angewandt, um potentielle Promotorbereiche von *emto* stromaufwärts des Startcodons zu identifizieren.

Bei dieser PCR- basierten Methode werden spezifische, gegen eine bekannte cDNA- Sequenz gerichtete Primer gegen zufällig stromaufwärts bindende, in Richtung 3'- Ende lesende Primer eingesetzt. Die PCR- Produkte werden anschliessend isoliert und sequenziert.

1.Schritt:

Amplifizierung von chromosomaler DNA (isoliert aus dem Parasitenisolat H95):

25 µl Ansatz:

0,5 µl chrom. DNA (H95)

3 µl 10 x Puffer

1,8 µl MgCl₂

0,5 µl *Nested Primer a* (Tmoda)

0,5 µl *Random Primer* (T7NHSP oder T7NSAU oder T7NALUR)

0,5 µl NTPs (10mM)

0,5 µl Taq- Polymerase (Goldstar)

22,7 µl Ampuwa- Wasser

Nach 2 Min Denaturierung bei 94°C werden für die übrigen Denaturierungsschritte 40 sek, für das Annealing bei 53°C 2 Min festgelegt. Die Polymerasereaktion erfolgt bei 72°C für 2 Min und nach Ablauf des letzten Zyklus nochmals für 10 Min. Es wird über eine Anzahl von 35 Zyklen amplifiziert, und die Produkte zur weiteren Verwendung mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt.

2.Schritt:

Amplifikation der Produkte aus Schritt 1 mit einem wenige bp stromaufwärts vom *Nested Primer a* gelegenen *Nested Primer b* und dem *Primer TOPO- T7* als 5'- stromabwärts lesender Primer.

50 µl- Ansatz:

1 µl Eluat aus Schritt 1

5 µl 10 x Puffer

3 µl MgCl₂

0,5 µl NTPs (10mM)

0,5 µl Taq- Polymerase

0,5 µl *Nested Primer b* (Tmod b)

0,2 µl TOPOT7- Primer

39,3 µl Ampuwa- Wasser

Programm:

2 min	94°C		
2 min	50°C		
3 min	72°C		
40 sek	94°C	}	35x
1 min	56°C		
2 min	72°C		
20 min	72°C		

3. Schritt:

Beurteilung auf Agarosegel, Isolierung und Sequenzierung deutlicher Banden.

2.13 Differential Display Methode

Differential Display ist eine von Liang und Pardee (1991) beschriebene PCR-basierte Methode, mit deren Hilfe man eine unterschiedliche Expression von Genen aus verschiedenen Zellen sichtbar machen kann (Prashar & Weissmann, 1996). Dabei werden zwei oder mehr mRNAs in cDNA- Pools umgeschrieben und mit geeigneten Primern in einer PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte werden auf Poly- Acryl- Amidgelen aufgetrennt und die potentiell differentiell exprimierten Fragmente anschließend isoliert (s. Ergebnisse, 3.1).

2.13.1 cDNA- Bibliothekherstellung

Zur Konstruktion der cDNA- Bibliothek wurde das Verfahren nach Zhao et al (1998) angewendet. Die geeignete 3'- cDNA- Bibliothek wird dabei mit Hilfe von randomisierten Primern hergestellt. Der 3'- Anker- Primer HT14V bindet mit 14 dTs an den Poly- A- Schwanz der mRNAs. Außerdem enthält der Primer eine degenerierte Base V (V=A,C oder G) als Anker am 3'- Ende und eine HindIII- Schnittstelle in der Mitte. Das 5'- Ende besteht aus 9 zufällig gewählten, GC- reichen Basen. Der 5'-degenerierte Primer DNP 256 soll innerhalb von 100 - 800 bp am 3'- Ende der Erst- Strang- cDNA binden. Die vier 3'- Bp bestehen

aus degenerierten Basen NNNN (N=A,C,G oder T), wodurch eine 256mal höhere Bindungswahrscheinlichkeit resultiert.

1. Schritt: Reverse Transkription

Die RT-Reaktion findet in einem Gesamtvolumen von 20 µl statt. Dabei werden 100 pmol des degeneriertem Anker-Primer HT14V zu ca. 2 µg RNA aus den Isolaten T1, H95 oder K188 gegeben und für 10' bei 65°C, dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend 2 µl 5 mal *First- Strand-* Puffer, 1 µl 100 mM NTPs und 0,5 µl MMLV- Reverse Transkriptase zugeben, mit ddH₂O auffüllen. Den Reaktionsansatz für 5' bei RT, anschließend für 1h zur cDNA-Synthese bei 37°C inkubieren, Reaktionsstop durch Hitzeinaktivieren des Enzyms bei 95°C für 5'.

2. Schritt: 2. Strang- cDNA- Synthese

5 µl des obigen Reaktionsansatzes werden mit 10 µl 2 x Klenow-Reaktionspuffer, 1 µl 50 mM DNP256, 0,5 µl Klenow- Enzym und H₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Synthetisieren der Zweit- Strang- cDNA mit Klenow- Enzym (*large* Fragment der DNA- Polymerase I) und dem Primer DNP256 für 45 min bei 37°C, Enzyminaktivierung für 10 min bei 65°C.

3. Schritt: Amplifikation der Zweit- Strang- cDNA

Zum Herstellen der cDNA- Bibliothek wurde ein Fünftel des Zweit- Strang- Ansatzes mit den Primern HT14 und DP256 mit der Goldstar*Taq-* Polymerase in einem 20 µl- Ansatz amplifiziert. Programm: 94°C für 2 min, 94°C für 45 s, 55 °C für 2 min, 72°C für 4 min, 72°C für 15 min, für 25 Zyklen.

4.Schritt: Reinigen der 3'- Pools

Die 3'- Pools wurden im Quiagen- PCR- Kit nach Anleitung gereinigt und in 50 µl H₂O, pH 8 eluiert.

Eine auf diese Weise angefertigte cDNA- Bibliothek enthält 3'- Enden fast aller Gene und erhält die Original- Häufigkeit verschiedener mRNAs (Zhao et al, 1998). Sie ist somit ein guter Ausgangspool für Differential Display.

2.13.2 Differential Display- PCR

In einem 25 µl PCR- Ansatz mit der Taq- Polymerase und mit Primern, welche die Sequenzen T14 bzw. R24 am 5'- Ende und am 3'- Ende alle 12 bzw. 16 möglichen Dinukleotid- Kombinationen aufweisen (z.B.: T14GC, T14GG,...; R24GC, R24GG,...), können schließlich definierte Subpopulationen der 3'- Representations, welche ein für jede Kombination charakteristisches Bandenmuster ergeben, gewonnen werden.

Die PCR wird mit dem Programm: 94°C für 2 min, 94°C für 40 s, 55°C für 40°C, 72°C für 2 min, 72°C für 15 min in 30 Zyklen durchgeführt.

2.13.3 Polyacrylamidgele für Nukleinsäuren

Stammlösung: 40 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid

Gel-Rezept: 8 g Harnstoff, 8,5 ml H₂O, 2 ml 10 x TBE, 3 ml Stammlösung, 140 µl APS16 %, 20 µl TEMED

Auftragspuffer: 10 ml Formamid, 200 µl 0,5 M EDTA, pH 8, Xylen Cyanol, Bromphenolblau

10 x TBE: Tris, Borsäure, Na- EDTA

Es wird mit Handschuhen gearbeitet!

Zur Auftrennung der DNA- Fragmente aus dem Differential Display werden 6 % PAA- Gele in vertikalen Elektrophorese- Kammern benutzt. Im Gegensatz zu den herkömmlich benutzten Autoradiogrammen ist diese Methode weniger zeitintensiv, kommt ohne Radioaktivität aus und bietet eine einfache Möglichkeit, die DNA- Fragmente zu charakterisieren (Lohmann et al, 1995).

Vor Gießen des Gels werden die Glasscheiben mit 70 % Ethanol gereinigt. Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten mit 1 mm Abstand gegossen. 7,5 µl Proben werden mit 3,5 µl Auftragspuffer gemischt und 10 µl davon aufgetragen, als

Molekulargewichtsmarker wird der 1 kb- Marker verwendet. Die Elektrophorese findet bei 260 V für 1- 1,5h in 1 x TBE- Puffer statt.

2.13.4 Silberfärbung der PAA- Gele

(Bassam et al, 1991)

Silbernitratlösung: 250 ml Ampuwa, 300 µl Formaldehyd, Spatelspitze
AgNO₃

Entwicklungslösung: 300 ml Ampuwa, 300 µl Formaldehyd, 6 g NaCO₃, 5
µl Thiosulfat

Es wird mit Handschuhen gearbeitet!

Bei der Silberfärbung können mit hoher Sensitivität DNA- Fragmente sichtbar gemacht werden. Die Silberionen werden unter alkalischen Bedingungen mit Formaldehyd zu metallischem Silber reduziert.

Das Polyacrylamidgel wird vorsichtig aus den Glasscheiben genommen und in 10 % Essigsäure 20 min fixiert. Anschließend wird das Gel 3 x für je 2 min mit Ampuwa gewaschen und dann für 30 min mit der Silbernitratlösung inkubiert. Nach nochmaligem 2 minütigem Spülen mit H₂O wird die Entwicklungslösung unter leichtem Schütteln für einige Minuten zugegeben. Wenn die DNA- Banden gut zu sehen sind, wird die Reaktion mit 10 % Essigsäure für 15 min gestoppt, dann wird das Gel mindestens 30 min gewässert und auf eine Glasplatte aufgezogen.

2.13.5 Isolierung und Charakterisierung der differentiell exprimierten DNA- Fragmente

Die gut getrennten Signale auf den Silbergele ermöglichen eine Differenzierung von gleich und unterschiedlich exprimierten Genen. Nach Ausschneiden mit einem sterilen Skalpell wird das DNA- Fragment im Gel in ein steriles PCR- Cap überführt und wieder amplifiziert mit den DD- PCR- Primern. Die PCR wird mit 100 µl angesetzt wobei die Gel- Bande 2 µl zählt und erfolgt

mit 35 Zyklen. Nach Auftragen auf ein 1,5 % Agarosegel wird die PCR über den Qiagen PCR- Purification- Kit gereinigt, sequenziert und auf Homologien im Sequenzvergleich untersucht.

2.14 Techniken zum Arbeiten mit Proteinen

2.14.1 Polyacrylamid- SDS- Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

SDS ist stark anionisches Detergens. Denaturierte Proteine binden an SDS im Verhältnis 1 g : 1,4 g und bekommen eine negative Ladung. Auf diese Weise werden die Proteine analog ihrer molekularen Massen in der Elektrophorese aufgetrennt.

Lösungen :

- "Lower"- Tris- Lösung: 0,4 M Tris- HCl, pH 8,6, 0,1 % SDS
"Upper"- Tris- Lösung: 0,1 M Tris- HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS
Stammlösung: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
3 x Probenpuffer:
GSD (reduzierend): 0,62 g DDT, 4 ml 100 % Glycerin, 4 ml 20% SDS, mit H₂O auf 12 ml auffüllen, wenig Bromphenolblau von NEB (nicht reduzierend)
Molekular-Gew.marker: Benchmark
10 x Elektrophoresepuffer: 0,25 M Tris, 2 M Glycin, 1 % SDS

Die Gelplatten werden vor dem Zusammenbau mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Vertikalapparatur wird zu dreiviertel mit einem 8 % ,10 % oder 12,5 %igen (je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine) Trenngel aus "Lower"- Tris- Lösung und Stammlösung gefüllt. Nach der Polymerisation für 30 min wird das Sammelgel aus "Upper"- Tris- Lösung mit 4,3 % Polyacrylamid überschichtet und die Probenkämme eingesetzt und für 30 min polymerisiert. Der Marker und die Proben werden in Probenpuffer aufgenommen, für 10 min in kochendem Wasser denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in 1 x Elektrophoresepuffer bei 40- 50 mA bis zum

Auslaufen der Bromphenolblaubande. Werden Marker mit farbig markierten Banden verwendet, kann man den Gellauf anhand der Laufweite dieser Markerbanden bestimmen.

2.14.2 Western- Blot

(Towbin et al., 1979)

Towbin Puffer: 25 mM Tris- HCL, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

Ponceau-S-Lösung: 0,4 % Ponceau S, 0,6 % TCA

Blockierungs-Puffer: 5 % Magermilch in PBS mit 0,1% Tween[®]20

Puffer 1: 3 % Magermilch in PBS, 0,1 % Tween[®]20

Puffer 2: PBS, 0,1 % Tween[®]20

Beim Western Blot werden die im Protein- Gel aufgetrennten Proteine durch einen Elektrotransfer auf Nitrocellulose übertragen. Proteine können anschliessend durch spezifische Antikörper identifiziert werden.

Auf die kathodische Platte einer Western- Blot- Apparatur wird in folgender Reihenfolge das Proteingel in mit Towbin- Puffer getränkten Filterpapieren (Whatman), bzw. Nitrocellulose luftblasenfrei eingebettet: Fünf Lagen dünnes Filterpapier, das Proteingel, die Nitrocellulosefilter und abschließend fünf Lagen dünnes Filterpapier. Die Apparatur wird mit der Anodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgt bei 1- 2 mA/cm² Nitrocellulose für eine Stunde. Die Nitrocellulose wird anschließend für 2 min in einer 2 %igen Ponceau- S- Lösung angefärbt und mit fließendem H₂O entfärbt. Die Laufspuren der Proteinproben werden markiert. Freie Bindungsstellen des Nitrocellulosefilters werden mit dem Blockierungspuffer bei RT für eine Stunde oder alternativ über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Hierbei, wie bei allen folgenden Schritten, wird die Nitrocellulose auf einem Kippschüttler leicht bewegt. Es folgt die Inkubation des primären Antikörpers in Puffer 1 bei 4°C über Nacht bzw. für eine Stunde bei RT. Die Nitrocellulose wird dreimal kurz mit Puffer 1 gespült, dann folgen drei Waschschrte für je 10 min mit Puffer 2. Der Nitrocellulose- Filter wird anschließend mit Meerrettich- Peroxidase markiertem Antikörper in Puffer 2 bei

RT für eine Stunde inkubiert. Anschließend werden die Filter dreimal kurz mit Puffer 2 gespült und dreimal für 10 min mit dem Puffer gewaschen. Das Meerrettich-Peroxidase Signal wird mit dem Chemiluminescence System von Amershan oder Boehringer auf einem Reflektionsfilm sichtbar gemacht.

2.15 Techniken zum Arbeiten mit Hefen

2.15.1 Kultur von Hefen

Es werden für den Yeast- Two- Hybrid- Versuch genetisch manipulierte *Saccharomyces cerevisiae*- Stämme verwendet. Die Anzucht erfolgt bei 30°C. Flüssigkulturen werden dabei bei 250 rpm geschüttelt.

Gefrierstöcke:

Es werden Gefrierstöcke mit 25 % Glycerolkonzentration hergestellt und bei minus 80°C eingefroren.

2.15.2 Hefe- Two- Hybrid- Versuch

(Finley und Brent, 1996)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Interaktionen bekannter Proteine untersucht. Dafür wurden zwei verschiedene Two- Hybrid- Systeme verwendet. Die erste Two- Hybrid- Untersuchung wurde mit dem von Gyuris et al (1993) beschriebenen System durchgeführt, welches im folgenden als LexA- System bezeichnet wird. Da die Ergebnisse, die in diesem Two- Hybrid- System erhalten wurden, nicht repräsentativ waren, wurde das Clontech Two- Hybrid- System 3 verwendet, welches auf GAL4- Transkriptionsfaktoren basiert, weiterhin als GAL4- System bezeichnet.

2.15.3 LexA- basiertes Two Hybrid System

(Gyuris et al, 1993; Finley & Brent, 1997 ; Finley & Brent, 1996)

Die drei Grundkomponenten setzen sich in diesem System zusammen aus:

- A) Hefevektor pNLexA, der ein bekanntes, mit dem Carboxy- Terminus an die LexA- BD fusioniertes, Protein exprimiert. Der Vektor enthält einen HIS3- Marker zur Hefeselektion. Er besitzt zwar kein Kernlokalisationsignal, es gelangen aber dennoch die meisten LexA- Fusionen in den Kern (Brent und Ptashne, 1984)
- B) Hefevektor pJG4- 5, der ein weiteres bekanntes Protein exprimiert, welches mit dem Amino- Terminus an ein SV40 T large Kernlokalisationsignal, eine B42- AD und ein HA- Epitop- Marker gebunden ist. Außerdem enthält dieser Vektor einen TRP1- Marker zur Hefeselektion.
- C) Hefestamm EGY48 mit zwei Reportergenen. Die stromaufwärts gelegenen Regulations- Stellen (im weiteren UAS genannt) des LEU2- Gens wurden durch drei LexA- Operatoren ersetzt (LexAop- LEU). Das LEU2- Gen ist chromosomal integriert, die Transkription zeigt Wachstum auf Leucin- Mangel- Agar. Das zweite Reportergen, das lacZ- Gen, ist weniger sensitiv als das LEU2- Gen. Es zeigt eine Interaktion mit Blaufärbung der Hefen auf X- Gal- haltigem Agar und gleichzeitig bietet es die Möglichkeit der Quantifizierung der Interaktion. Je dunkler das Blau, desto stärker die Interaktion. Dieses Gen ist auf dem Plasmid PSH18-34 mit dem URA3- Marker lokalisiert, die UAS besteht aus vier LexA- Operatoren.
- D) Das vollständige EmTO, EmTY und Elp sowie der C- und N- Terminus von Elp wurden über eine 5'- EcoRI- und eine 3'- XhoI- Schnittstelle jeweils in den pNLexA- Vektor kloniert. Diese Fusionsproteine werden sowohl in Glukose (Glu)- als auch in Galaktose/Raffinose (GAL/RAF)- haltigen Medien exprimiert. Der Vektor exprimiert die Proteine konstitutiv und enthält einen HIS3- Marker. Er bindet an die LexA- Operatoren

stromaufwärts der Reportergene *LEU2* und *lacZ*, kann aber die Transkription per se nicht aktivieren.

In den pJG4-5- Vektor mit einem TRP1- Marker wurden, ebenfalls über eine 5'-EcoRI- und eine 3'- XhoI- Schnittstelle, das vollständige EmTO und EmTY kloniert. Die Proteine sind N- terminal an die AD gebunden. Die Expression erfolgt konditional unter dem GAL1- Promotor. Dieser Promotor wird im Glucose- und Raffinose- Medium unterdrückt und im Galactose- Medium induziert. Damit kann verhindert werden, daß Proteine, die für Hefen toxisch sind, schon bei der Transformation in Hefen verloren gehen. Glucose inhibiert die Transkription unter dem GAL1- Promotor auch in Anwesenheit von Galaktose, diese Eigenschaft hat Raffinose nicht. Da das Wachstum der Hefen in Raffinose schneller ist als in Galaktose, verwendet man meist Raffinose und Galaktose zusammen, wenn man die Expression der AD- Fusionsproteine anstrebt.

Die drei Plasmide pNLexA, pJG4-5 und pSH18-34 und die Kontrollplasmide enthalten einen 2 μ Replikationsursprung, so daß sie in 20- 100 Kopien pro Zelle unter Selektion enthalten sind. Alle Vektoren inklusive der Kontrollplasmide enthalten ein *E. coli* "origin of replication" (pBR ori), eine Ampicillin- Resistenz und einen auxotrophen Marker zur Selektion in Hefen. Um die Selektion der transformierten Plasmide auf die auxotrophen Marker zu ermöglichen, ist der Hefestamm EGY48 *trp1*, *his3*, *ura1* negativ. Das bedeutet, die Synthese der essentiellen Aminosäuren Tryptophan (Trp), Histidin (His) und Uracil (Ura) kann nicht ohne die entsprechenden plasmidkodierten auxotrophen Marker stattfinden.

Zwei der drei Kontrollplasmide sind pSH17-4 und pRFHM-1, Derivate des pEG202 Vektors, aus dem auch der pNLexA- Vektor entwickelt wurde. Sie werden als Positiv/ Negativkontrollen bei den Versuchen eingesetzt, die zeigen sollen, daß die LexA- BD- Proteine transkriptional inert sind und in den Nukleus gelangen. Das pSH17-4- Plasmid exprimiert ein LexA- GAL4- Fusionsprotein. Dieses Protein kann an die LexA- Operatoren stromaufwärts der Reportergene binden und die Transkription des *LEU2* bzw. des *lacZ* Reporters aktivieren und dient somit als Positivkontrolle. Die Negativkontrolle, das pRFHM-1- Plasmid,

exprimiert die LexA- BD fusioniert an ein transkriptional inertes Fragment aus der Sequenz des Drosophila Bicoid Produktes. Es findet also eine Bindung an die LexA Operatoren statt, aber keine Aktivierung der Transkription der Reportergene.

Das pJK101 Plasmid, das dritte Kontrollplasmid in dem Two- Hybrid- System, ist ein *lacZ* Reporter Derivat. Es ist das Kontrollplasmid bei dem "Repressions-Assay", der zeigen soll, daß die BD- Fusionsproteine in den Kern transportiert werden. Der Versuch basiert auf der Beobachtung, daß die Transkription von Hefe Reporter Genen durch LexA- Fusionen unterdrückt werden können, wenn zwischen der TATA- Sequenz und der UAS Sequenz LexA Operatoren inseriert sind (Brent & Ptashne, 1984). Das *GAL1- lacZ* Konstrukt in pJK101 besitzt den Großteil der *GAL1- UAS* und zusätzlich einen LexA Operator zwischen UAS_G und der TATA- Sequenz. Binden transkriptional inerte LexA-Fusionen, wie die von pRFHM-1 an den Operator, ist die Transkription des *lacZ*- Genes unterdrückt und die Hefen bleiben weiß. Gelangen die LexA- BD- Fusionsproteine in den Kern müssen sie also ebenso wie das transkriptional inerte Fusionsprotein von pRFHM- 1 die Transkription des *lacZ* von pJK101 unterdrücken. So kann dieses *lacZ*- Reporter gen von pJK101 ausgenutzt werden, um zu zeigen, daß die LexA- BD Fusionsproteine in den Kern gelangen und an LexA- Operatoren binden.

Material

Hefestamm (Estojak et al, 1995):

EGY48: $MAT\alpha$, *ura3*, *his3*, *trp1*, $LexA_{op(x6)}$ - *LEU2*

Uracil-, Histidin-, Tryptophan-, Leucin- negatives (Ura^- , His^- , Trp^- , Leu^-)
Aminosäurengemisch für Minimalmedien:

Gemisch aus den für Hefen essentiellen Aminosäuren mit Ausnahme derer, die zur Selektion der Plasmide gebraucht werden bzw. mit Ausnahme von Leucin, zur Selektion auf den *LEU2*- Reporter.

L- Arginine (HCl); L- Asparaginsäure, L- Glutaminsäure, L- Isoleucin, L- Lysine, L- Methionine, L- Phenylalanine, L- Serine; L- Threonine, L- Tyrosine, L- Valine. Von jeder Aminosäure werden 2 g eingewogen und miteinander gründlich in einem Plastikgefäß gemischt.

Flüssige Aminosäure- Lösungen:

1 % Histidine

1 % Uracil

1 % Tryptophan

20 % Leucin

Die Aminosäuren werden in H₂O gelöst, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Tryptophan geht nicht vollständig in Lösung.

Zuckerlösungen:

20 % Glucose (Difco)

20 % Galactose (Difco)

20 % Raffinose (Difco)

Die Festsubstanz wird in H₂O unter Erwärmen gelöst, steril filtriert und bei RT aufbewahrt.

BU Salz(1 l): 70 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 30 g NaH₂PO₄, pH 7,0, nach dem Autoklavieren bei RT lagern

X- Gal: 20 mg/ml in Dimethylformamide (frisch ansetzen)

Minimal-Medium-

Agar- Platten (1l): 6,7 g YNB, 2 g Aminosäuregemisch, 1 NaOH-Plätzchen, 20 g Agar, 850 ml H₂O

Das Medium wird autoklaviert und die entsprechende Zuckerlösung dazugegeben. Die Endkonzentration von Galactose und Glucose beträgt 2 %, die von Raffinose 1 %. Aminosäuren, die in dem entsprechenden Versuch nicht zur Selektion verwendet werden, werden hinzugegeben. Die Endkonzentration

von Histidin, Uracil und Tryptophan ist jeweils 0,002 %. die von Leucin 0,02 %. Die Aminosäuren können in entsprechender Verdünnung gegebenenfalls in das feste Medium einplattiert werden, dabei geht man davon aus, daß eine Agarplatte ca. 10 ml Medium enthält.

Flüssiges Minimal- Medium:

Enthält dieselbe Zusammensetzung wie die Agarplatten ohne Agar und das NaOH- Plätzchen.

YPD- Platten (1l): 10 g Yeast Extrakt, 20 g Peptone, 1 NaOH Plätzchen, 20 g Agar, 900 ml H₂O, nach dem Autoklavieren 100 ml 20 % Glucose dazugeben.

Flüssiges YPD- Medium:

Das Flüssigmedium wird wie die YPD Platten ohne Agar und NaOH Plätzchen hergestellt.

X-Gal Platten (1l): 6,7 g YNB, 1,5 g Aminosäuregemisch, 35 g Agar, 800 ml H₂O

Nach dem Autoklavieren wird die entsprechende Zuckerlösung dazugegeben und das Medium mit den entsprechenden Aminosäuren supplementiert.

Die Lösung muß bis 60°C abkühlen bevor 100 ml BU Salz und 4 ml der 20 mg/ml X- Gal Lösung dazugegeben werden. X- Gal Platten werden im Dunkeln aufbewahrt.

Two-Hybrid Protokolle für das Lex A- basierte System

1) Konstruktion von Plasmidvektoren für Yeast- Two- Hybrid- Versuche

Das Leseraster von *emto* wurde mit Stopcodon, aber ohne Startcodon unter Verwendung der Primer E1-tromo-5' und X1-tromo-3' per PCR amplifiziert. Das PCR- Produkt enthielt eine durch die Primer angefügte 5'- EcoRI- und eine 3'-

XhoI- Schnittstelle. Nach Restriktionsverdau erfolgt die Klonierung in den Vektor pJG4-5. Ebenso wurde mit dem Leseraster von *emty* (K. Hubert, 2001) verfahren.

Zur Klonierung des Leserasters von *emto* in den Vektor pNLexA wurden die Primer E1-troV2 und X1-troV2 verwendet, welche das Start, jedoch nicht das Stopcodon miteinbeziehen. Auch dieses PCR- Produkt enthielt eine 5'- EcoRI- und eine 3'-XhoI- Schnittstelle.

Die Klonierung von Elp und dessen N- und C- Terminus in den Vektor pNLexA wurde von K. Hubert (2001) beschrieben.

2) Herstellung der Hefe- Selektionsstämme

Der Hefe-Selektionsstamm EGY48 enthält das chromosomal intergrierte Reporterogen LEU2 sowie das pSH18-34- Plasmid mit dem *lacZ*- Reporterogen. In diesen Hefestamm werden anschließend die gewünschten Kotransformationen der Fusionsproteine in den beiden Vektoren pNLexA und pJG4-5 transformiert.

YPD Platten, flüssiges YPD Medium; Minimal Medium Platten (Glu/ Ura⁻; Glu/ Ura⁻/ His⁻); flüssiges Minimalmedium (Glu/ Ura⁻; Glu/ Ura⁻/ His⁻)

EGY48 wird aus dem -70°C- Gefrierstock auf den YPD Platten ausgestrichen und bei 30°C über 3- 4 Tage inkubiert. Von einer Kolonie wird eine 5 ml YPD Flüssigkultur über Nacht bei 30°C inkubiert. Es erfolgt die Transformation von pSH18-34 in EGY48. Wenn nur ein oder zwei Plasmide, wie in dieser Arbeit der Fall, in einen Hefestamm transformiert werden sollten, kann das Transformationsprotokoll mit geringer Transformationseffizienz durchgeführt werden (s.u.). Die Transformanden werden auf Glu/ Ura⁻ Platten selektioniert. Drei der selektionierten Transformanden werden in vereinigt und über Nacht bei 30°C inkubiert.

Herstellung der Kotransformationen

Es folgt die Transformation der verschiedenen pNLexA- Konstrukte mit EmTO, EmTY, Elp, Elp- N (N- terminaler Bereich von Elp) und Elp- C (C- Terminaler Bereich von Elp) in EGY48 mit pSH18-34. Die Transformanden werden auf Glu/ Ura⁻/ His⁻- Platten selektioniert. Es werden jeweils zwei Kolonien auf Glu/ Ura⁻ / - Platten vereinzelt und auch als Glycerol-Stöcke bei -80°C eingefroren.

Nach Vereinigung von drei Kolonien der in 5 ml Glu/ Ura⁻/ His⁻ - Flüssigmedium folgt wiederum eine Inkubation über Nacht bei 30°C. Nach Transformation der entsprechenden AD- Fusionsproteine erfolgt die Ausplattierung dieser Kotransformanden auf Glu/ Ura⁻/ His⁻/ Leu⁻ - Platten. Die Bewertung des Wachstums erfolgt zwei, drei, vier und fünf Tage nach Ausplattierung.

Transformationen mit geringer Transformationseffizienz

Stocklösungen: 0,5 M EDTA, pH 8
 1 M Lithiumacetat (LiOAc), autoklaviert
 100 mM Tris- HCl, pH 7,5, autoklaviert
 50 % Polyethylenglykol 4000 in Wasser, steril filtriert

Gebrauchslösungen:

LiOAc/ TE (0,1 M) : 10 mM Tris- HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8, 100 mM
 Lithium Acetat

LiOAc/ TE/ PEG: 40 % PEG 4000 in LiOAc/ TE- Lösung

5 ml gesättigte Übernacht- Kultur der jeweiligen Hefeselektionsstämme wird für 5 min bei 1200 rpm und RT im 1,5 ml RG pelletiert. Die Hefe- Zellen werden in 500 µl LiOAc/ TE resuspendiert und mit 50 µg Lachs- Spermien- DNA (10 µg/µl), die vorher für 5 min aufgeköcht worden ist, versetzt. Pro Transformation werden 100 µl dieser Lösung mit 1 µg Plasmid- DNA der jeweiligen Fusionsproteine im Vektor pJG4-5 verwendet. DNA, Zellen und 700 µl PEG in LiOAc/ TE werden gevortext und für 1 h bis 3 h bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 15 min bei 42°C werden die Zellen pelletiert für 1-2 min bei

2000 rpm und anschließend mit Wasser oder Selektionsmedium mehrmals gewaschen, dann in 100- 200 µl Selektionsmedium sehr gut mit einer 100 µl-Pipettenspitze resuspendiert und 25 % bis 50 % davon auf Selektions- Agar GAL/ RAF/ ura⁻/ his⁻/ trp⁻ ausplattiert. Nach ca. zwei bis drei Tagen Wachstum bei 30°C kann man mit den Transformanden weiterarbeiten.

3) Transkriptions- Aktivierungs- Assay

Transformanden, die auf Leucin- negativen Platten wachsen und/ oder eine Blaufärbung auf X- Gal- Platten zeigen, werden als positives Ergebnis eines Two- Hybrid- Versuchs bewertet. Deshalb muß vorher getestet werden, ob nicht das Fusionsprotein an die BD selbst schon die Transkription der Reportergene aktivieren kann. Dazu wird der Transkriptions- Aktivierungs- Assay durchgeführt. Als Kontrollen werden drei dem pNLexA- Vektor verwandte Plasmide mit HIS3- Marker verwendet. Das erste ist das Plasmid pRFHM1 mit einem Protein, welches an die LexA- BD fusioniert ist, aber nicht die Transkription aktiviert. Hefen mit pRFHM1 können nicht auf Medium ohne Leucin wachsen. Das zweite Plasmid, pSH17-4, besitzt die LexA- BD, die an eine AD fusioniert ist und somit auf jeden Fall die Transkription aktiviert. Hefen mit diesem Plasmid wachsen auf Medium ohne Leucin. Das dritte ist das Eltern- Plasmid pEG202, welches ein schwaches Transkriptionsaktivator-Protein exprimiert. EGY48- Hefen mit diesem Plasmid wachsen langsam auf leu⁻-Medium. Ein Protein, das als BD- Fusionsprotein gut geeignet ist, sollte auf leu⁻-Medium langsamer als EGY48- pEG202 wachsen.

Methode:

Die Kontroll- Plasmide und die pNLexA- Plasmide mit den jeweiligen Fusionsproteinen werden in EGY48 mit pSH17-34 transformiert. Von jeder Transformation werden vier Kolonien mit Holzstäbchen gepickt, jeweils in 5 ml Glu/ ura⁻/ his⁻ - Flüssigkulturen eingerieben und über Nacht bei 30°C auf eine OD₆₀₀= 0,5 inkubiert. Dies ist die mid- log- Phase der Hefezellen und entspricht ca. 10⁷ Zellen pro ml. Jede Kultur wird nun 10² und 10³- fach in sterilem Wasser

verdünnt und jeweils 10 µl der Kultur und der Verdünnungen werden auf Selektionsplatten GAL/ RAF/ ura⁻ / his⁻ und GAL/ RAF/ ura⁻/ his⁻/ leu⁻ getropft und bei 30°C inkubiert. Die Kontrollplasmide werden gemeinsam mit dem zu testenden Köderplasmid auf die gleiche Platte getropft um einen direkten Vergleich zu erhalten. Das Wachstum wird über mehrere Tage beobachtet. Alle Hefen sollten auf den GAL/ RAF/ ura⁻ / his⁻- Platten ähnlich gut wachsen. Wenn das pNLexA- Fusionsprotein im Vergleich zu den Kontrollplasmiden schlechter wächst, so könnte dies ein Hinweis auf die Toxizität dieses Proteins für die Hefen sein. Auf den GAL/ RAF/ ura⁻/ his⁻/ leu⁻- Platten darf die Negativkontrolle EGY48- pRFHM1 sowie das pNLexA- Fusionsprotein nicht wachsen. Die Positivkontrolle EGY48- pSH17-4 zeigt Wachstum nach maximal zwei Tagen. Zur Überprüfung der lacZ- Expression werden alle Transformanten auch auf X- Gal- haltigen Glu/ ura⁻/ his⁻-Platten ausgestrichen. Hefen mit dem Plasmid pSH17-4 werden über Nacht blau, alle anderen sollten mindestens 5 Tage weiß bleiben. Schaltet ein Köderprotein zwar den LEU2- Reporter, aber nicht den lacZ- Reporter an, so kann trotzdem ein Interaktionsversuch durchgeführt werden. Der LEU2- Reporter ist sensitiver als der lacZ- Reporter, man kann dann die Interaktion nur anhand der Blaufärbung und nicht durch die leu⁻ - Selektion detektieren.

4) Repressionsassay

Mit dem Repressionsassay soll überprüft werden, ob die LexA- BD- Fusionsproteine in den Kern gelangen und an LexA- Operatoren binden. Transkriptionell inerte LexA- Fusionen, wie die von pRFHM1, die an den Operator in pJK101 binden, unterdrücken die lacZ- Expression, die Hefen bleiben also auf X- Gal- haltigen Medien weiß. Auch die zu testenden pNLexA- Fusionsproteine sollten so reagieren.

Methode:

Der Hefestamm EGY48 wird mit pJK101 transformiert und auf Glu/ ura⁻ - Platten selektioniert. Drei Kolonien dieser Platten werden zusammengeführt und mit dem HIS3- Köder- Plasmid oder den Kontrollplasmiden pSH17-4 und

pRFHM-1 transformiert. Auf Glu/ ura⁻/ his⁻- Platten und X- Gal- haltigen GAL/ RAF/ ura⁻/ his⁻- Platten werden je zwei Kolonien ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Die Platten werden über mehrere Tage beobachtet. Die Positivkontrolle mit dem pSH17-4- Plasmid wird blau, da sie den TF aus der LexA- BD- GAL4- AD- Fusion enthält. Die pRFHM1- Kontrolle unterdrückt die lacZ- Expression für mindestens fünf Tage, d.h. diese Hefen bleiben weiß. Auch die LexA- Köderproteine sollten sich so verhalten oder zumindest langsamer blau werden als die Positiv- Kontrolle.

5) Kontrolle der Expression der Fusionsproteine im Western- Blot

Vor der Durchführung eines Two- Hybrid- Versuches ist es sinnvoll zu zeigen, daß die vollständigen Fusionsproteine in den Selektionsstämmen exprimiert werden. Es wurden dazu Proteinpräparationen der Selektionsstämme EGY48- pNLexA- EmTO, EGY48-pNLexA- EmTY, EGY48-pNLexA- Elp, EGY48- pNLexA- Elp- N und EGY48- pNLexA- Elp- C sowie Proteinpräparationen der Selektionsstämme EGY48- pJG4-5 mit allen 5 schon in pNLexA klonierten Fusionsproteinen hergestellt.

Proteinpräparationen:

Flüssiges Minimalmedium (Raf/ Ura⁻/ His⁻ und Raf/ Ura⁻/ His⁻/ Trp⁻), 20 % Galactose

Glaskügelchen (0,45 mm), PBS mit Proteinaseinhibitoren, 3 x GSD oder anderer reduzierender Proteinprobenpuffer

9 ml Minimalmedium werden mit einigen Hefe-Kolonien angeimpft und bis zur mid- log Wachstumsphase bei 30°C inkubiert. Das entspricht einer OD₆₀₀ von 0,5 und 1-2 x 10⁷ Zellen/ ml Kultur. Die Anzucht der Hefestämme mit dem pJG4-5- cDNA Plasmiden erfolgt in Raffinose. Raffinose unterdrückt den GAL4 Promotor, durch Zugabe von Galactose (2 % V/ V) wird die Expression für 3 bis 4 Stunden induziert werden. Bei Anzucht in Glukose- haltigen Medien, würde die Glukose - im Gegensatz zu der Raffinose- auch nach der Zugabe von Galaktose den GAL4- Promotor unterdrücken. Allerdings wachsen Hefen in

Raffinose/Galactose- Medien sehr langsam. So kann es bis zu 24 h dauern bis die mid- log Phase erreicht ist.

Die Hefezellen werden für 10 min bei 3000 x g und RT zentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml RG überführt. Die Zellen werden 10 s abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Es wird ungefähr das Volumen an Glaskugeln hinzugefügt, welches dem Volumen des Zellpellet entspricht. Die Zellen sind von nun an immer auf Eis zu halten. 150 µl PBS mit Proteinase-Inhibitoren werden mit dem Zellpellet und den Glaskugeln vermischt. Die Zellwand der Hefen wird durch 4 x 30 s Vortexen auf höchster Stufe aufgebrochen. Zwischen den Schritten werden die Hefezellen für jeweils 30 s auf Eis gekühlt. Es werden 100 µl PBS mit Proteinaseinhibitoren und 125 µl 3 x GSD hinzugefügt, kurz durch Vortexen gemischt und für 10 min gekocht. Die Glaskugeln und Zellreste werden abzentrifugiert (1 min bei 14 000 x g und RT) und der klare Überstand in Aliquots sofort auf Trockeneis eingefroren. Die Proteinpräparationen werden bei -80°C gelagert.

2.15.4 Gal4-basiertes Two Hybrid System

(Clontech Yeast Protocols Handbook; MATCHMAKER GAL4 Two- Hybrid System 3 & Libraries User Manual)

Die drei Komponenten dieses Systems sind:

- 1) Hefevektor pGADT7, der die AD enthält sowie zusätzlich einen HA-Tag zur Detektion der Fusionsproteine, außerdem TRP1 zur Hefeselektion und eine Kanamycin- Resistenz zur Bakterienselektion
- 2) Hefevektor pGBKT7, der die BD enthält sowie zusätzlich einen cMYC-Tag zur Detektion der Fusionsproteine, außerdem LEU2 zur Hefeselektion und eine Ampicillin-Resistenz zur Bakterienselektion
- 3) Hefestamm AH109, der drei Reportergene aufweist - ADE2, HIS3, lacZ bzw. MEL1, die unter der Kontrolle von drei unterschiedlichen GAL4 UAS und deren entsprechenden TATA-Box stehen (s. Tab. 1).

Reportergen	Ursprung der UAS	UAS reguliert durch	Ursprung der TATA- Sequenz
HIS3	GAL1	GAL4	GAL1
ADE2	GAL2	GAL4	GAL2
LacZ	MEL1	GAL4	MEL1

Tab. 4: **Reportergene des Hefeselektionsstamms AH109** mit Ursprung der UAS, Regulation derselben und Ursprung der TATA- Sequenz.

Der Vorteil der Vektoren dieses Two- Hybrid- Systems gegenüber dem oben beschriebenen besteht darin, daß sie zusätzlich Sequenzen für HA bzw. Myc-Epitope besitzen, so daß die zu untersuchenden Proteine aminoterminal mit der GAL4- AD und einer HA-Markierung bzw. mit der GAL4- BD und einem Myc-Markierung fusioniert werden. So können die in Hefen exprimierte Proteine über anti- Myc- bzw. anti- HA- Antikörper detektiert werden, ohne daß spezifische Antikörper gegen die Proteine selbst hergestellt werden müssen.

Der Hefestamm AH109 besitzt drei Reportergene (*HIS3*, *ADE2*, *lacZ* bzw. *MEL1*), die unter der Kontrolle von drei unterschiedlichen GAL4- regulierten UAS (GAL1- , GAL2- , MEL1- UAS) und der entsprechenden TATA- Box stehen. Dadurch können zwei Klassen falsch positiver Klone ausgeschlossen werden: diejenigen, die direkt mit den Sequenzen um die GAL4- Bindungsstelle interagieren und diejenigen, die mit Transkriptionsfaktoren interagieren, die an spezifische TATA- Sequenzen gebunden sind. Außerdem kann die Selektion auf Protein- Protein- Interaktion in unterschiedlicher Stringenz auf speziellen Hefeselektionsplatten erfolgen. Auf Platten, denen Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan fehlt und die X α - GAL enthalten (SD/ ADE⁻/ HIS⁻/ LEU⁻/ TRP⁻/ X α - GAL), können starke Proteininteraktionen nachgewiesen werden. Falsch positive Interaktionen kommen sehr selten vor, jedoch können Interaktionen niedriger Affinität übersehen werden. Eine mittlere Stringenz kann auf Platten belegt werden, denen Histidin, Leucin und Tryptophan fehlt. Für Interaktionen, die sehr schwach oder nur vorübergehend stattfinden, kann eine Selektion versucht werden auf Platten, denen lediglich Tryptophan und Leucin fehlt. In dieser Arbeit wurde nur mit SD/ ADE⁻/ HIS⁻/ LEU⁻/ TRP⁻/ X α -GAL- Platten gearbeitet, also Platten, auf denen eine starke Stringenz nachgewiesen wird.

Für diesen Versuch wurden alle zu untersuchenden Proteine, also EmTO, EmTY, Elp, Elp- N sowie Elp- C, sowohl in den pGADT7- als auch in den pGBKT7- Vektor kloniert. Dies wurde über eine 5'- NdeI- und eine 3'- BamHI- Schnittstelle durchgeführt.

Hefestamm (James et al, 1996):

AH109: MATa, *trp1-901*, *LEU2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, LYS2:
: Gal1_{UAS}-Gal1_{TTF}-HIS3, GAL2_{UAS} Gal2_{TTF}-ADE2, *ura3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*

Hefemedien:

YPDA-Platten (1 l): 20 g Difco Peptone, 10 g Hefe-Extrakt, 20 g Agar (DIFCO), 950 ml H₂O; der pH-Wert wird auf 5,8 eingestellt. Nach dem Autoklavieren werden Glucose zu 2 % und Adenine zu 0,003 % zugefügt.

YPDA- Flüssigmedium: Wie YPDA- Platten ohne Agar

Minimalmedien- Platten: 6,7 g *Yeast Nitrogen Base*, ohne Aminosäuren (DIFCO), 20 g Agar, 850 ml H₂O, 1 g *Drop-Out Supplement Powder*, entweder His⁻/ Ade⁻/ Trp⁻ oder His⁻/ Trp⁻/ Ade⁻/ Ura⁻ (Clontech), Der pH-Wert wird auf 5,8 eingestellt und nach dem Autoklavieren wird Glucose zu 2 % und eventuelle Aminosäuren aus den 50 x Stocklösungen hinzugegeben.

Minimal Medium, flüssig:

Rezeptur der Platten ohne Agar

X_α- Gal: 20 mg/ml X_α- Gal in Dimethylformamid. Zur Selektion auf den *MEL2* Reporter werden jeweils 20 µl davon auf eine Agarplatte ausplattiert.

Transformationsprotokoll

Es werden kompetente Zellen für 15 Transformationen hergestellt. Dafür inkubiert man 50 ml Flüssigmedium (YPDA oder Minimalmedium) mit Hefekolonien, die nicht älter als drei Wochen sind. Die Kultur wird über Nacht bei 30°C inkubiert. 300 ml YPDA werden mit dieser Kultur auf eine OD₆₀₀ 0,2-0,3 angeimpft. Diese Kultur wird ca. 3 h bei 30°C inkubiert bis eine OD₆₀₀ 0,5 erreicht ist. Die Zellen werden in 50 ml Falkons überführt und für 5 min bei 2500 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Hefezellen in 30 ml H₂O resuspendiert. Es wird wie oben zentrifugiert und die Zellen werden in 1,5 ml TE/ LiOAC aufgenommen. 100 µl der Zellen werden mit 0,1 µg Plasmid-DNA und 0,1 mg Lachs- Sperm- DNA (10 µg/µl) bzw. bei Transformation von zwei Plasmiden mit je 0,1 µg Plasmid- DNA und mit 0,1 mg Lachs- Sperm- DNA (10 µg/µl) versetzt und mit 600 µl PEG/ LiOAC/ TE vermischt. Nach 30 min Inkubation bei 30°C unter leichtem Schütteln werden 70 µl DMSO zugegeben und es folgt der Hitze- Schock für 15 min bei 42°C. Die Zellen werden für 1-2 min auf Eis abgekühlt und für 2 min bei 4000 x g abzentrifugiert. Es wird zweimal mit 1 x TE gewaschen. Die Zellen werden in 500 µl 1 x TE resuspendiert und 100- 200 µl werden auf die entsprechende Agarplatte zur Selektion der Transformanden ausplattiert. Die Bewertung des Wachstums erfolgt zwei, drei, vier und fünf Tage nach Ausplattierung.

Proteinpräparation

Dieses Protokoll ist aufwendiger als die oben beschriebende Proteinpräparation. Die Western- Blots mit diesen Hefepoteinen weisen allerdings wesentlich geringeren Hintergrund auf, so daß dieses Protokoll zu bevorzugen ist.

20 % Trichloressigsäure (TCA) in H₂O, frisch ansetzen auf 4°C kühlen

TCA- Puffer in H₂O, frisch ansetzen auf 4°C kühlen:

20 mM Tris- HCl (pH 8), 50 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, Proteinase-Inhibitoren (Boehringer) 1 : 25.

SDS/ Glycerol- Stock in H₂O:

7,3% SDS, 29,1% Glycerol, 83,3 mM Tris- Base (ohne pH- Wert- Einstellung), eine Spatelspitze Bromphenolblau

Tris/ EDTA in H₂O:

Tris-Base 200 mM, 20 mM EDTA

Alle Verdünnungen werden aus den laborüblichen Stocklösungen hergestellt.

TCA- Laemmli Gellade- Puffer, kurz vor Gebrauch ansetzen:

Für 1ml werden 480 µl des SDS- Glycerol- Stockes, 400 µl des Tris/ EDTA Lösung, 50 µl β- Mercaptoethanol und 40 µl Proteinaseinhibitorstock hinzugegeben.

Es werden 5 ml Übernacht- Kultur des zu analysierenden Hefestammes in Selektionmedium und 5 ml einer untransformierten AH109 Übernacht- Kultur , als Negativkontrolle hergestellt. Die Kulturen werden in je 50 ml YPDA überführt und bei 30°C inkubiert. Die OD₆₀₀ sollte zum Ernten der Hefezellen nicht größer als 0,4- 0,6 sein. Das dauert, abhängig von dem klonierten Fusionsprotein, 4- 8 h. Treten die Zellen in die späte log Phase ein, wird der ADH1 Promotor herunterreguliert und die Konzentration von endogenen Hefe- Proteasen steigt. Eine Hefekultur größer OD₆₀₀ 0,6 sollte deshalb wieder auf eine OD₆₀₀ 0,2 verdünnt und erneut inkubiert werden. Die Gesamt OD₆₀₀ der 50 ml Kultur wird notiert. Die Hefezellen werden in vorgekühlte 50 ml Falkons gegeben und sofort bei 4°C für 5 min bei 2000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in eiskaltem H₂O resuspendiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben . Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden sofort auf Trockeneis gestellt und bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wird das Hefepellet für 10- 20 min auf Eis aufgetaut und in 100 µl eiskaltem TCA Puffer pro 7,5 OD₆₀₀ Einheit resuspendiert. Hat man z.B. eine

Gesamt OD_{600} von 30 ermittelt, verwendet man 400 μ l TCA Puffer. Die Suspension wird in ein 1,5 ml RG überführt, in dem 100 μ l Glaskugeln und 100 μ l eiskaltes 20 % TCA pro 7,5 OD_{600} Einheit vorgelegt wurden. Um die Zellwand zu zerstören wird 4 x für 1 min auf höchster Stufe gevortext. Die Zellen werden zwischen den 1 min Schritten für 30 s auf Eis gestellt. Der Überstand über den Glaskugeln wird in ein 1,5 ml RG überführt und stellt den ersten Zellextrakt da, der auf Eis aufbewahrt wird. Für die zweite Extraktion werden die Glaskugeln mit 500 μ l einer 1 : 1 Mischung aus 20 % TCA und TCA- Puffer gewaschen. Die Suspensionen werden 2 x für 1 min bei RT gevortext, zwischen den Schritten werden sie jeweils für 30 s auf Eis abgekühlt. Der Überstand über den Glaskugeln wird mit dem ersten Zellextrakt vereinigt und es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 14000 x g für 10 min bei 4°C. Der Überstand wird möglichst vollständig entfernt. Das Pellet wird in TCA- Laemmli- Puffer resuspendiert. Es werden 10 μ l Puffer für eine OD_{600} verwendet. Die Suspension wird für 10 min bei 100°C gekocht und anschliessend bei 14000 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Der klare Überstand wird auf ein Gel geladen oder bei -80°C bis zum Gellauf eingefroren. Ein Äquivalent von OD_{600} 0,1 reicht aus, um das Fusionsprotein im Western- Blot zu detektieren.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zu stadienspezifisch exprimierten Genen in Protoskolex und Metacestode, zwei der Larvenstadien von *E. multilocularis*

Zur Identifizierung stadienspezifisch exprimierter Faktoren der beiden Larvenstadien aus *E. multilocularis* wurde ein Differential Display durchgeführt. Diese ursprünglich von Liang und Pardee (1992) beschriebene Methode wurde dabei nach Zhao et al (1998) (cDNA- Bibliothek- Herstellung) und Lohmann et al (1995) (Auftrennung der DNA- Fragmente auf PAA- Gelen mit anschließender Silberfärbung) modifiziert (s. Abb. 5; s. Mat. & Meth., 2.13).

Es würde sich natürlich anbieten, die RNA für diesen Versuch aus den *in vitro* gezüchteten Larvenstadien getrennt aus Metazestode und Protoskolex zu isolieren (Jura et al, 1996). Da jedoch RNA in größeren Mengen für alle derzeit bestehenden Differential Display Methoden benötigt wird, wurde in der vorliegenden Arbeit auf *in vivo* gezüchtetes Parasitenmaterial zurückgegriffen. Hierbei bot es sich an, drei Isolate zu verwenden, die sich hinsichtlich ihrer Kapazität, Protoscolices zu bilden, stark unterscheiden. Während Parasitenmaterial des Isolats T1 (Fuchsisolat aus Tirol) nach Kultivierung in Labortieren (Wüstenspringmäuse) fast ausschließlich Metacestoden enthält, zeichnet sich das K188- Parasitenmaterial (Fuchsisolat aus Kärnten in Österreich) durch überwiegendes Vorkommen von Protoscolices aus. Das Isolat H95 (Fuchsisolat aus Hohenheim) zeigt nach Kultivierung einen intermediären Phänotyp mit einem etwa ausgeglichenen Verhältnis von Metacestoden und Protoscolices.

Dadurch ist es zumindest möglich, Faktoren, die zwischen den beiden Larvenstadien stark differentiell exprimiert sind, über Differential Display zugänglich zu machen.

Die Differential Display Methode wird im Detail im Material- und Methodenteil beschrieben. Hier das Prinzip, da sich die in dieser Arbeit verwendete Methode etwas von den herkömmlichen Differential Display Methoden unterscheidet (s. Abb.5). Das Parasitengewebe wird aus dem Zwischenwirt isoliert und daraus

Gesamt- RNA gewonnen. Aus dieser Gesamt- RNA wird eine Einzelstrang- cDNA mit dem Primer HT14V, welcher als Ankerprimer gegen den Poly- A- Schwanz gerichtet ist, hergestellt. Die entstandene Einzelstrang cDNA wird schließlich gegen einen zweiten Primer, DNP256, hybridisiert, dessen vier 3'- terminale Basen vollkommen degeneriert sind. Dabei kommt es für jede der enthaltenen cDNAs zu einer sequenz- und stringenzabhängigen charakteristischen DNP 256-Bindung in einem Abstand von 100– 800 bp vom 3'- Ende. DNP256 wird anschließend durch Klenow- Enzym, welches gegenüber „Missmatches“ der Primerbindung toleranter ist als die Taq- Polymerase, verlängert, wobei eine doppelsträngige cDNA entsteht (Zhao et al, 1998). Um genügend Material für ein Differential Display zu erhalten, muß die cDNA noch per PCR mit den Primern HT14 und DP 256 amplifiziert werden, denen die degenerierten 3'- Enden V bzw. N₄ fehlen, so entstehen die sogenannten DNA- Representations. Mit Primern, welche die Sequenzen T14 bzw. R24 am 5'- Ende und am 3'- Ende alle 12 bzw. 16 möglichen Dinukleotid- Kombinationen aufweisen (z.B.: T14GC, T14GG,...; R24GC, R24GG,...), können schließlich definierte Subpopulationen der 3'- Representations, welche ein für jede Kombination charakteristisches Bandenmuster ergeben, per PCR gewonnen werden.

Die Auftrennung der PCR wurde über Polyacrylamidgele durchgeführt, die anschließend silbergefärbt wurden. Dies ist eine sehr sensitive Methode, um Unterschiede im Bandenmuster der verschiedenen Versuchsansätze darzustellen. Dabei weisen einheitliche Signale in T1, H95 und K188 auf eine identische Genexpression in den beiden Entwicklungsstadien hin, Unterschiede in den Signalen zeigen eine potentiell unterschiedliche Genexpression an.

In dieser Arbeit wurden zur Identifizierung potentiell differentiell exprimierter Gene die Primer T14 GG, T14 CC, T14 GC, T14 CG, T14 GA, T14 AG jeweils mit R24 AT, R24 AA, R24 TA, R24 TT genutzt. Außerdem wurde T14 AA jeweils mit R24 AC, R24 GA, R24 GT, R24 TG, R24 TC, R24 CT kombiniert. Es wurden also 30 verschiedene Primer- Kombinationen auf die cDNA- Representations aus T1, K188 und H95 untersucht.

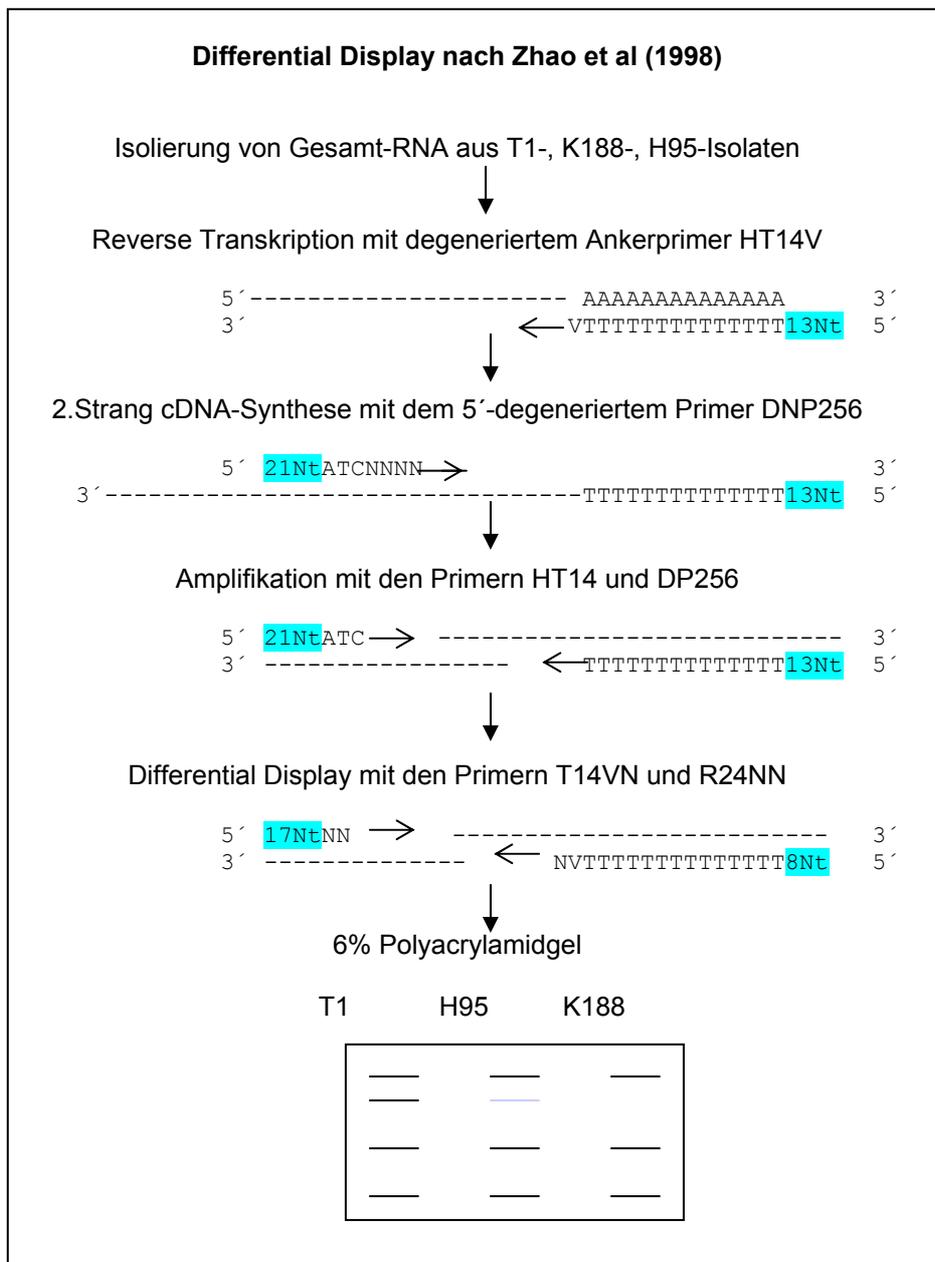


Abb.5: **Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Differential Display-Methode.** Hinterlegt ist die Anzahl der noch fehlenden Primernukleotide. Das Schema eines PAA- Gels zeigt eine Bande, die deutlich in K188 und etwas schwächer in H 95, nicht jedoch in T1 zu sehen ist. Somit kann das anschließend isolierte cDNA- Fragment als potentiell differentiell exprimiert gewertet werden.
N=A, T, G oder C; V=A, G oder C

Interessante Banden wurden aus dem PAA- Gel isoliert und in einer PCR mit der jeweils zugehörigen Primerkombination aus T14VN x R24NN reamplifiziert. Die so erhaltenen cDNA- Fragmente wurden sequenziert und auf Homologien mit schon bekannten Sequenzen in der GenBank- und der SWISS- PROT- Datenbank über den Server des *National Center for Biotechnology Information* mit dem Programm BLAST X untersucht (Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>).

Die abgeleiteten Aminosäure- Sequenzen (AS- Sequenzen) einiger der isolierten cDNA- Fragmente zeigten signifikante Homologien zu AS- Sequenzen aus Säugern, Insekten oder Nematoden. Die Kombinationen, aus denen ein potentiell differentiell exprimiertes Genfragment isoliert werden konnte, sind in Tab.5 abgebildet. Die Sequenzen dieser Genfragmente sowie die Homologievergleiche sind im Anhang zu finden.

Unter anderem wurde ein Teil einer cDNA als protoskolex- spezifisch isoliert, deren abgeleitete AS- Sequenz signifikante Homologien zeigt zum carboxyterminalen Ende von Sanpodo aus *D. melanogaster* und Tropomodulinen aus dem Menschen (s. Tab.5, hinterlegt). Diese sind als Zytoskelettregulationsfaktoren bekannt (Sung & Lin, 1994a; Dye et al, 1998). In diesem Zusammenhang war es, wie bereits in der Einleitung näher begründet, interessant, dieses Tropomodulin- Homologe näher zu charakterisieren. Im Weiteren wird das entsprechende Gen aus *E. multilocularis* als *emto*, das Protein als EmTO bezeichnet.

Primerkombination T14XX x R24XX	Homologien	vorwiegende Expression
T14AA x R24GA T14AA x R24TC	Arginin Transport System Permease Protein, <i>Pasteurella multocida</i>	T1
T14AA x R24TG	Catechol 1,2 dioxygenase, <i>Rhodococcus erythropolis</i>	T1
T14AA x R24CA	ARP 2/3-Komplex, 34kD subunit, <i>H.sapiens, D.melanogaster, C.elegans</i>	T1
T14AA x R24GC	40s ribosomales Protein S28, <i>H.sapiens, M.musculus</i>	T1
T14GA x R24TT	K1 Glykoprotein, Kaposi-Sarkom-assoziiertes <i>Herpes-Virus</i>	T1
T14CG x R24 AA	Unbekanntes ORF <i>Bos taurus</i>	T1
T14GG x R24TT	ribosom. Protein L27a, <i>H.sapiens</i>	T1
T14AA x R24GA	Cbfl/Osf2 Transkriptionsfaktor Isoform 3, <i>M.Musculus</i>	T1
T14GA x R24AA	F11P17.17 Gen Produkt <i>Arabidopsis thaliana</i>	T1
T14GG x R24TT	Sanpodo, <i>D.melanogaster</i>	K188

Tab. 5: **Positive Differential Display- Ansätze**. Das Genfragment, welches in dieser Arbeit weiter charakterisiert wurde, ist hinterlegt. Dieses wurde mit der Kombination T14GG x R24TT als Homologes zu Spdo aus *D. melanogaster* isoliert.

3.2 Vergleich der Expression in Metacestode und Protoskolex mit RT- PCR

Um zu kontrollieren, ob das identifizierte Gen tatsächlich protoskolex- spezifisch exprimiert wird, wie im Differential Display Versuch ursprünglich isoliert, wurden RT- PCR Experimente durchgeführt. Dazu wurde die mRNA *in vitro* kultivierter Metacestoden (ohne sichtbare Brutkapseln) und frisch isolierter Protoskolices gewonnen und als Template für RT- PCR verwendet. Als Oligonukleotide dienten spezifische Primerpaare für die zu untersuchenden Gene. Diese Experimente ergaben, daß *emto* in beiden Entwicklungsstadien exprimiert wird (Abb. 6). *Transketolase (tkt)* aus *E. multilocularis* wurde als konstitutiv exprimiertes Gen (K. Brehm, Manuskript in Vorbereitung) als Kontrolle der Expression in beiden Larvenstadien eingesetzt. Die *tkt*- Expression war wie erwartet in beiden cDNA- Präparationen nachweisbar. Allerdings war auch die *emto*- Expression in beiden cDNA- Präparationen nachzuweisen, was für eine konstitutive Expression in beiden

Entwicklungsstadien spricht. Der Differential Display Versuch ist also als falsch positiv anzusehen.

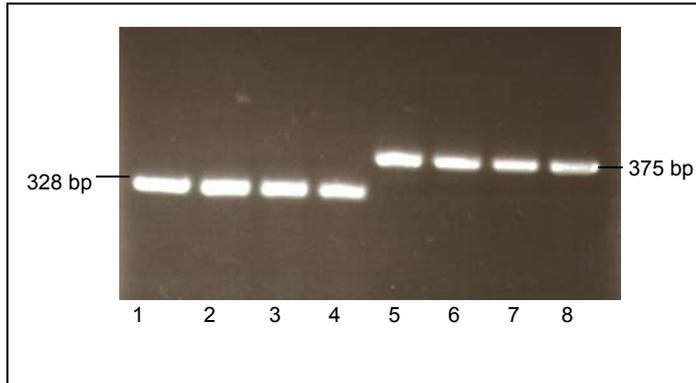


Abb.6: **Vergleichs- RT- PCR von *emto* und Transketolase (*tkf*) auf Zysten (Z)- und Protoskolex (P)-cDNA.** 1: *tkf*, Z, Verdünnung 1:10; 2: *tkf*, P, 1:10; 3: *tkf*, Z, 1:100; 4: *tkf*, P, 1:100; 5: *emto*, Z, 1:10; 6: *emto*, P, 1:10; 7: *emto*, Z, 1:100, 8: *emto*, P, 1:100.

3.3 Molekulare Charakterisierung eines *E. multilocularis* Tropomodulins (*emto*)

3.3.1 cDNA- Sequenz

Im Differential Display wurde eine Teilsequenz der Größe 170 bp aus dem Versuchsansatz mit dem Primerpaar T14GGxR24TT isoliert, deren abgeleitete AS- Sequenz Homologien zu Tropomodulinen aufwies.

Zur weiteren Charakterisierung der cDNA- Sequenz von *emto* wurde folgendermaßen vorgegangen: Aus der aus dem Differential Display bekannten Sequenz wurde der Richtung 5'- Ende lesende Primer Hko1 (s. Abb.8) ausgewählt. Zur Erlangung der weiteren zum 5'-Ende gelegenen Sequenz wurde der Mechanismus des Transsplicing genutzt, welches auch in *E. multilocularis* vorkommt.

Für *E. multilocularis* wurde kürzlich der Nachweis des Transsplicing erbracht (Brehm et al, 2000). Ein 36 bp langes Mini- Exon, der sogenannte Spliced Leader, wird dabei an die 5'- Enden von ca. 30% aller Primärtranskripte

gespleißt. Dadurch erhalten diese Transskripte eine identische Leadersequenz am 5'-Ende. Dies kann dazu genutzt werden, auf einfachem Wege durch PCR vollständige Gene zu charakterisieren, sofern diese über den Mechanismus des Transsplicing exprimiert werden.

Um zu testen, ob auch die mRNA von *emto* zu der Fraktion der mRNAs gehört, die über Transsplicing prozessiert werden, und zur Identifizierung des 5'-Endes, wurde also eine PCR mit dem bekannten Primer Hko1 und einem Primer durchgeführt, der einen Teil der Spliced- Leader- Sequenz von *E. multilocularis* enthält, genannt EM10- SL (Brehm et al, 2000).

In der Tat ergab sich ein cDNA- Fragment einer Größe von ca. 1300 bp, abgebildet in Abb. 7.



Abb. 7: 1,5%- Agarosegel des *emto*- Genfragments mit der kompletten cDNA. Dargestellte Größe von ca. 1300 Bp. Marker: Smart- Ladder (Eurogentec). Amplifiziert wurde dieses Fragment mit den Primern Hko1 und EM10- SL

Die Größe dieses Fragmentes entsprach genau der erwarteten Größe, wenn man davon ausgeht, daß *emto* eine den bekannten Tropomodulin- Homologen vergleichbare Größe besitzt. Das humane Erythrozyten- Tropomodulin (*etmod*) zum Beispiel hat ein offenes Leseraster von 1077bp und kodiert für ein Protein von 359 AS eines Molekulargewichts von 40,6 kDa (Sung et al, 1992). Eine kodierende Sequenz von 1044bp ist beim Tropomodulin aus dem Skelettmuskel von Hühnchen (*csktmod*) zu finden, welche für ein Protein

kodiert, das aus 348 AS besteht und ein Molekulargewicht von 39,2 kDa aufweist (Almenar-Queralt, 1999).

Das Fragment wurde isoliert und sequenziert. Auf diese Weise konnte die komplette cDNA- Sequenz von *emto* erhalten werden. Diese umfaßt vom Beginn der Spliced- Leader- Sequenz bis zum Poly- A- Schwanz 1363 bp und ein offenes Leseraster von 987 bp. Der nicht kodierende Bereich nach dem Stop- Codon enthält 227 bp bis zum Beginn der Poly- A- Sequenz. Die abgeleitete Proteinsequenz von 361 Aminosäuren kodiert für ein Protein eines theoretischen Molekulargewichts von 40,2 kDa (s. Abb. 8).

Ein mögliches ATG- Startcodon befindet sich 4 bp stromabwärts der Spliced- Leader- Sequenz. Dessen umgebende Sequenz weist eine relativ geringe Übereinstimmung mit der Kozak- Sequenz (RccAUGR [R= A oder G]) für effiziente Translationsinitiation auf (Kozak, 1991), die entsprechende Sequenz bei *emto* lautet AATATGT. Ein 451 bp stromabwärts gelegenes weiteres potentiell Startcodon mit Umgebungssequenz zeigt dagegen eine weitaus höhere Homologie (GGCATGA). Jedoch bei Translationsinitiation erst an dieser Stelle würde ein Protein entstehen, dem N-terminale Teile fehlen (N-terminale AS 1-150), welche zwischen den Homologen aus Vertebraten oder Insekten hoch konserviert sind (s. Abb. 9). Von Tropomodulin-Homologen aus anderen Organismen, z.B. Hühnchen (Babcock & Fowler, 1994) oder Menschen (Sung et al, 1992), ist bekannt, daß gerade dieser N- terminale Anteil von größter Bedeutung für die Interaktion mit dem Zytoskelettfaktor Tropomyosin ist. Es ist auch bei EmTO davon auszugehen, daß dem N- Terminus eine Funktion bei der Bindung mit Tropomyosin zukommt und daß deshalb das erste Startcodon auch der Translationsstartpunkt ist, auch wenn die Initiation an dieser Stelle möglicherweise schwach ist. Denkbar wäre jedoch die Produktion eines alternativen Proteins, über dessen potentielle Funktion aber noch keine Spekulationen gemacht werden können.

In vorherigen Studien im Zusammenhang mit Transsplicing wurde außerdem festgestellt, daß auch das ATG des Spliced- Leaders als Startcodon dienen kann (Brehm et al, 2000). Da sich dieses ATG auch bei *emto* im selben

Leserahmen befindet wie das *emto*- ORF, ist nicht auszuschließen, daß die Translationsinitiation eventuell bereits an dieser Stelle erfolgt.

Bei Analyse des 3'-Endes konnte 25 bp oberhalb des Poly- A- Schwanzes ein potentiell Polyadenylierungssignal der Sequenz AATAGA identifiziert werden.

Die komplette cDNA- Sequenz mit abgeleiteter AS- Sequenz ist in Abb. 8 zu finden.

```

CACCGTTAATCGGTTCCTTACCTTGCAGTTTGTATGAATAATGCTAACAAGACGCTGTT 60
                                     M S N K T L F
CGGTAAATCGCTGGACAAATACGATTCGAATATTGACGACATAGATGACCTACTTTTCGAA 120
G K S L D K Y D S N I D D I D D L L S K
GCTGACGGAGGCGGAGATTAAGGAATTGAACGACGATATCGACCCGGACAACCTCGCTTCT 180
L T E A E I K E L N D D I D P D N S L L
CCCGCCTTCTCAACGCTGCCGCGATCAGACTACGAAGGCGCCAACCTGGGCCCTTCAATCG 240
P P S Q R C R D Q T T K A P T G P F N R
CGAAAAATCTCATCAAATTCCTTGTAGAAAAGGCAAAGAATGATCCAGACTGGGATGAAGC 300
E N L I K F L V E K A K N D P D W D E A
AGTTCCTTACGAGAAGAAGATTCGTGGTAAGGTCTTTGAAAAGAAGAAGGTCTGAACCGGT 360
V P Y E K K I R G K V F E K K K V E P V
GGCGGTGGAGAAAAACGAGCTCTCTGAATTGGGCTTTGATGTAGAATTTGATGAAAGCAT 420
A V E K N E L S E L G F D V E F D E S I
CAACGAGGCCCTTGGACAATGCTACAGACGACGAACCTTATCGATTTGGCAGCCATCCTGGG 480
N E A L D N A T D D E L I D L A A I L G
TTTCACGGGCATGATGAATCAGGTGCAGTTCCACGCCAGTATCGAGAACCGGGGTCTAGGT 540
F T G M M N Q V Q F H A S I E N R G Q V
GGGTGGCGGCTTTCTTGGTGTGCAAGGCTGAACAGCTCAAAATTTGTGCCCGATGAGCC 600
G G G F L G V A K A E Q L K I V P D E P
TCCCAATATGACTGATGTTGAGGAGAGCATTAAAGAAGCTCGCAGCGGACGACGCATCGTT 660
P N M T D V E E S I K K L A A D D A S L
AACGGTGTCTGAATCTGAACAACATTAATGTCTCGGCCAGAGGTGGTGTCTCGCTCTATT 720
T V L N L N N I K C L G P E V V S R L F
CACGGCGCTGGGCGAGAACACAAAGCTGCATGAGCTCCACATGGCCGGGACGAACCTCAC 780
T A L G E N T K L H E L H M A G T N L T
TTCCGCCATGGTGGAGCCTCTCCTCCTTCCACTCAAGGTCAACCATACTTTGGAGTTCT 840
S A M V E P L L L P L K V N H T L E V L

```

```

CAATCTTGAATCGAACTTCATTACTGGCGACATGATTTTAAAGATTTTGGACTCTATTTTC 900
  N L E S N F I T G D M I L K I L D S I S
GGACTCAAAGAGCGCCGTAAAAGACCTTCGACTGGCCAATCAGCGCCAACGCGTGCCTCGG 960
  D S K S A V K D L R L A N Q R Q R V L G
TGTGCAGGTGGAGGAGCAGATTGCCAAACTGGTGTGCAGAATCCACGACTCAGCAACCT 1020
  V Q V E E Q I A K L V L Q N P R L S N L
CAGTCTGTACTTCGACACACCGTATGCGCGTGTCAAATCAACGAGCACCTGAAGAAGAC 1080
  S L Y F D T P Y A R V Q I N E H L K K T
CGTAGACGCCAATAAACGGCTTGCCCGTGTCAATAAGGGTGCCTAGTGTGATAGCCCAAT 1140
  V D A N K R L A R V N K G A *
TTTTTTTGCTGCTGCTGCTCTTTGACTCTGTGCAATTATGCTTATACCTTCCCCCCCCCT 1200
  CTTGCTGCCCTTTCAAATCGTACACCTCTAGGGCGTTCTTTTTTAAAAGTGGCGTTTTTA 1260
GAGACGTCACATCTTTAACCTGT<CGTGCTACAACCTTACACGC>GTTACAAATTACTATG 1320
AGAAATAGATTAAACCTTCAGCTTTTTTGTCTCCCAAAAAAAAAA 1363

```

Abb.8: **Komplette cDNA-Sequenz von *emto* mit abgeleiteter AS-Sequenz.** Potentielles ATG- Start- und TAG- Stop- Codon sind unterstrichen. Die Spliced – Leader- Sequenz am 5´- Ende ist fett gedruckt. Die Nukleotidpositionen sind über der Sequenz abgebildet. Die Primer EM10- SL (am 5´- Ende) und Hko1 (am 3´- Ende), die zur Identifikation der cDNA-Sequenz verwendet wurden, sind grau hinterlegt, die Pfeile zeigen in die jeweilige Leserichtung. Das potentielle Polyadenylierungssignal liegt 25 bp stromaufwärts des Poly- A- Schwanzes und ist fett und kursiv gedruckt.

3.3.2 Homologie- Vergleich mit verschiedenen Tropomodulin- Orthologen

Nach der Charakterisierung der vollständigen cDNA- Sequenz von *emto* wurde ein Sequenzvergleich auf Aminosäureebene mit Tropomodulin- Orthologen aus Nematoden, Insekten und Vertebraten in Protein- Datenbanken (BLAST, FASTA) durchgeführt. Faktoren der Tropomodulin- Familie sind bereits in vielen Organismen, wie bereits in der Einleitung erwähnt, identifiziert worden. Bei Menschen und Mäusen existieren vier verschiedene Isoformen, welche durch paraloge Gene exprimiert werden (Cox et al, 2001; Cox & Zoghbi, 2000; Chu et al, 2000). Die Expressionsmuster dieser Gene variieren zell- und organspezifisch. Tropomodulin 3 beispielsweise kann man in nahezu allen Geweben nachweisen, Tropomodulin 1 (ETMOD) ist weitverbreitet in Erythrozyten, Herz, Muskel, Nervensystem, Augen- Linse oder Arteriolen zu

finden, während Tropomodulin 2 (NTMOD) nur in Nervengewebe und Tropomodulin 4 (SkTMOD) im Skelettmuskel nachzuweisen ist (Cox & Zoghbi, 2000; Conley et al, 2001).

In dieser Arbeit wurde ein Aminosäure- Sequenzvergleich des EmTO mit Sanpodo aus *D. melanogaster* (SPDO) (Dye et al, 1998), mit den vier Tropomodulin- Isoformen aus dem Menschen (ETMOD, TMOD 2, TMOD 3 und TMOD 4), mit dem Sk- Tmod vom Hühnchen (CskTmod) sowie mit dem Tropomodulin- ähnlichen Protein TMD-1 Protein aus *C. elegans* (U97193_9) durchgeführt. Dabei ergaben sich signifikante Homologien zu allen verglichenen Sequenzen mit identischen AS zwischen 30% und 39%. Eine Auflistung findet sich in Tab. 6, der Homologievergleich mit allen AS- Sequenzen ist in Abb. 9 abgebildet.

Homologievergleich von EmTO zu:	Identische AS (in %)	Ähnliche AS (in %)
SPDO	39	59
ETMOD	34	53
TMOD2	34	54
TMOD3	35	54
TMOD4	30	Nicht ausgewertet
CskTmod	35	54
TMD-1-Protein	35	57

Tab.6: **Auflistung der identischen bzw. ähnlichen Aminosäuren** in % beim Homologievergleich zwischen EmTO und weiteren Tropomodulinhomologen.

Babcock und Fowler (1994) wiesen bei biochemischen Untersuchungen in Hühnchen die Bindedomänen des CskTmod (Tropomodulin- Homolog im Skelettmuskel in Hühnchen) für Skelettmuskel- und Erythrozyten- Tropomyosin aus *Gallus gallus* nach. Danach sind die AS 6- 94 des CskTmod essentiell für die Bindung an Skelettmuskel- Tropomyosin, während die AS 90- 184 die Bindedomäne für Erythrozyten- Tropomyosin enthalten. Der Carboxyterminus mit den AS 185- 359 sowie die AS 1- 5 am Aminoterminus sind dagegen nicht wichtig für die Interaktion von CskTmod mit Tropomyosin. Der Carboxyterminus von Tropomodulin könnte hingegen beim Aktinfilament- Capping eine große Rolle spielen (Gregorio et al, 1995; Kostyukova et al, 2000).

Interessanterweise sind, wie in Abb. 9 dargestellt, signifikante Homologien in all diesen Bereichen zwischen EmTO und CskTmod zu detektieren.

Trotzdem sind Sequenzen dieses Tropomodulin- Homologen sehr viel weniger konserviert zwischen Vertebraten und *E. multilocularis* als andere Zytoskelettfaktoren. Tropomyosin aus *E. multilocularis* zum Beispiel weist 52% identische ASs zu einem humanen α Tropomyosin auf (K. Hubert, 2001), die *E. multilocularis* β - Tubuline haben zu humanen β - Tubulinen eine über 80% identische AS- Sequenz (K. Brehm, persönl. Mitteilung). Aktine aus *E. granulosus* zeigen zu anderen Organismen Ähnlichkeiten in der AS- Sequenz bis zu 90,6% (Wahlberg & Johnson, 1997; da Silva et al, 1993).

EmTO	MSNKT-----LFGKSLDKYDSNIDDD	60	22
SPDO	METSAT-----TKTTTTLTPA-----KLYGKDLSEYDDV--DVE		32
ETMOD	MS-----YRRELEKYRDL--DED		16
TMOD2	MA-----FQKELEKYKNI--DED		18
TMOD3	MA-----LP--FRKDLEKYKDL--DED		18
TMOD4	MS-----S--YQKELEKYRDI--DED		17
CskTmod	MS-----YRKELEKYRDL--DED		16
TMD-1	MSQAKT-----DYYSSEKTFAPSANSQQGTQLPSKVYNGKLDLED--NDIE		46
EmTO	DLLEKTEAEIKELN---DDIDPDNSLLPPSQRCDQTKAPTGFNRENLIKFLVEKAK	120	79
SPDO	SLLAQLSPEEITILA---KEVDPDDNLFPPDQNSYECKEATGPLNRKQLIEHINKQAI		89
ETMOD	EILGALTEEELRTELENELEDELDPDNALLPAGLRQKQDQTKAPTGFNRENLIKFLVEKAK		76
TMOD2	ELLGKLSSEELKQLENVLDDLDPEESAMLPAGFRQKQDQTKAPTGFNRENLIKFLVEKAK		78
TMOD3	ELGKLSSEELKQLETVLDDLDPEENALLPAGFRQKQDQTKAPTGFNRENLIKFLVEKAK		78
TMOD4	EILRTLSPEEELQDCELDQEMDPENMLLPAGLRQKQDQTKAPTGFNRENLIKFLVEKAK		77
CskTmod	KILGALTEEELRKLLENELEELDPDNALLPAGLRQKQDQTKAPTGFNRENLIKFLVEKAK		76
TMD-1	GLLRLSIDELELDLN---NDFDPNSMLPPSQRCDQTKAPTGFNRENLIKFLVEKAK		103
EmTO	NDPDWDEAVPYEK-KIRGKVFEEKKVEFVAVKELNELSELGFDVVEFDESINE---ALDNAT	180	135
SPDO	ETPDQPEFEPF---VQGVKVRGKQWPPPRDARDIEAEEQIAIDMGEYEH---ALNDAT		142
ETMOD	EFKDREDLVPLYT-GEKRGKVV---VPKQKPLDP-VLESVTLE-----PELEEALANAS		124
TMOD2	EQKDREDFVPFT-GEKRGKVF---IPKEKPIETRKEEKVTLTLD-----PELEEALASAS		127
TMOD3	EHKDREDLVPLYT-GEKRGKVF---IPKQKPVQTFTEKVSILD-----PELEEALTSAS		127
TMOD4	EVKERDLVPLYT-GEKRGKPY---IQPKREI-P-AEEQITLE-----PELEEALAHAT		124
CskTmod	DIKDREDLVPLYT-GEKRGKAW---IPKQKMPDP-VLESVTLE-----PELEEALANAS		124
TMD-1	TEKDWEDVCPYTPGQKRGKVYDSDSGRNSEEPENKGMEMPIEIDLDDDEEELECALVTAP		163
EmTO	DDDELIDLAAILGFTGMNQVQFHASIENRGO---VGGGFLGVAKAEQKIVPDEPPNMTD	240	192
SPDO	QEEIIDLAAILGFHSMNQDYHASLLNKGQ--FVGLGWDGITKSTQOKLFFMDFPNNTD		200
ETMOD	DAELCDIAAILGMHTLMSNQYYQALBSIMNKEG--LNSVIKPTQYKVPVDEEPNSTD		182
TMOD2	DTELYDLAAVGLGVHNLNPNKFDDEETANNGK-GKGP--VRNVVKGEKVPVDEEPNPTN		184
TMOD3	DTELCDLAAILGMHNLITNTKFCNIMGSGNVQDQEH--FSNVVKGKILPVFDEEPNPTN		185
TMOD4	DAEMCDIAAILDMYTLMSNQYYDALCSGEICNTEG--IBVVQPDKYKVPVDEEPNPTN		182
CskTmod	DAELCDIAAILGMHTLMSNQYYEALGSTITVNKEG--LNSVIKPTKYKVPVDEEPNSTD		182
TMD-1	EKDLVLDLAGILGMHNVLNQPPYYNALKGKTQDESTGTFENGIMQSYVPRIVPDEPDNDTD		223
EmTO	VEESIKKLAADDASLTVLNLNNIKCLGPEVVSRIFTALGENTKLEHLEHMAGTNTLSAMVE	300	252
SPDO	VEESIKRVKDDSKLIDLNLNNIKNISDEKLEQLFAALPQNEHLEVLSLTNGVLTDKTAL		260
ETMOD	VEETLERIKNNDPKLEEVNLNINRNIPITLTKAYAEALKENSIVKFKSIVGTRSNDPVAY		242
TMOD2	VEISLQOMKANDPSLQEVNLNINRNIPITLREFAKALETNTHVKKFSLAATRSNDPVAI		244
TMOD3	VEESLRTKENDAHLEVEVNLNINRNIPITLTKDFAKALETNTHVKKFSLAATRSNDPVAT		245
TMOD4	IEEILKRVRSNDKELEEVNLNINRNIPITLTKDFAKALETNTHVKKFSLAATRSNDPVAI		242

CskTmod	VEETLKRRIQNNPDLEEVNLLNIMNIPVPTLKAIAEALKTNTYVKKFSIVGTRSNDPVAF	242
TMD-1	VESCINRLREDDTDLKEVNINNMKRVSKERIRSLIEAACNSKHIEKFSLANTAISDSEAR	283
EmTO	PILLPLKVNHTLEVLNLESNFITGDMILKILDSISDSKSAVKDLRLANQRORVLGVQVEE	312
SPDO	LLAAAEKSKTLRVLNVE TNFTSPPVTVKLVQALLKCHT-IEEF RASNORS AVLGNKIEM	319
ETMOD	ALAEMLKENKVLKTLNVE SNFISGAGILRLVEA-LPYNTSLVEMKIDNQSQP-LGNKVEM	300
TMOD2	AFADMLKVNKTLTSLNIESNFITGTGILALVEA-LKENDTLTEIKIDNQROQ-LGTAVEM	302
TMOD3	AFAEMLKVNKTLKSLNVE SNFITGVGILALIDA-LRDNETLAEIKIDNQROQ-LGTAVEL	303
TMOD4	AVADMLENRSIQSLNIESNFITGTGLMAVLKA-VRENATLIELEVDNQROQ-PGDAVEM	300
CskTmod	ALAEMLKVNNTLKSLNVE SNFISGSGILALVEA-LQNTSLIELELRIDNQSQP-LGNNVEM	300
TMD-1	GLIELIETSPSLRVLNVE SNFLTPELLARLRSTLVTQS-IVEFKADNQROQVLGNQVEM	342
EmTO	QIAKLVLQNPRLSNLSLYEDTPYARVQINEHLKKTVDANKRLARVNK-----GA*	361
SPDO	ETDLDVEKNBLRLRGLHLEFNDAHRVAAHLQRNID-RIRVKRLNQ-----RK	367
ETMOD	ETVSMLEKNATLLKFGYHFTQGGPRLRASNAMNNNDL-VRKRLADLTGPIIPKCRSGV*	359
TMOD2	ELAQMLEENSRILKFGYQFTQGGPRTVAANAITKNNDL-VRKKRVEA-----DRR*	351
TMOD3	EMAKMLEENTNILKFGYQFTQGGPRTVAANAITKNNDL-VRKKRVEG-----DHQ	352
TMOD4	EMATVLEQCPSIVRFGYHFTQGGPRARAAQAMTRNNEL-RRQOK-----KR	345
CskTmod	ETANMLEKNTTLLKFGYHFTQGGPRLRASNAMNNNDL-VRKRLAELNGPIIPKCRSGV	359
TMD-1	DMMMAIEENESLLRVGISFASMEARHRVSEALERNYE-RVRLRRLGK-----DPNV	392

Abb.9.: **Homologievergleich vom Tropomodulin-Homolog aus *E. multilocularis* (EmTO) mit Homologen aus *D. melanogaster* (Spdo), *H. sapiens* (ETMOD, TMOD 2, TMOD3, TMOD4), *Gallus gallus* (CskTmod4) und *C.elegans* (TMD-1).** Identische Aminosäuren sind hinterlegt.. Aminosäure-Positionen sind oberhalb des Homologievergleichs zu finden (die Sequenzen sind erhältlich unter GenomeNet BLAST2 Datenbanknr.: AE003774_24 (SPDO); AF288147s9_1 (ETMOD); AF177169_1 (TMOD2); AF237631_1 (TMOD3); AF177173 (TMOD4); A55463 (CskTmod); U97193_9 (TMD-1)).

Da demzufolge die Homologien von EmTO mit Tropomodulin- Paralogen und - Orthologen aus Vertebraten und Insekten nicht so substantiell sind, spielt die Überlegung eine wichtige Rolle, ob die schon bekannten Funktionen dieser Tropomoduline auch vom EmTO in *E. multilocularis* übernommen werden oder nicht.

3.3.3 Chromosomale Sequenz von *emto*

Die vorhandene cDNA konnte als Ausgangspunkt zur Eruierung des chromosomalen Locus von *emto* genutzt werden. Chromosomale DNA wurde aus dem *E.multilocularis*- Parasitengewebe H95 isoliert. Durch PCR-Amplifizierung von überlappenden Fragmenten der cDNA wurde der komplette chromosomale Locus charakterisiert, der 3753 bp umfasst. *spdo* dagegen spannt 12,4 kb (Dye et al, 1998), TMOD4 4,8 kb und TMOD2 sogar 45 kb (Cox et al, 2001). Die schematische Lage der zur Charakterisierung der

chromosomalen Sequenz verwendeten Primer Tmod 5' und Tmod b für das 5'-Ende, E1tromo x Tmod-M3-3', Tmod-M4-5' x X1-Tromo, Tmod I2-5' und Tmod I-3-5' ist in Abb. 10 zu finden. *emto* weist eine genomische Struktur von vier Exons und drei Introns auf, die genaue Lage der Exons und Introns zeigt ebenfalls Abb. 10.

Alle Introns besitzen die hochkonservierten GT- AG Nukleotide an den Splice Donor und Splice Acceptor Stellen (Tab. 7).

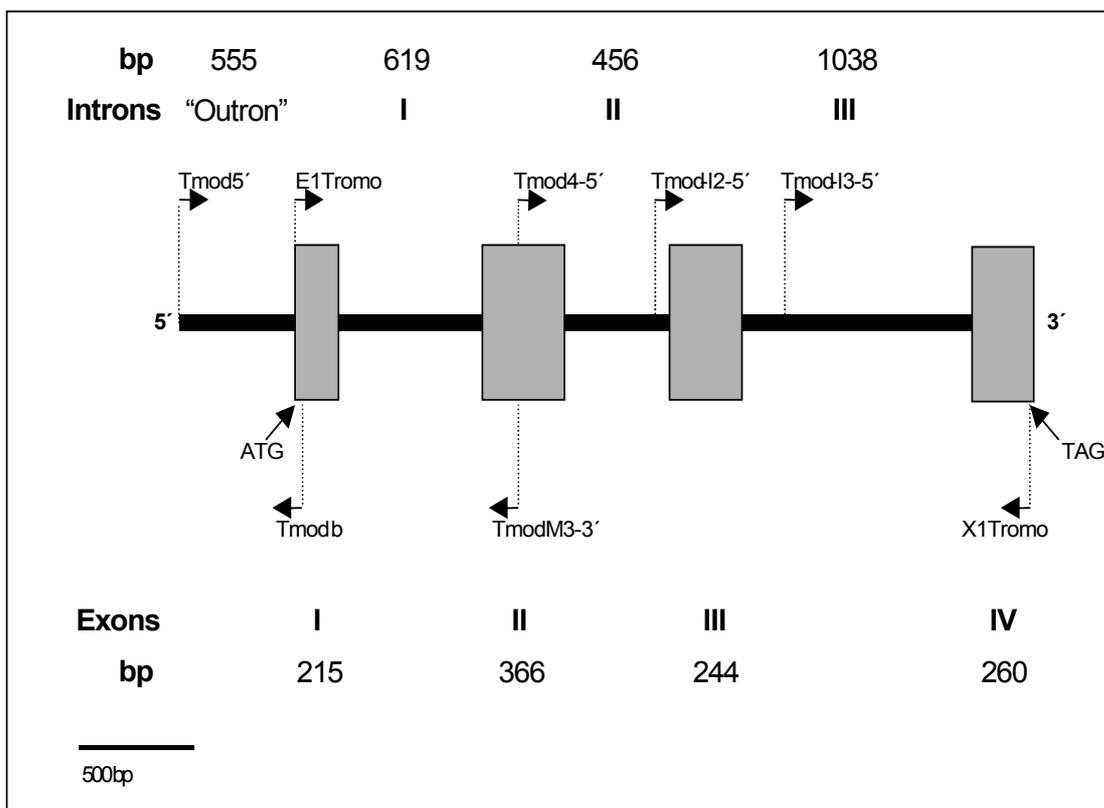


Abb.10: **Chromosomaler Aufbau von *emto* (schematisch)**. Die Exons I- IV sind als graue Boxen markiert und die Größe in bp angegeben. Das ATG- Start- und das TAG- Stop- Codon der kodierenden Regionen von *emto* in den Exons I und IV sind durch Pfeile markiert. Die Introns (Outron und I- III) werden durch die Schwarze Linie dargestellt, die Größen in bp sind oberhalb der Abbildung zu erkennen. Oberhalb und unterhalb der Abbildung sind mit in Leserichtung zeigenden Pfeilen die Primer zu sehen, die zur Sequenzierung des vollständigen chromosomalen Locus von *emto* benutzt wurden. Die Pfeile setzen schematisch an der Stelle an, an der die Primersequenzen in der chromosomalen Sequenz zu finden sind.

Exon Nr.	Exon Größe, bp	Sequenz am Exon-Intron-Übergang		Intron Größe, bp	unterbrocheneAS
		5' Splice Donor Sequenz	3' Splice Acceptor Sequenz		
1	215	ATC AA	gtgggc.....ttccag A	619	Lys (72)
2	366	GAG	gtacgt.....tttttag GAG	456	Glu/Glu(94/95)
3	244	ACT G GAC	gtgagt.....ctatag GC	1038	Gly (276)
4	260				

Tab.7: **Exon- Intron- Organisation von *emto***. Die Positionen, an welchen die Introns die mRNA und die Proteinsequenz unterbrechen, sind gezeigt. In Großbuchstaben sind die Exon- Sequenzen zu sehen, die Intron- Sequenzen sind kleingeschrieben. Exon- und Intron- Größen sind angegeben.

Weiterhin wurden potentielle Promotorbereiche über eine modifizierte Version der Methode nach Harrison et al (1996) bestimmt. Bei dieser PCR-basierten Methode werden spezifische, gegen eine bekannte cDNA-Sequenz gerichtete Primer gegen zufällig stromaufwärts bindende Primer eingesetzt. Die PCR-Produkte werden anschließend isoliert und sequenziert. So konnte ein 555 bp umfassender Bereich des nichtcodierenden 5'- Endes von *emto* erfaßt werden (s. Abb. 11).

Wie vermutet befindet sich stromaufwärts des ATG- Startcodons ein hochkonserviertes AG- Dinukleotid genau an der Stelle, an welcher der Spliced-Leader auf der cDNA erscheint (s. Abb. 11). Dies stimmt mit dem erwarteten Befund überein, daß dieses AG den Splice- Acceptor darstellt und der Spliced-Leader in trans an die Prä- mRNA von *emto* gespleißt wird.

Weiterhin wurde nach potentiellen Promotorstrukturen gesucht, einige davon, wie z. B. eine mögliche TATA- Box sowie eine GGGCGG- Box, waren nicht zu finden. Eine potentielle CCAAT- Box der Sequenz GCCCAATTT könnte sich 205 bp oberhalb der Spliced- Leader- Acceptor- Sequenz befinden (s. Abb. 11) (Lewin, 1988; Bucher, 1989). Aufgrund der Tatsache, daß diese mRNA transgespleißt ist, läßt sich der Transkriptionsstartpunkt nicht sicher bestimmen. Da jedoch in Untersuchungen von Bucher (1989) die von der CCAAT-Box bevorzugte Region 212 bis 57 bp oberhalb des Startcodons liegt, könnte sich

der mögliche Transkriptionsstartpunkt bei *emto* an der Stelle der potentiellen CCAAT- Box befinden.

Desweiteren konnten in der möglichen Promotorregion von *emto* Heat Schock Regulations- Elementen aufgefunden werden. Heat Schock Gene werden vom Organismus zum Schutz bei Umweltstreß transkribiert. Eine Schlüsselfunktion bei der Transkriptions- Aktivierung hat die Interaktion von Transkriptionsfaktoren, sogenannten Heat Schock Faktoren, mit mehreren Kopien einer Heat Schock Element (HSE) genannten Sequenz inne. Das Grundmotiv eines HSE besteht aus der 5- bp Sequenz NGAAN. Ein typisches HSE besitzt 3- 6 dieser Grundsequenzen, die in alternierender Orientierung hintereinandergeschaltet sind, z.B. 5'- NGAANNTTCNNGAAN- 3' (Fernandes et al, 1993). Tatsächlich läßt sich auch bei *emto* eine Sequenz entdecken, die mit diesen Vorgaben in großen Teilen übereinstimmt. Sie befindet sich 276 bp stromaufwärts der Spliced- Leader- Acceptorstelle (s. Abb. 11) und könnte ein denkbare HSE darstellen. Bislang sind HSE nicht bekannt bei Tropomodulinen, es könnte jedoch durchaus sein, daß die Regulation der Transkription durch HSE bei Tropomodulinen eine Rolle spielt.

```

CTGGTTGATGCGCTTATTTGTTTTAAACATAACCAAATTCTTAAGTAACATAACCAAATT 60
CTTAAGTAACACATTCGTTGGTCATGAGTGTGGTGCCGGTTTCTTCCATCTGTTATTCCA 120
TAAATCAATATGGAGTAGTTTTGCATAGAGCTGACATAGTATTTTTATTGCTTTATCTT 180
GGACTACATTTTCAAAAATAGTCAGTTCATCATTTGAACTTTTTATGCCTTCTAATCGTA 240
TGCTGAAATTTAGTGTTCCTGAAAAGTTTGTTCCGAATGTTTTGGTATCGCTTCTTGTA 300
GGTAGGGTCATTTGTTATGTATCAGTTTTGGTATGCACTTCCATTGCCCAATTTTTCGGG 360
GCTATTTTGTAATAAGATGATTGTTAAGAAAGTGGTTTCTTTAAATCCACCGTAGTGTTT 420
GTAGCAAATTTGGTTTTGGGGAATCAATTGTATGGGTTATTTGTTATTTGCTCCGTATGC 480
TGCGAATTTTGA CTCTATGCCATTTGTATTTTCGAATGTAATTTAATGAGACAACAAATA 540
TTGTAATTGTAGAAATATGCTAACAAGA . . .

```

Abb.11: **Nichtcodierende 5'- Region des chromosomalen Locus von *emto***. Die Spliced- Leader- Acceptor- Sequenz AG ist hinterlegt. Das potentielle ATG- Startcodon ist unterstrichen. Die fettgedruckte Sequenz stellt den Beginn des ersten Exons dar. Das potentielle Heat Schock Element (bp 274– 289) und die mögliche CCAAT- Box (bp 346– 354) sind ebenfalls hinterlegt.

Die genomische Organisation der codierenden Region von *emto* wurde schließlich noch im Hinblick auf Exon- Intron- Grenzen im Vergleich mit den genomischen Strukturen von Tropomodulin- Homologen aus *D. melanogaster* und dem Menschen untersucht. Bei *D. melanogaster* existieren zwei alternativ gespleißte 5'Exons (Exons 1a und 1b) (Chu et al, 2000). Hier wurde nur die kodierende Sequenz mit dem Exon 1a (AS- Sequenz ME) zum Vergleich herangezogen. Vom Menschen wurde der chromosomale Locus von *etmod* zur Gegenüberstellung verwendet mit neun kodierenden Exons und acht Introns. Dabei stellte sich heraus, daß *etmod* und *spdo* an vier Stellen identische Introninsertionen aufweisen, daß die Introns von *emto* jedoch an davon unabhängigen Positionen zu finden sind (s. Abb.12).

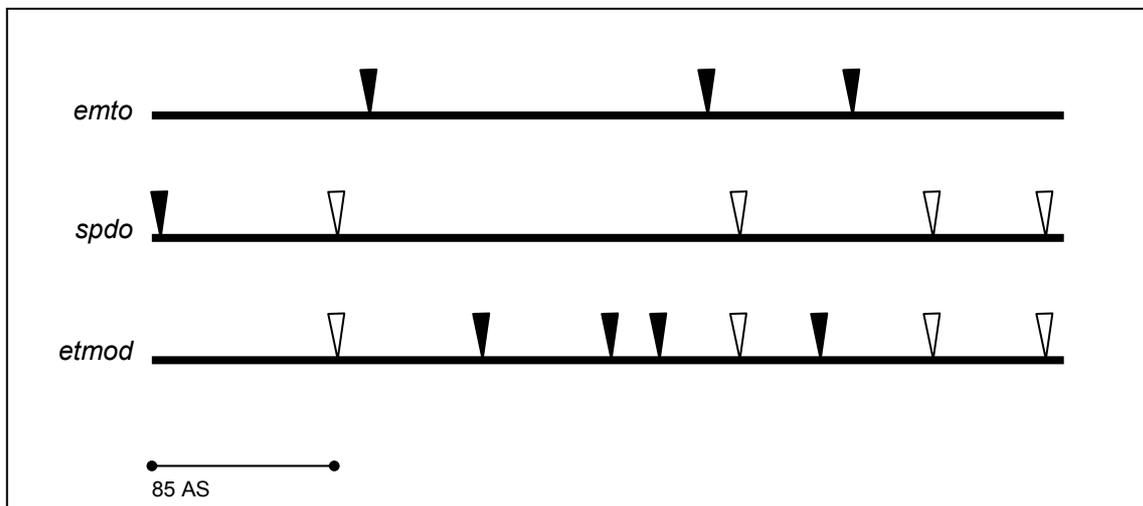


Abb.12: **Schematische Darstellung der Intron- Insertionsstellen** in der codierenden Region von *emto* (*E. multilocularis*), *spdo* (*D. melanogaster*) und *etmod* (*H. sapiens*). Zugrunde liegt der Homologievergleich s. Abb. 9. Die Introns sind als Pfeilspitzen dargestellt. Man sieht, daß *emto* völlig andere Exon- Intron- Grenzen aufweist als *spdo* oder *etmod*. Dagegen stimmen bei *spdo* und *etmod* vier Intron- Insertionsstellen überein, diese sind mit weißen Pfeilspitzen markiert.

3.4 Versuche zur *in vivo* Detektion von Interaktionen zwischen EmTO und EmTY mittels Yeast Two Hybrid Analysen

Aufgrund der signifikanten Homologien (s. Abb. 9; Tab. 6) zwischen EmTO und verschiedenen Tropomodulinen aus Vertebraten stellte sich die Frage, ob dieser *E. multilocularis* Faktor seinen strukturell verwandten Proteinen auch auf funktioneller Ebene ähnlich ist.

Anhand mehrerer biochemischer und zellbiologischer Untersuchungen an Vertebraten- Zellen konnte Tropomyosin als wichtiger Interaktionspartner von Tropomodulin identifiziert werden (Vera et al, 2000; Sung & Lin, 1994a,b; Fowler, 1987). Besonders im Zusammenhang mit der Regulation der Aktinfilamentlänge vom langsam wachsenden Ende aus spielt diese Interaktion eine grundlegende Rolle (Gregorio & Fowler, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit einer Interaktion zwischen den beiden Faktoren aus *E. multilocularis* untersucht. Da vorherige Studien bereits gezeigt hatten, daß Tropomyosin aus *E. multilocularis* (EmTY) mit einem weiteren Zytoskelettfaktor, einem ERM-Homologen aus *E. multilocularis* (Elp), interagiert, wurde die oben genannte Studie unter Miteinbeziehung von Elp ergänzt (K. Hubert, 2001; Frosch et al, 1991). Die Möglichkeit einer Interaktion zwischen EmTO und diesen Faktoren wurde über Yeast- Two- Hybrid-Expression untersucht.

Ein Yeast- Two- Hybrid- Versuch ist ein *in vivo*- Versuch zur Detektion von Protein- Protein- Interaktionen, der in speziell konstruierten Hefestämmen stattfindet. Kernstücke von Yeast- Two- Hybrid- Systemen sind Transkriptionsfaktoren (TF), z.B. GAL4 oder LexA, die zwei Domänen besitzen (Hope & Struhl, 1986), eine Bindedomäne (BD) und eine RNA- Polymerase- Aktivierungsdomäne (AD), die über Bindung an regulatorische Promotorstrukturen die Expression nachgeschalteter Reportergene aktivieren können. AD und BD müssen nicht notwendigerweise Teil eines einzigen Polypeptids sein (Ma & Ptashne, 1988). Bei getrennter Expression der Domänen entsteht ein funktionsfähiger TF dann, wenn diese in räumliche Nähe zueinander gelangen (Brent & Finley, 1997). Diese Eigenschaften wurden

erstmals von Fields und Song (1989) zur Etablierung eines Yeast- Two- Hybrid- Systems ausgenutzt. Sie wiesen eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nach, indem sie eines an die Gal4- BD und eines an die Gal4- AD fusionierten. Durch Interaktion der zwei zu untersuchenden Proteine wurde die AD in räumliche Nähe zur BD gebracht, was zur Folge hat, daß ein unter spezifischen Promotorregionen stehendes lacZ- Reporter gen transkriptionell aktiviert wurde. Dabei kann die Stärke der Interaktion quantitativ über die Expression der β - Galaktosidase gemessen werden.

Alle geläufigen Yeast- Two- Hybrid- Systeme bestehen aus drei Komponenten:

- A) Vektoren zur Herstellung von Fusionsproteinen an die DNA- BD
- B) Vektoren zur Herstellung von Fusionsproteinen an die Transkriptions- AD
- C) Reportergene (auf Plasmiden oder chromosomal integriert) mit einer promotorständigen Bindestelle für die BD des entsprechenden Transkriptionsaktivators.

Das Funktions- Prinzip dieser Systeme ist schematisch in Abb. 13 dargestellt.

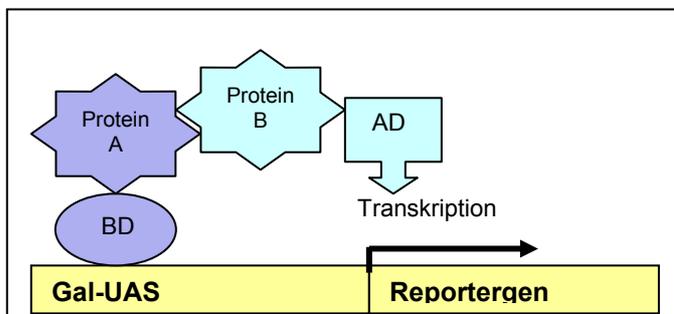


Abb.13: **Schematische Darstellung des Prinzips des Yeast- Two- Hybrid- Versuchs:** Die DNA-Bindedomäne mit Fusionsprotein A bindet an die UAS (Upstream activating site) sequenzaufwärts in der Promotorregion des jeweiligen Reportergens. Bei Interaktion mit dem an die Aktivierungsdomäne gebundenen Fusionsprotein B wird die Transkription der Reportergene gestartet. Dies kann man anschließend auf entsprechenden Selektionsplatten nachweisen (s. Mat & Meth., 2.15)

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Yeast Two Hybrid Systeme verwendet: das Lex-A-basierte System nach Gyuris et al (1993) und das Gal4-basierte System Matchmaker™ Two Hybrid System 3 von Clontech. Die

genauen Protokolle dieser beiden Systeme sind im Punkt 2.15 im Material-und Methodenteil beschrieben.

3.4.1 Interaktionen im Lex- A- basierten Yeast- Two- Hybrid- System

a) Herstellung der Fusionsproteine

Für den LexA- basierten Two- Hybrid- Versuch wurden die Vektoren so konstruiert, daß es zu einer translationellen Fusion mit der BD bzw. der AD kommt. Dazu wurde das Leseraster für EmTO bzw. für EmTY (theoretisches Molekulargewicht 34 kDa, Sequenz s. K. Hubert, 2001) *in frame* in die Vektoren über die 5'- EcoRI- und die 3'- XhoI- Schnittstellen inkloniert. Bei Klonierung in den Vektor pNLexA enthält das spätere Fusionsprotein am C- Terminus die BD (s. Abb. 15). Weiterhin eingesetztes, in diesen Vektor kloniertes, vollständiges Elp sowie dessen C-Terminus (AS 320- 559) und N-Terminus (Aminosäure 1- 319) wurden bereits vorher beschrieben (K. Hubert, 2001).

In den AD-Vektor, pJG4- 5, wurden ebenfalls die cDNAs für *emto* und *emty* kloniert. Diese Fusionsproteine sind mit ihrem N- terminalen Ende an die AD fusioniert (s. Abb. 14).

Als Hefeselektionsstamm wurde EGY48 verwendet, welcher ein chromosomal integriertes LEU2- Reporter gen sowie ein Plasmid, pSH18-34, mit dem lacZ- Reporter gen enthält.

In Abb. 16 sind die konstruierten und verwendeten Fusionsproteine aufgelistet.

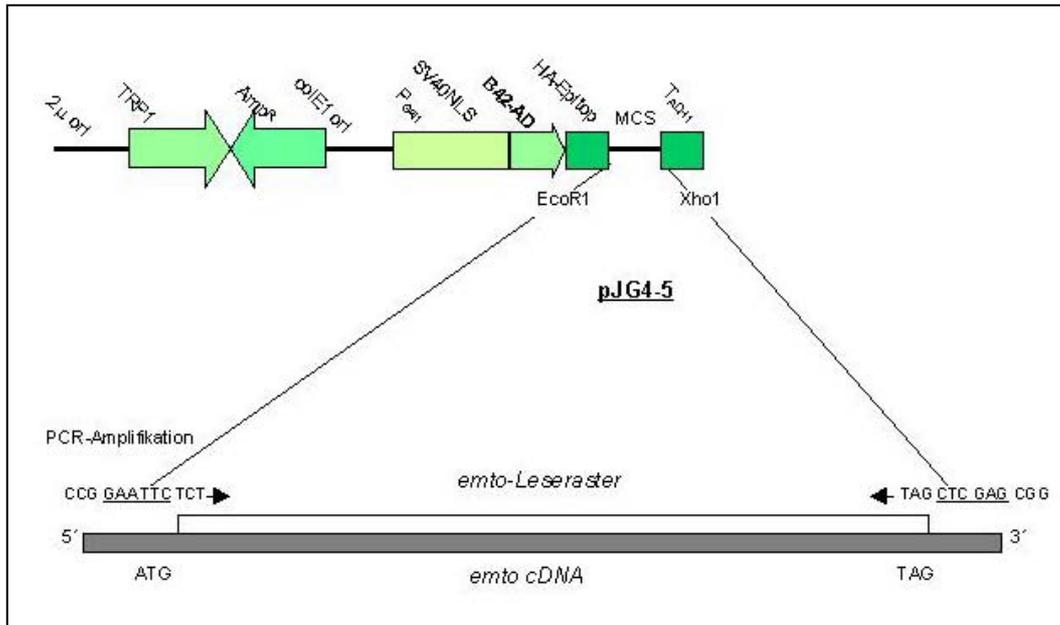


Abb.14: **Herstellung der pJG4- 5- Fusionsproteine am Beispiel von *emto*.** Das Leseraster wird mit Primern amplifiziert, die am 5'- Ende eine EcoR1- Schnittstelle und am 3'- Ende eine Xho1- Schnittstelle anhängen (E1- tromo- 5'und X1- tromo- 3'). Anschließend wird nach einem Restriktionsverdau dieses Stück in die MCS (multiple cloning site) des Vektors pJG4-5 (6,0 kb) kloniert. Die Fusionsproteine sind mit dem N-Terminus an die AD fusioniert. Die Pfeile stellen die Fortsetzung der Primer für die Anfügung der jeweiligen Schnittstelle dar.

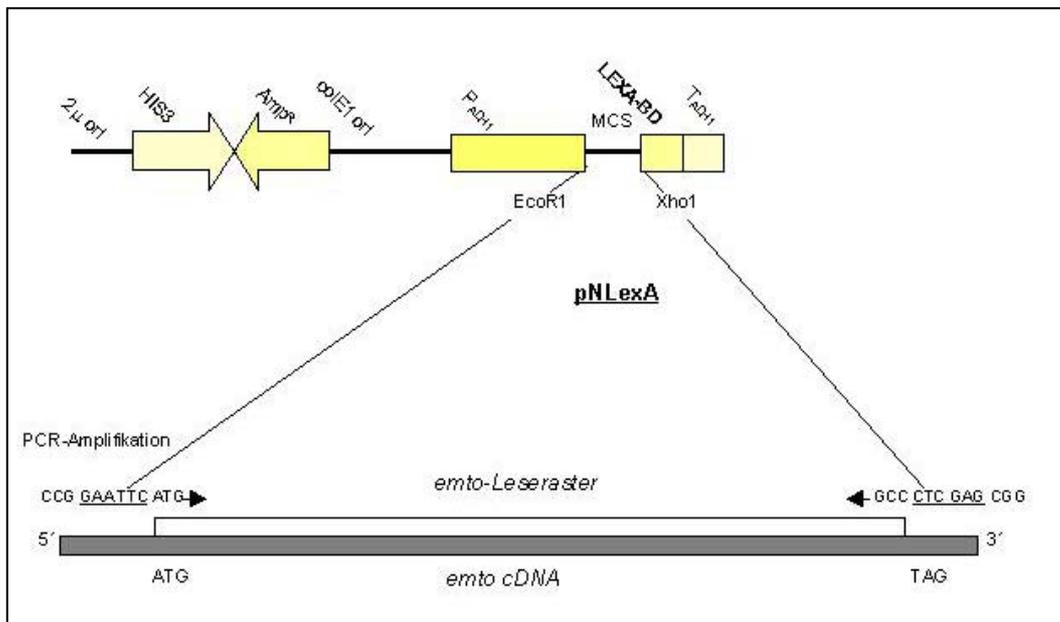


Abb.15: **Herstellung der pNLexA- Fusionsproteine am Beispiel von *emto*.** Das Leseraster wird mit Primern amplifiziert, die am 5'- Ende eine EcoR1- Schnittstelle und am 3'- Ende eine Xho1- Schnittstelle anhängen (E1- TroV2 und X1- TroV2). Anschließend wird nach einem Restriktionsverdau dieses Stück in die MCS des Vektors pJG4-5 (9,8 kb) kloniert. Die Fusionsproteine sind mit dem C- Terminus an die BD fusioniert. Die Pfeile stellen die Fortsetzung der Primer für die Anfügung der jeweiligen Schnittstelle dar.

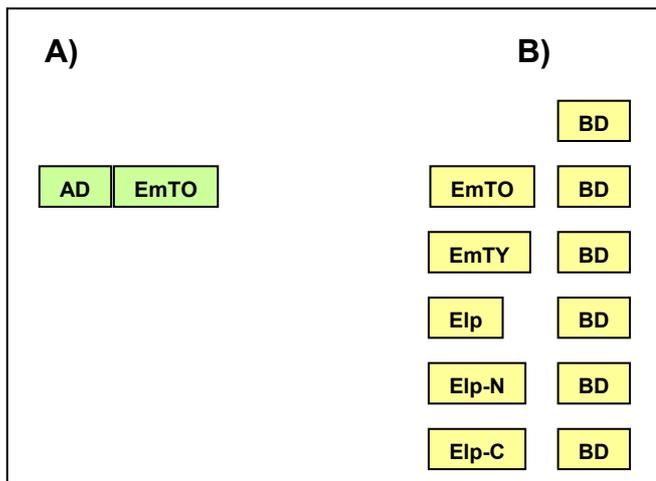


Abb.16: Die im LexA- basierten Yeast- Two- Hybrid System verwendeten Fusionsproteinkonstrukte. A) zeigt EmTO, das im Vektor pJG4-5 an die AD fusioniert ist, B) zeigt die Proteine, die im Vektor pNLexA an die BD fusioniert sind. Der BD- Vektor ohne Fusionsprotein wurde in den Kotransformationen als Negativkontrolle eingesetzt.

b) Transkriptionsaktivierungsassay

Transformanten, die auf Leucin- negativen Platten wachsen und/oder eine Blaufärbung auf X- Gal- Platten zeigen, werden als positives Ergebnis eines Two- Hybrid- Versuchs bewertet. Deshalb muß vorher getestet werden, ob nicht das Fusionsprotein an die BD selbst schon die Transkription der Reportergene aktivieren kann. Im Transkriptionsaktivierungsassay stellte sich heraus, daß pNLexA- EmTO selbst schon die Transkription zu aktivieren vermag (s.Tab.4). Aus diesem Grund wurden weiterhin nur Fusionen getestet, in denen EmTO im Vektor pJG4-5 exprimiert wird.

c) Repressionsassay

In diesem Vorversuch wurden die Fusionsproteine in pNLexA getestet ob sie in den Kern transportiert werden (genaue Beschreibung ist im Material & Methodenteil zu finden). Dabei zeigte sich nach einem Tag eine leichte Blaufärbung von EGY48pJK101 mit pNLexA- EmTO auf der GAL/RAF- Platte, auf der Glu- Platte blieb der Hefestamm weiß. Nach weiteren zwei Tagen färbte sich der Hefestamm auf beiden Selektionsplatten blau. Allerdings war die

Färbung nicht so intensiv wie die der Positivkontrolle pSH17-4. Das weist auf eine schwache Repression der lacZ- Expression durch pNLexA- EmTO hin. Das heißt, das pNLexA- EmTO wird in den Kern transportiert. pNLexA- EmTY in EGY48pJK101 färbte sich auf dem Gal/Raf- haltigen Platten innerhalb von drei Tagen blau, auf den Glu- haltigen Platten fand jedoch keine Färbung statt, was eine starke Repression beweist. pNLexA- EmTY gelangt also auch in den Kern und hemmt dort die lacZ- Expression durch Bindung an den Operator in pJK101. In Vorversuchen von K. Hubert (2001) wurden auch die pNLexA- Elp - Polypeptide in den Kern transportiert, können also für die Interaktionsversuche angewendet werden.

d) Kotransformationen in den Hefeselektionsstamm EGY48

Die Transformanden der Interaktionsversuche wurden auf Selektionsplatten ausgestrichen, denen die Aminosäuren Leucin, Histidin, Uracil und Tryptophan fehlten und denen überdies X- Gal zugesetzt war. Positiv kann ein Versuch gewertet werden, wenn auf diesen Selektionsplatten Wachstum stattfindet. Eine Blaufärbung zeigt je nach Intensität die Stärke der Interaktion an.

Bei der Auswertung dieser Interaktionsversuche jedoch zeigten sich nach 3 Tagen unerwartete Wachstumsmuster (s. Tab. 8). AD- EmTO aktivierte die Transkription bereits bei einer Kotransformation mit dem Vektor mit der BD ohne Fusionsprotein, was möglicherweise auf eine unspezifische Aktivierung des Reportergens durch EmTO zurückzuführen ist. Das gleiche Ergebnis war zu nennen bei Kotransformation von AD- EmTO mit BD- Elp und mit BD- Elp- N. Bei Kotransformation jedoch von EmTO mit EmTY konnte kein Wachstum auf den Selektionsplatten nachgewiesen werden. Auch die Kotransformation von AD- EmTO mit BD- Elp- C zeigte kein Wachstum (s.Tab.8).

Kotransformation in EGY48	AD	EmTO	EmTO	BD
BD	++	●	n.d.	
EmTY BD	—		n.d.	
Elp BD	++	●	n.d.	
ElpN BD	++	●	n.d.	
ElpC BD	—		n.d.	
EGY48 ohne Vektor	n.d.		+++	●

Tab.8: **Interaktionsversuche im LexA- Two- Hybrid- System.** BD-EmTO aktivierte per se in EGY 48 die Transkription der Reportergene, konnte also nicht weiter als Interaktionspartner verwendet werden. Auch die Kotransformationen mit AD- EmTO und BD- Fusionsproteine zeigten unerwartete Wachstumsmuster. Ein Wachstum bei der Kotransformation von EmTO und EmTY konnte in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden. „+“ steht für schwaches Wachstum, „+++“ für starkes Wachstum, „-“ für kein Wachstum. Die Punkte stellen das Ausmaß der Blaufärbung auf X- α - Gal- haltigen Platten dar.

Da die einerseits die unspezifische Aktivierungsfähigkeit von EmTO alleine das System nicht als geeignet erscheinen läßt, um diese Interaktionen zu studieren, ist es dennoch interessant, daß bei Kotransformation von AD- EmTO mit BD- EmTY gerade diese unspezifische Reaktion nicht nachzuweisen ist. Zur Klärung wurde deshalb auf das alternative Gal4- basierte System Two- Hybrid 3 von Clontech, zurückgegriffen.

3.4.2 Two- Hybrid- Versuch im GAL4- basierten System

a) Herstellung der Fusionsproteine

Die Vektoren des GAL4- Systems sind pGADT7, welcher die GAL4- AD (AD= Aktivierungsdomäne) enthält und pGBKT7 mit der GAL4- BD (BD= Bindungsdomäne). Man kann die Fusionsproteine über ein HA- bzw. cMYC- Epitop detektieren, wodurch ein einfacher Nachweis der Proteine durch

kommerzielle Antikörper möglich ist. Die Fusionsproteine sind mit dem N-terminalen Ende mit den Domänen und Epitopen verbunden (s. Abb. 17 & 18). Für diesen Yeast Two Hybrid Versuch wurden die zu untersuchenden Proteine EmTO, EmTY, Elp, Elp-N und Elp-C in den Vektor pGBKT7 kloniert, sowie die Proteine EmTO und EmTY in den Vektor pGADT7 (s. Abb.17 & 18). Die konstruierten und verwendeten Fusionsproteinkonstrukte sind in Abb. 19 gezeigt.

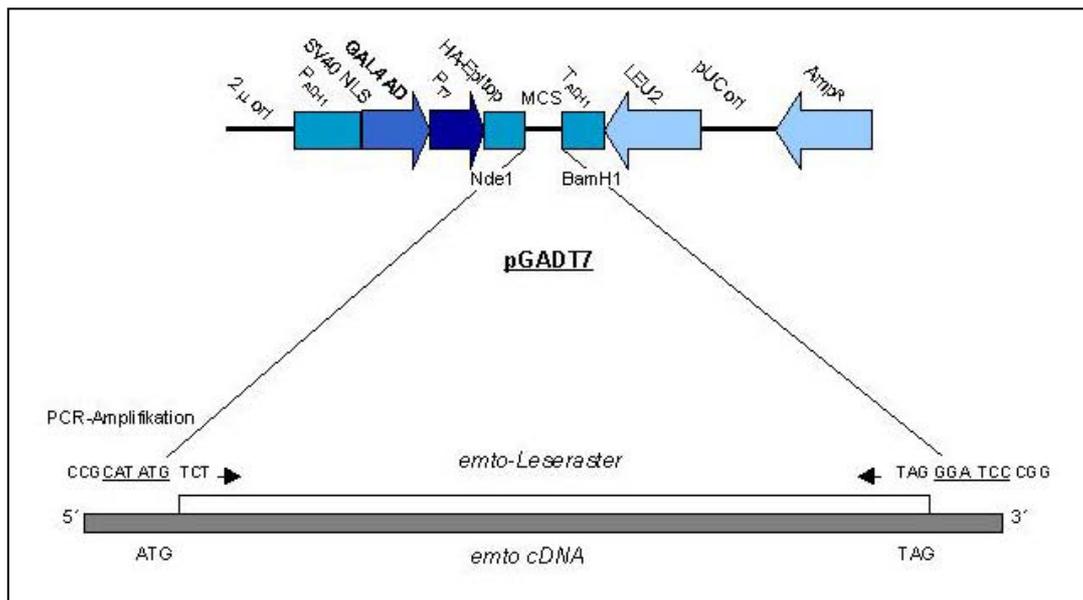


Abb.17: **Herstellung der pGADT7- Fusionsproteine am Beispiel von *emto*.** Das Leseraster wird mit Primern amplifiziert, die am 5'- Ende eine Nde1- Schnittstelle und am 3'- Ende eine BamH1- Schnittstelle anhängen (TO5'- Nde1 und To3'- BamH1). Anschließend wird nach einem Restriktionsverdau dieses Stück in die MCS des Vektors pGADT7 (8,0 kb) kloniert. Die Fusionsproteine sind also N- terminal an die GAL4- AD fusioniert. Die Pfeile stellen die Fortsetzung der Primer für die Anfügung der jeweiligen Schnittstelle dar.

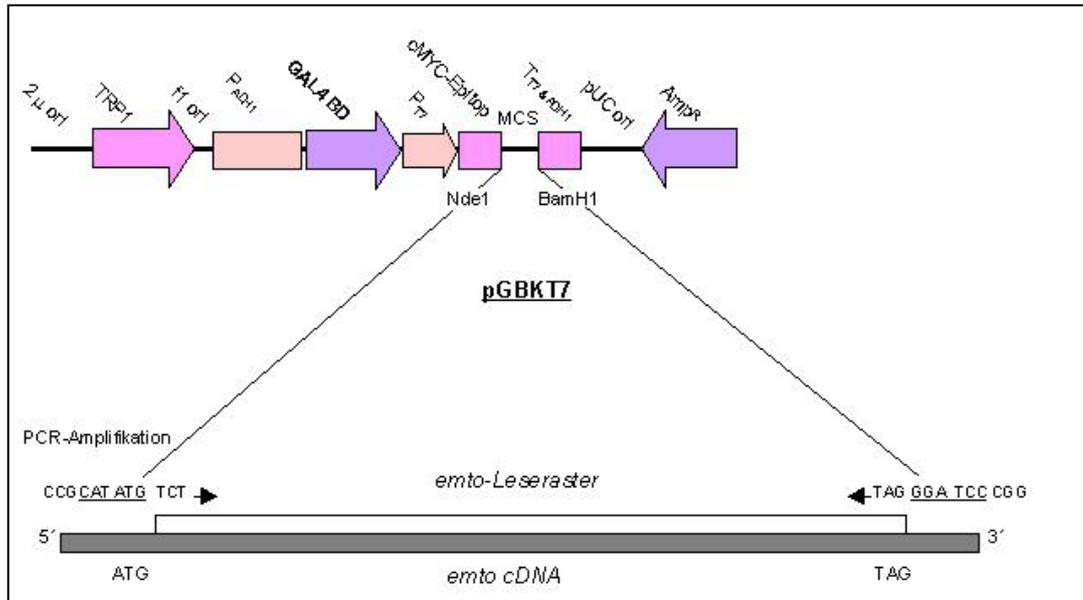


Abb.18: **Herstellung der pGBKT7- Fusionsproteine am Beispiel von emto.** Das Leseraster wird mit Primern amplifiziert, die am 5'- Ende eine Nde1- Schnittstelle und am 3'- Ende eine BamH1- Schnittstelle anhängen (TO5'- Nde1 und To3'- BamH1). Anschließend wird nach einem Restriktionsverdau dieses Stück in die MCS des Vektors pGBKT7 (7,3 kb) kloniert. Die Fusionsproteine sind also N- terminal an die GAL4- BD fusioniert. Die Pfeile stellen die Fortsetzung der Primer für die Anfügung der jeweiligen Schnittstelle dar.

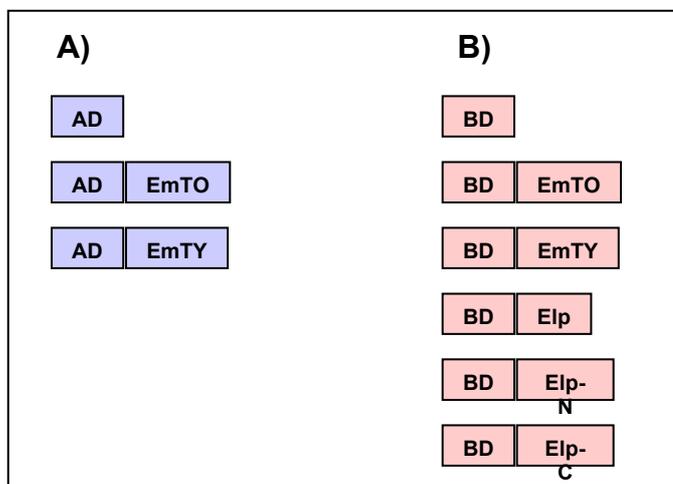


Abb.19: **Die im GAL4- basierten Two- Hybrid- System verwendeten Fusionsproteinkonstrukte.** A) zeigt die Proteine, die im Vektor pGADT7 an die AD fusioniert sind, B) zeigt die Proteine, die im Vektor pGBKT7 an die BD fusioniert sind. Die Vektoren ohne Fusionsproteine wurden in den Kotransformationen als Negativkontrollen eingesetzt.

b) Nachweis der Expression der Fusionsproteine im Westernblot

Nach Transformation der Vektoren in den Hefestamm AH109 konnte die Expression aller Proteine in einer Proteinpräparation gezeigt werden. Die Detektion der Fusionsproteine im pGADT7- Vektor erfolgte mit den Anti- HA-Antikörpern, die der Fusionsproteine im pGBKT7- Vektor mit den Anti- Myc-Antikörpern (s. Abb. 17 & 18).

Wie in Abb.20 abgebildet, sind die Fusionsproteine im AD-Vektor (A) jeweils in erwarteter Größe zu sehen. Der Vektor ohne Fusionsprotein wurde in Spur 1 aufgetragen. Dabei ist jedoch an der Stelle der erwarteten Größe lediglich eine sehr schwache Bande zu sehen, während bei ca. 50 kDa eine starke Bande auftritt, die auch in den restlichen drei Spuren wieder zu finden ist. Möglicherweise sind dies Hefeproteine, welche mit dem AH-Antikörper kreuzreagieren. In Abb. 20 B) ist der BD- Vektor sowie die Fusionsproteine in der erwarteten Größe zu sehen.

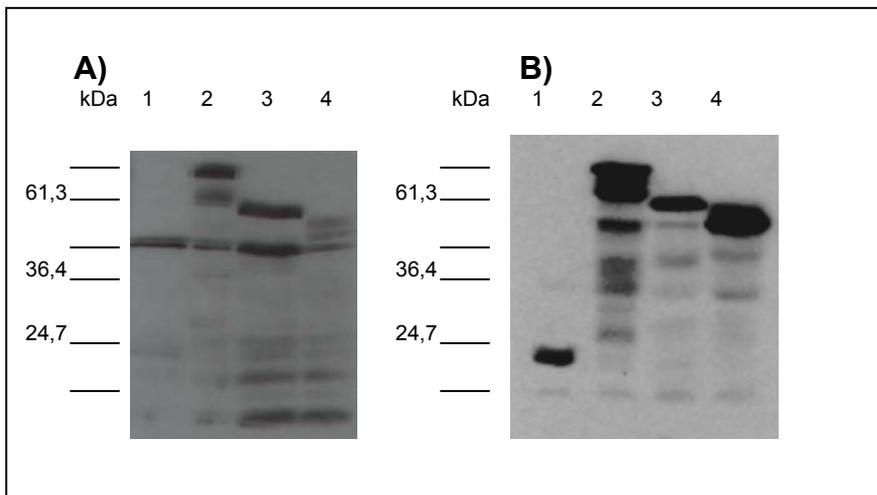


Abb.20: **Westernblots von Hefen AH109 als Kontrolle der Expression der Fusionsproteine.** A): Westernblot mit Antikörper gegen HA- Epitop von pGADT7; Spur 1- 4: Hefezellen, die nur den leeren Vektor, Elp, EmTO, EmTY in pGADT7 exprimieren; B) Westernblot mit Antikörper gegen c-Myc- Epitop von pGBKT7; Spur 1- 4: Hefezellen, die nur den leeren Vektor, Elp, EmTO, EmTY in pGBKT7 exprimieren.

c) Kotransformationsversuche

Die Fusionsproteine der beiden Domänen AD und BD wurden in den Hefeselektionsstamm AH109 in den in Tab. 9 gezeigten Kombinationen kotransformiert und auf Selektionsplatten für hohe Stringenz bewertet (s. Mat. & Meth., 2.15.2).

Die Transformationen von AD- EmTO bzw. BD- EmTO mit dem jeweiligen leeren Gegenvektor dienten als Negativkontrollen der Eigentranskriptionsaktivität von EmTO. Dabei zeigte sich, daß EmTO als BD-Fusionsprotein wieder eine per se Transkriptionsaktivität besitzt. Im Gegensatz dazu konnte jedoch bei Fusion an die AD keine Eigentranskriptionsaktivität nachgewiesen werden.

Das heißt, daß die Transkription der Reportergene lacZ, ADE2 und HIS3 nicht durch AD- EmTO per se ausgelöst werden kann. Wurde jedoch zusätzlich noch BD-EmTY in diesen Hefestamm transformiert, so zeigte sich bereits nach zwei Tagen ein deutliches Wachstum sowie nach zwei Tagen eine Blaufärbung auf den Selektionsplatten hoher Stringenz. Dies ist ein Hinweis darauf, daß EmTO eine sehr starke Interaktion mit EmTY eingeht. In den Versuchsansätzen, in denen AD- EmTO entweder mit BD- Elp oder dessen N- bzw. C- Terminus fusioniert an die BD in den Wirtshefestamm AH109 transformiert wurde, war auch nach 4 Tagen keinerlei Wachstum auf den Selektionsplatten zu sehen. Die Interaktion zwischen Elp und EmTO konnte also, wie oben schon vermutet, nicht bestätigt werden. Eine solche Verbindung zwischen Tropomodulin mit ERM- Proteinen ist allerdings auch in Vertebraten nicht bekannt.

Die Ergebnisse des Versuches sind in der Tab. 9 aufgelistet, Abb. 21 zeigt eine Hefeselektionsplatte.

Kotransformation in AH 109	AD EmTO		BD EmTO	
	AD	EmTO	BD	EmTO
BD	—		n.d.	
BD EmTY	+++	●	n.d.	
BD Elp	—		n.d.	
BD ElpN	—		n.d.	
BD ElpC	—		n.d.	
AD	n.d.		+	○
AD EmTY	n.d.		++	●

Tab.9: **Interaktionsversuche im GAL4- basierten Yeast- Two- Hybrid- System und Ergebnisse.** Die Fusionsproteine mit der BD wurden kotransformiert mit den Fusionsproteinen mit der AD in den Hefestamm AH109. Kotransformationen mit den Vektoren ohne Fusionsprotein dienen dabei jeweils als Negativkontrolle. „+“ steht für schwaches Wachstum, „+++“ für starkes Wachstum, „-“ für kein Wachstum. Die Punkte stellen das Ausmaß der Blaufärbung auf X- α -Gal- haltigen Platten dar.

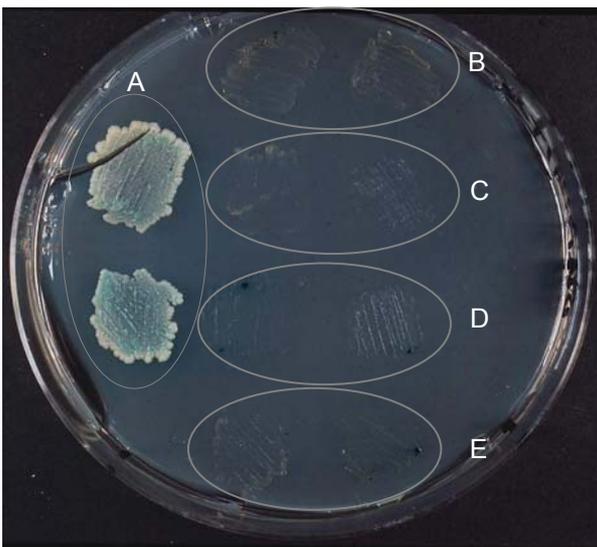


Abb.21: **Selektionsplatte SD/ ADE/ HIS⁻/ LEU⁻/ TRP⁻/ X α - GAL des GAL4- Two- Hybrid- Versuchs.** Pro Versuchsansatz (s. Tab. 6) wurden zwei Ausstriche angefertigt.

A: AD-EmTO mit BD-EmTY;
 B: AD-EmTO mit BD-ohne Fusionsprotein;
 C: AD-EmTO mit BD-Elp;
 D: AD-EmTO mit BD-Elp-N;
 E: AD-EmTO mit BD-Elp-C.

Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C sieht man deutliches Wachstum sowie bereits leichte Blaufärbung in A, während in den anderen Versuchsansätzen keinerlei Wachstum nachzuweisen ist.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde aus *E. multilocularis* ein Orthologes zu Sanpodo aus *D. melanogaster* und Tropomodulin aus Vertebraten isoliert, auf molekularer Ebene charakterisiert und im Hinblick auf seine Bindungseigenschaften mit den Zytoskelettfaktoren EmTY (*E. multilocularis*- Tropomyosin) und Elp (ERM- like- Protein aus *E. multilocularis*) untersucht.

Zunächst wurde dabei über Differential Display, einer Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene (Liang & Pardee, 1992; Zhang et al, 1998), ein cDNA- Fragment isoliert, dessen abgeleitete Aminosäure-Sequenz signifikante Homologien zu Tropomodulin- Homologen aus Säugern (Fowler, 1987) und *D. melanogaster* (Dye et al, 1998; Park et al, 1998) aufwies. Die über die Differential Display Methode ursprünglich als potentiell protoskolex- spezifisch exprimierte cDNA stellte sich später durch RT- PCR- Studien als in Metacestode und Protoskolex konstitutiv exprimierter Faktor heraus, war also als falsch positiv anzusehen, was evtl. auf die Verwendung unterschiedlicher Isolate zurückzuführen ist. Dies müßte durch weitere Sequenzierungen geklärt werden. Dennoch ergab sich mit der weiteren Analyse des entsprechenden Faktors eine interessante Ergänzung zu zellbiologischen Studien, welche kürzlich von K. Hubert (2001) zur Regulation des Zytoskeletts von *E. multilocularis* angestellt worden waren.

Diese Studien befassten sich mit der biochemischen Funktion des *E. multilocularis*- Faktors Elp (ERM- like- Protein), welcher als immundominantes Antigen während der Alveolären Echinokokkose fungiert (Frosch et al, 1991). Elp ist strukturell der Familie der ERM- Proteine (Ezrin/ Radixin/ Moesin Proteine) zuzuordnen, welche in Säugern an der Interaktion zwischen kortikalem Zytoskelett und der Zytoplasmamembran fungieren (Bretscher, 1999; Vaheri et al, 1997; Tsukita & Yonemura, 1999). Über heterologe Expression von Elp in Säugerzellen konnten Hubert et al (1999) zeigen, daß der Faktor nicht nur strukturell sondern auch funktionell zur Familie der ERM- Proteine zu zählen ist. Interessanterweise stellte sich in weiteren Untersuchungen heraus, daß die C- terminale Domäne von Elp mit einem Tropomyosin- Homologen aus

E. multilocularis, EmTY, interagiert (K. Hubert, 2001). Auf Aminosäure-Sequenz- Ebene zeigte EmTY signifikante Homologien zu bekannten Tropomyosinen aus *Schistosoma mansoni* und Säugern, welche dort als wichtige laterale Stabilisatoren des Aktin- Zytoskeletts fungieren (Schafer & Cooper, 1995; Cano et al, 1992). Eine derartige direkte Interaktion zwischen einem Tropomyosin und einem ERM- Protein konnte bislang weder für die gut untersuchten ERM- Proteine aus Säugern noch für die aus Insekten nachgewiesen werden. Hefe- Two- Hybrid basierte Untersuchungen hatten zudem gezeigt, dass eine der Elp– EmTY vergleichbare Interaktion zwischen ERM- Faktoren und verschiedenen Tropomyosinen aus Säugern nicht festgestellt werden kann unter Bedingungen, unter denen es für EmTY und Elp sehr gut nachzuweisen war (K. Brehm, persönliche Mitteilung). Dies eröffnet die interessante Möglichkeit, daß die für *E. multilocularis* detektierte Interaktion zwischen einem ERM- Faktor und Tropomyosin einen parasitenspezifischen Interaktionsmechanismus darstellt. Da Tropomyosin zu seiner Funktion als lateraler Stabilisator von Aktinfilamenten (Lin et al, 1997) auch noch über die Interaktion mit Tropomodulin an der Stabilisierung der spitzen Enden von Aktinfilamenten (Gregorio & Fowler, 1995) beteiligt ist, könnte die Interaktion zwischen Elp und EmTY beispielsweise in die Interaktion zwischen EmTY und einem Tropomodulin- Orthologen aus *E. multilocularis* eingreifen und somit zu einer Destabilisierung von Aktinfilamenten als Folge der Aktivierung des ERM- Faktors führen. Um einen derartigen Zusammenhang auf molekularer Ebene untersuchen zu können, war es zunächst nötig, einen entsprechenden Tropomodulin- Faktor, welcher bisher für Plathelminthen nicht beschrieben war, aus *E. multilocularis* zu identifizieren. Das im Differential Display- Ansatz isolierte DNA- Fragment bot sich deshalb für entsprechende weitere Untersuchungen an.

Zunächst wurde dabei über 5´- RACE die gesamte cDNA des *E. multilocularis* Tropomodulin- Orthologen (*emto*) charakterisiert. Strukturanalysen zeigten, dass der kodierende Faktor in der Tat über die gesamte Länge signifikante Homologien zu den bereits bekannten Tropomodulinen aus Säugern, *D.*

melanogaster und *C. elegans* aufwies (Cox et al, 2001; Cox et Zoghbi, 2000; Chu et al, 2000). Hochkonservierte Sequenzbereiche konnten hierbei insbesondere in N- und C- terminalen Regionen des *E. multilocularis*- Faktors detektiert werden, welche bei den Proteinen aus Säugern nachweislich an der Interaktion zwischen Tropomyosin (N- Terminus) und Aktin (C- Terminus) beteiligt sind (Babcock und Fowler, 1994; Gregorio et al, 1995). Anhand dieser Strukturanalysen ist davon auszugehen, daß es sich bei *emto* um ein funktionell Homologes der Tropomodulin- Familie aus *E. multilocularis* handelt.

Zwar liegen die Homologiewerte zwischen *emto* und anderen Tropomodulin- Homologen mit 30% bis 39% identischen Aminosäuren deutlich niedriger als entsprechende Werte für andere Faktoren des Zytoskeletts, wie beispielsweise Tropomyosin (52% identische Aminosäuren) (K. Hubert, 2001) oder Aktin (bis zu 90% identische Aminosäuren) (Wahlberg et al, 1997; da Silva et al, 1993), Homologievergleiche zwischen Tropomodulin- Homologen aus Insekten und Nematoden mit denen aus Säugern führen jedoch zu ähnlich niedrigen Homologiewerten. Im Gegensatz zu Aktin und Tropomyosin sind also die Tropomodulin- Faktoren von Metazoen generell als weniger konserviert anzusehen.

Um neben der strukturellen Charakterisierung von *emto* auch eine funktionelle Charakterisierung vorzunehmen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Untersuchung der Interaktion mit dem bekannten Tropomyosin- Homologen EmTY aus *E. multilocularis* vorgenommen. Die entsprechenden Studien mit dem Gal4- basierten Yeast- Two- Hybrid- System hatten dabei in der Tat ergeben, daß eine spezifische Interaktion zwischen EmTO und EmTY nachzuweisen ist. Dies ist als weiterer Hinweis darauf zu werten, daß es sich bei EmTO um ein funktionell aktives Tropomodulin- Homologes aus *E. multilocularis* handelt. Weiterhin zeigen diese Studien, daß die für Säugerfaktoren gut etablierte Interaktion zwischen Tropomyosin und Tropomodulin (Sung & Lin, 1994a; Fowler, 1990) auch bei entsprechenden Faktoren aus Plathelminthen konserviert ist. Aufgrund dieser Befunde kann postuliert werden, daß EmTO auch in *E. multilocularis* sehr wahrscheinlich als

Capping- Faktor für die spitzen Enden von Aktinfilamenten fungiert und somit einen wichtigen Bestandteil des Aktinlängen- Regulationsmechanismus darstellt (Schafer und Cooper, 2000; Weber et al, 1994; Fowler et al, 1993; Littlefield et al, 2001; Weber 2000). In dieser Aktivität wird es vermutlich, wie in Vertebraten (Gregorio & Fowler, 1995), durch EmTY unterstützt.

Aufbauend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten wäre es in weiteren biochemischen Studien nun wichtig zu untersuchen, ob die EmTO- EmTY- Interaktion durch Elp beeinflusst werden kann. Dies könnte einerseits durch weitere Hefe- Two- Hybrid- Studien erfolgen, welche beispielsweise ein kürzlich vorgestelltes Three- Hybrid- System (Brachmann & Boeke, 1997; Tirode et al, 1997) miteinbeziehen. Hierbei wird neben den zu studierenden Interaktions- Partnern ein drittes Protein in Hefen exprimiert und dessen Einfluß auf die Interaktion der Fusionsproteine studiert. Da für EmTO und EmTY entsprechende Fusionskonstrukte bereits in dieser Arbeit erstellt wurden, wäre hierfür lediglich eine Einklonierung von Elp in das dritte Expressionsplasmid nötig, um entsprechende Studien zu initiieren. Um aussagekräftige Daten zu erhalten, sollten biochemische Analysen weiterhin Interaktions- Studien zu rekombinant exprimierten und aufgereinigten Bereichen von EmTO, EmTY und Elp beinhalten. Hierbei könnte in Immunopräzipitationsstudien festgestellt werden, ob Elp einen Einfluß auf die Interaktion zwischen den gereinigten Partnern EmTO und EmTY ausübt. Ausgehend von den in dieser Arbeit erlangten molekularen Daten sollte es zudem möglich sein, Antikörper gegen EmTO zu generieren, um die Studien zur biochemischen Interaktion der Zytoskelettfaktoren zusätzlich durch Immunfluoreszenz- Untersuchungen an *E. multilocularis*- Zellmaterial zu unterstützen.

Neben der Charakterisierung der *emto*- cDNA wurde in dieser Arbeit auch eine Charakterisierung des genomischen Lokus vorgenommen. Diese hatte gezeigt, dass das *emto*- Leseraster auf vier Exons lokalisiert ist, welche durch drei Introns mit kanonischen Splice- Donor- und Splice- Acceptorstellen unterbrochen werden. Vergleichende Analysen zur Exon- Intron- Struktur von Tropomodulin- Genen aus Insekten, Nematoden und Säugern hatten vorher

bereits ergeben, daß die Lage der Introns in diesen Genen hochkonserviert ist (Chu et al, 2000). Interessanterweise konnte dies für die genomische Struktur von *emto* nicht festgestellt werden. *emto* zeigt eine geringere Anzahl von Introns, welche zudem an unterschiedlichen Positionen im Leseraster lokalisiert sind. Dieser Befund könnte einerseits dahingehend gedeutet werden, daß *emto* und die Tropomodulin- Gene anderer Metazoen aus unterschiedlichen Vorläufergenen entstanden sind, daß *emto* also kein Orthologes darstellt. Dies ist jedoch aufgrund der signifikanten Homologien auf Aminosäure- Ebene zwischen den kodierenden Faktoren als unwahrscheinlich anzusehen. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte sein, daß ein ursprünglich in einem frühen Metazoen vorhandenes Tropomodulin- Gen noch ohne Introns bestand und Introns in dieses Gen erst nach der Trennung der Plathelminthen- Linie von der aller weiteren Bilaterien- Stämme inseriert wurden. Dies würde einerseits im Einklang mit der akzeptierten Lehrmeinung stehen, daß die Plathelminthen einen der ältesten bekannten Tierstämme darstellen. Die phylogenetische Position der Plattwürmer im Tierreich ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Entgegen der herkömmlichen Lehrmeinung ordnen neuere Studien, basierend auf Vergleichen der 18S rDNA Sequenzen und der Struktur von *hox*- Genen, die *Platyhelminthes* der Gruppe der *Lophotrochozoae* zu, welche eine den Mollusken und *Annelidae* phylogenetisch verwandte Position einnehmen (Carranza et al, 1997; Balavoine, 1998). In der Tat hat es sich kürzlich auch gezeigt, daß beispielsweise das Gen für einen Insulin-Rezeptor aus *E. multilocularis* in seiner Exon- Intron- Struktur deutlich höhere Homologien zum Insulin-Rezeptor aus Säugern als zu dem aus *D. melanogaster* aufweist (Konrad et al, Manuskript in Vorbereitung). Es wäre in diesem Zusammenhang interessant, auch die chromosomalen Loci von weiteren *E. multilocularis*- Faktoren zu analysieren, um definitive Aussagen treffen zu können.

Durch Analyse der *emto*- cDNA konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mRNA dieses Faktors die kürzlich gezeigte Spliced- Leader- Sequenz von *E. multilocularis* am 5'- Ende enthält (Brehm et al, 2000). Zudem konnte bei

Untersuchung des chromosomalen *emto*- Locus ein Bereich von 555 bp identifiziert werden, welcher stromaufwärts des Leserasters lokalisiert ist und welcher sehr wahrscheinlich den Promotor von *emto* beinhaltet.

Hier konnte zunächst exakt an der Position, an der auf der mRNA die Spliced-Leader- Sequenz zu finden ist, auf chromosomaler Ebene eine Sequenz identifiziert werden, welche strukturell zu bekannten Splice- Acceptor- Stellen von *E. multilocularis*- Introns identisch ist. Dieser Befund steht im Einklang mit dem derzeitigen Modell zum Mechanismus des Transsplicing, bei dem zunächst eine prä- mRNA generiert wird, die eine Splice- Acceptor- Stelle ohne stromaufwärts gelegene Splice- Donor- Stelle enthält. Anschließend wird über Transsplicing das Spliced- Leader- Mini- Exon mit dem stromabwärts gelegenen Exon der prä- mRNA fusioniert. Die Anwesenheit der Spliced-Leader- Sequenz auf der *emto*- mRNA und das Vorhandensein einer Splice-Acceptor- Stelle an entsprechender Position im chromosomalen Locus können als Beweis dafür angesehen werden, daß *emto* tatsächlich über den Mechanismus des Transsplicing exprimiert wird.

Interessanterweise konnte Transsplicing auch für die Expression des Zytoskelett- Regulationsfaktors Elp nachgewiesen werden (Brehm et al, 2000). Ebenso für die Expression zweier Bande 4.1 Homologe aus *E. multilocularis* (K. Brehm, persönliche Mitteilung), welche auch potentiell an der Zytoskelettregulation beteiligt sind (Elbaum et al, 1984). Es stellt sich hierbei die Frage, ob eine Funktion an der Regulation des Zytoskeletts oder eine Lokalisation von Faktoren im kortikalen Bereich der Zelle mit einer Prozessierung der entsprechenden mRNAs über den Mechanismus des Transsplicing korreliert.

Andererseits konnte jedoch für *emty* bislang nicht gezeigt werden, daß die entsprechende mRNA transgespleißt wird. Zudem konnte sowohl in Studien bei Cestoden wie auch in Trematoden kein genereller Zusammenhang zwischen biologischen Funktionen und der Prozessierung der zugehörigen mRNA über Transsplicing festgestellt werden (Brehm et al, 2000).

Auch in dieser Beziehung wäre es interessant, weitere Zytoskelettfaktoren aus *E. multilocularis* zu charakterisieren, um entsprechende Zusammenhänge zu bestätigen oder zu widerlegen.

Die einzige gesicherte Funktion des Transspießens, nämlich das Auflösen polycistronischer Transkriptionseinheiten in individuelle kodierende Einheiten, ist für Trypanosomen, Nematoden und Schistosomen nachgewiesen (Nilsen, 1995; Davis, 1997). Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob *emto* ebenfalls Teil polycistronischer Transkriptionseinheiten sein könnte. Entsprechende Studien über weitere chromosomale Bereiche stromaufwärts und stromabwärts wären hierzu erforderlich. Diese könnten, ausgehend von der Sequenzinformation aus dieser Arbeit, über „*chromosomal walking*“ gewonnen werden.

Ob der in dieser Arbeit charakterisierte stromaufwärts gelegene Bereich tatsächlich den vollständigen Promotor beinhaltet, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Einerseits konnten Sequenzmotive in diesem Bereich identifiziert werden, welche signifikante Homologien zu Heat Shock Elementen und CCAAT-Bindungsstellen von Säugern aufweisen (Lewin, 1988; Bucher, 1989; Fernandes et al, 1993). Ob derartige Elemente auch in *E. multilocularis* an genexpressorischen Mechanismen beteiligt sind ist zwar zu vermuten, konnte bislang jedoch nicht bestätigt werden. Eine Analyse der gefundenen potentiellen Promotorstrukturen wäre beispielsweise über Genexpressions- Studien am heterologen System von Säuger- oder Insektenzellen möglich. Aufgrund der geringen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Plattwürmern und Säugern bzw. Insekten ist es jedoch fragwürdig, ob entsprechende Daten direkt auf die Situation in *E. multilocularis* übertragbar wären. Für definitive Aussagen wäre es in jedem Fall notwendig, die gefundenen Promotorbereiche in *Echinococcus*- Zellen einzubringen, was jedoch derzeit noch nicht möglich ist.

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Tropomodulin- homologer Faktor aus einem Plathelminthen auf molekularer Ebene charakterisiert werden.

Zudem wurde die Interaktion des kodierten Faktors mit einem kürzlich isolierten Tropomyosin- Homologen aus *E. multilocularis* nachgewiesen.

Basierend auf diesen Daten ist es nun möglich, die biologische Signifikanz der Interaktion von Elp mit EmTY weiterführend zu untersuchen. Sollte sich in diesen Studien herausstellen, dass der ERM- Faktor Elp in der Tat mit dem Tropomodulin- Tropomyosin- System der *E. multilocularis*- Zelle interferiert, könnte dies einen wichtigen Beitrag zu unserem Verständnis des signaltransduktorischen Geschehens zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett bei *E. multilocularis* beitragen.

6 Literaturverzeichnis

Almenar- Queralt A., Lee A., Conley C.A., Ribas de Pouplana L., Fowler V.M. (1999): Identification of a novel tropomodulin isoform, skeletal tropomodulin, that caps actin filament pointed ends in fast skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 274: 28466- 28475.

Ammann R., Tschudi K., von Ziegler M., Meister F., Cotting J., Eckert J., Witassek F., Freiburghaus A. (1988): The long- term course of 60 Patients with alveolar *echinococcosis* in continuous therapy with mebendazole (1976-1985). *Klin. Wochensch.* 66 (21): 1060-1073.

Ammann, R.W., Eckert, J. (1995): Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans. In: Thompson R.C.A., Lymbery A.J. (eds) *Echinococcus and hydatid disease. CAB International, Oxon*: 411- 451.

Ammann R.W., Fleiner Hoffmann A., Eckert J., Schweizerische Echinokokkose-Studiengruppe (1999): Schweizerische Studie für Chemotherapie der alveolären Echinokokkose- Rückblick auf ein 20jähriges klinisches Forschungsprojekt. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 129: 323- 32.

Ammann, R.W. (2000) Neo- und adjuvante Therapie bei Echinokokkose. *Der Chirurg* 71: 9- 15.

Babcock G.G., Fowler V.M. (1994): Isoform- specific interaction of tropomodulin with skeletal muscle and erythrocyte tropomyosins. *J. Biol. Chem.* 269 (44): 27510- 27518.

Bassam B.J., Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80- 83.

Balavoine G. (1998): Are platyhelminthes coelomates without a coelom? An argument based on the evolution of *Hox* genes. *Amer. Zool.* 38: 843- 858.

Böttger E.C. (1988): High- efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electro- transformation. *Biotechn.* 6: 878- 880.

Brachmann R.K., Boeke J.D. (1997): Tag games in yeast: the two- hybrid system and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 (5): 561- 568.

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

Brehm K., Jensen K., Frosch P., Frosch M. (1999): Characterization of the genomic locus expressing the ERM- like protein of *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100(1): 147- 152. [1999b]

Brehm K., Kronthaler K., Jura H., Frosch M. (2000): Cloning and characterization of β - tubulin genes from *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 107: 297- 302. [2000a]

Brehm K., Jensen K., Frosch M. (2000): mRNA trans- splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. *J. Biol. Chem.* 275 (49): 38311- 38318. [2000b]

Brent R., Ptashne M. (1984): A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. *Nature* 312: 612- 615.

Brent R., Finley R.L. Jr. (1997): Understanding gene and allele function with two- hybrid methods. *Annu. Rev. Genet.* 31: 663- 704.

Bretscher A., Reczek D., Berryman M. (1997): Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J. Cell Sci.* 110: 3011- 3018.

Bretscher A. (1999): Regulation of cortical structure by the ezrin- radixin- moesin protein family. *Curr. op. cell biol.* 11: 109- 116.

Bub E., Stolze Th., Strohmeyer G. (1975): Zur Pathogenese, Diagnostik und Klinik der Echinokokkus- Erkrankung der Leber. *Internist* 16: 428- 435.

Bucher P. (1989): Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* 212: 563- 578.

Calvin N.M., Hanawalt P.C. (1988): High- efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170 (6): 2796- 2801.

Cano M.L., Cassimeris L., Fechheimer M., Zigmond S.H. (1992): Mechanisms responsible for f- actin stabilization after lysis of polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 116: 1123- 1134.

Carranza S., Bagunà J., Riutort M. (1997): Are the *platyhelminthes* a monophyletic primitive group? An assessment using 18S rDNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14 (5): 485- 497.

Choji K., Fujita N., Chen M., Spiers A.S., Morita Y., Shinohara M., Nojima T., Irie G. (1992): Alveolar hydatid disease of the liver: computed tomography and transabdominal ultrasound with histopathological correlation. *Clin. Radiol.* 46: 97- 103.

Chu X., Thompson D., Yee L.J., Sung L.A. (2000): Genomic organization of mouse and human erythrocyte tropomodulin genes encoding the pointed end capping protein for the actin filaments. *Gene* 256: 271- 281.

Conley C.A., Fritz-Six K.L., Almenar-Queralt A., Fowler V.M. (2001): Leiomodins: Larger members of the tropomodulin (Tmod) gene family. *Genomics* 73: 127- 139.

Cox P.R., Zoghbi H.Y. (2000): Sequencing, expression analysis, and mapping of three unique human tropomodulin genes and their mouse orthologs. *Genomics* 63: 97- 107.

Cox P.R., Siddique T., Zoghbi H.Y. (2001): Genomic organization of tropomodulins 2 and 4 and unusual intergenic and intraexonic splicing of YL-1 and Tropomodulin 4. *Genomics* www.biomedcentral.com/1471-2164/2/7

Dagert M., Ehrlich S.D. (1979): Prolonged incubation in calcium chlorid improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23- 28.

Davis R.E. (1997): Surprising diversity and distribution of spliced leader RNAs in flatworms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87 (1): 29- 48.

Dye C.A., Lee J., Atkinson R.C., Brewster R., Han P., Bellen H.J. (1998): The *drosophila sanpodo* gene controls sibling cell fate and encodes a tropomodulin homolog, an actin/ tropomyosin- associated protein. *Development* 125: 1845- 1856.

Elbaum D., Mimms I.T., Branton D. (1984): Modulation of actin polymerization by the spectrin- band 4.1 complex. *Biochem.* 23: 4813- 4816.

Estojak J., Brent R., Golemis E.A. (1995): Correlation of two- hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol. Cell Biol.* 15: 5820- 5829.

Ewald D., Eckert J., Gottstein B., Straub M., Nigg H. (1992): Parasitological and serological studies on the prevalence of *Echinococcus multilocularis*. Leuckart, 1863 in red foxes (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in Switzerland. *Rev. Sci. Tech.* 11:1057- 1061.

Fernandes M., Xiao H., Lis J.T. (1993): Fine structure analyses of the *Drosophila* and *saccharomyces* heat shock factor- heat shock element interactions. *Nucl. Acids Res.* 22: 167- 173.

Fields S., Song O. (1989): A novel genetic system to detect protein- protein interactions. *Nature* 340: 245- 246.

Finley R.L.Jr., Brent R. (1996): Interaction trap cloning with yeast. DNA cloning- expression systems: A practical approach. Eds. D. Glover & B.D. Hames. *Oxford university press*.

Finley R.L.Jr., Brent R. (1997): Understanding gene and allele function with two- hybrid methods. *Annu. Rev. Genet.* 31: 663- 704.

Fowler V.M. (1987): Identification and purification of a novel M_r 43.000 tropomyosin- bindig protein from human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 12792- 12800.

Fowler V.M. (1990): Tropomodulin: a cytoskeletal protein that binds to the end of erythrocyte tropomyosin and inhibits tropomyosin binding to actin. *J. Cell Biol.* 111: 471- 481.

Fowler V.M., Sussmann M.A., Miller P.G., Flucher B.E., Daniels M.P. (1993): Tropomodulin is associated with the free (pointed) ends of the thin filaments in rat skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 120: 411- 420.

Fowler V.M. (1996): Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 86- 96.

Frosch P.M., Frosch M., Pfister T., Schaad V., Bitter-Suerbaum D. (1991): Cloning and characterisation of an immunodominant major surface antigen of *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48: 121- 130.

Frosch P.M., Geier C., Kaup F.J., Müller A., Frosch M. (1993): Molecular cloning of an echinococcal microtrichal antigen immunoreactive in *Echinococcus multilocularis* disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 301- 310.

Gottstein B. (1985): Purification and characterization of a specific antigen from *Echinococcus multilocularis*. *Parasite Immunol.* 7: 201- 212.

Gottstein B., Deplazes P., Aubert M. (1992): *Echinococcus multilocularis*: Immunological study on the „EM 2- positive“ laminated layer during *in vitro* and *in vivo* post- oncospherical and larval development. *Parasitol. Res.* 78: 291- 297.

Gottstein B. (1992): Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. Review. *Clin. Microbiol. Rev.*: 248- 261.

Gottstein B. (2000): Epidemiologie und Systematik der zystischen und alveolären Echinokokkose. Review. *Chirurg* 71: 1- 8.

Gottstein B., Saucy F., Deplazes P., Reichen J., Demierre G., Busato A., Zuercher C., Pugin P. (2001): Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans? *Emerg. Infect. Dis.* 7: 408- 412.

Gregorio C.C., Fowler V.M. (1995): Mechanisms of thin filament assembly in embryonic chick cardiac myocytes: Tropomodulin requires tropomyosin for assembly. *J. Cell Biol.* 129 (3): 683- 695.

Gregorio C.C., Weber A., Bondad M., Pennise C.R., Fowler V.M. (1995): Requirement of pointed- end capping by tropomodulin to maintain actin filament length in embryonic chick cardiac myocytes. *Nature* 377: 83- 86.

Gyuris J., Golemis E., Chertkov H., Brent R. (1993): Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75:791- 803.

Haertel, M., Fretz, Ch., Fuchs, W. (1980): Zur computertomographischen Diagnostik der Echinokokkose. *ROFO Fortschr. Geb. Röntgenstr. Nuklearmed.* 133: 164- 170.

Hanahan D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557- 580.

Harrison R.W., Miller J.C., D'Souza M.J., Kampo G. (1996): Easy gene walking. *BioTechn.* 22: 650- 653.

Helbig M.D., 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.

Hemphill A., Gottstein B. (1995): Immunology and morphology studies on the proliferation of *in vitro* cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitol. Res.* 81: 605- 614.

Higgins D.G., Sharp P.M. (1989): Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* 5: 151- 153.

Hope I.A., Struhl K. (1986): Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46: 885- 894.

Hubert K., Cordero E., Frosch M., Solomon F. (1999): Activities of the EM10 protein from *Echinococcus multilocularis* in cultured mammalian cells demonstrate functional relationships to ERM family members. *Cell Motil. Cytoskeleton* 42 (3): 178- 188.

Hubert K. (2001): Untersuchungen zur Rolle des immundominanten Proteins Elp (ERM- like Protein) im Zytoskelett des Plathelminthen *Echinococcus multilocularis*. *Dissertation Universität Würzburg, biologische Fakultät.*

Ito M., Swanson B., Sussman M.A., Kedes L., Lyons G. (1995): Cloning of tropomodulin cDNA and localization of gene transcripts during mouse embryogenesis. *Developmental Biol.* 167: 317- 328.

Ito A., Schantz P.M., Wilson J.F. (1995): Em18, a new serodiagnostic marker for differentiation of active and inactive cases of alveolar hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 41- 44.

James P., Halladay J., Craig E.A. (1996): Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two- hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436.

Jura H., Bader A., Hartmann M., Maschek H., Frosch M. (1996): Hepatic tissue culture model for study of host- parasite interactions in *alveolar echinococcosis*. *Infect. Immun.* 64: 3484- 3490.

Jura H., Bader A., Frosch M. (1998): In vitro activities of benzimidazoles against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 141- 146.

Kern P., Wechsler J.G., Lauchart W., Kunz R. (1994): Der kleine Fuchsbandwurm- Klinik und Therapie der alveolären Echinokokkose. *Deutsches Ärzteblatt* 91: A-2494-2501.

Kostyukova A., Maeda K., Yamauchi E., Krieger I., Maéda Y. (2000): Domain structure of tropomodulin- Distinct properties of the N- terminal and C- terminal halves. *Eur. J. Biochem.* 267: 6470- 6475.

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

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680- 685.

Lewin B. (1988): Kontrolle der Genexpression durch Transcription. *Gene, Lehrbuch der molekularen Genetik*: 171- 207.

Liang P., Pardee A.B. (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257(5072): 967- 971.

Lin JJC., Warren KS., Wamboldt DD., Wang T., Lin JLC. (1997): tropomyosin isoforms in nonmuscle cells. *Int. review cytology* 170:1- 38.

Littlefield R., Fowler V.M. (1998): Defining actin filament length in striated muscle: rulers and caps or dynamic stability? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 14: 487- 525.

Littlefield R., Almenar-Queralt A., Fowler V.M. (2001): Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle. *Nat. Cell Biol.* 3 (6): 544- 551.

Lohmann J., Schickle H., Bosch TCG. (1995): REN Display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Biotechniques* 18 (2): 201- 202.

Ma J., Ptashne M. (1988): Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 55: 443- 446.

Miguet J.P., Bresson- Hadni S. (1989): *Alveolar echinococcosis* of the liver. *J. Hepatol.* 8: 373- 379.

Nilsen T.W. (1995): Trans- splicing: an update. Review. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73 (1-2): 1-6.

Park M., Yaich L.E., Bodmer R. (1998): Mesodermal fate decisions in *drosophila* are under the control of the lineage genes *numb*, *notch* and *sanpodo*. *Mech. development* 75: 117- 126.

Pollard T.D., Blanchoin L., Mullins R.D. (2000): Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 545- 576.

Prashar K., Weissman S.M. (1996): Analysis of differential gene expression by display of 3' end restriction fragments of cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 659- 663.

Rahalkar M.D., Shetty D.D., Kelkar A.B., Kelkar A.A., Kinare A.S., Ambardekar S.T. (2000): The many faces of cysticercosis. *Clin. Radiol.* 55 (9): 668- 74.

Rausch R.L. (1975): *Taeniidae*. In: W.T. Hubbert, W.F. Mc Culloch and P.F. Schurrenberger (eds), Diseases transmitted from Animals to Man. Thomas, Springfield, Illinois: pp 678- 707.

Rausch R.L., D'Allessandro A., Ohbayashi M. (1984): The taxonomic status of *Echinococcus cruzi* Brumpt and Joyeux, 1924 (*Cestoda: Taeniidae*) from an agouti (*Rodentia: Dasyproctidae*) in Brazil. *J. Parasitol.* 70: 295- 302.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R.G., Horn G.T., Mulli K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer directed enzymatic amplifikation of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487- 491.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1992): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24: 104- 108.

Schafer D.A., Cooper J.A. (1995): Control of actin assembly at filament ends. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 497- 518.

Schantz P.M. (1982): Echinococcosis. In: J. Steele (ed.), CRC Handbook Series in Zoonoses, Section C: Parasitic Zoonoses, 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 231- 277.

Schicker H.J. (1976): Die Echinokokkose des Menschen. Stand von Diagnose, Therapie und Prognose bei Echinokokkenerkrankungen in Baden-Württemberg in den Jahren 1960- 1972. Medical dissertation, University of Tübingen.

Schmidt R.F., Thews G. (1995): Muskel- Molekulare Mechanismen der Kontraktion. *Physiologie des Menschen*. Aufl. 26: 67- 69.

Seitz H.M., Frosch M. (1994): Der kleine Fuchsbandwurm-Erreger der alveolären Echinokokkose. *Deutsches Ärzteblatt* 38: A- 2484- 2493.

Siles-Lucas M., Gottstein B. (2001): Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis. *Trop. Med. Int. Health* 6: 463- 475.

da Silva C.M., Henrique, Ferreira V., Picon M., Gorfinkiel N., Ehrlich R., Zaha A. (1993): Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60 (2): 209- 219.

Skeath J.B., Doe C.Q. (1998): *Sanpodo* and *notch* act in opposition to *numb* to distinguish sibling neuron fates in the *drosophila* CNS. *Development* 125: 1857- 1865.

Sung A.L., Lin J.J.C. (1994): Erythrocyte tropomodulin binds to the N-terminus of hTM5, a tropomyosin isoform encoded by the γ - tropomyosin gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 201 (2): 627- 634. [1994a]

Sung A.L., Lin J.J.C. (1994) The N- terminal 18 residues of tropomyosin 5 are essential for the binding to tropomodulin. *Mol. Biol. Cell* 5: 400a. [1994b]

Sung A.L., Fowler V.M., Lambert K., Sussman M.A., Karr K., Chien S. (1992): Molecular cloning and characterization of human fetal liver tropomodulin. *J. Biol. Chem.* 267 (4): 2616- 2621.

Swiderski Z. (1983): *Echinocossus granulosis*: hook- muscle systems and cellular organisation of infective oncospheres. *Int. J. Parasitol.* 13: 289- 299.

Thompson R.C., Eckert J. (1982): Observations on *Echinococcus multilocularis* in the definitive host. *Z. Parasitenkd.* 69: 335-345. [1982a]

Thompson R.C., Eckert, J. (1982): The production of eggs by *Echinococcus multilocularis* in the laboratory following *in vivo* and *in vitro* development. *Z. Parasitenkd.* 68: 227- 234. [1982b]

Thompson R.C. (1988): Biology and systematics of echinococcus. In: Thompson, R.C.A. (ed.), The biology of Echinococcus and Hydatid Disease. Allen & Unwin, London, pp. 5- 43.

Thompson R.C., Lymbery A.J., Constantine C.C. (1995): Variation in Echinococcus: towards a taxonomic revision of the genus. Review. *Adv.Parasitol.* 35: 145- 176.

Tirode F., Malaguti C., Romero F., Attar R., Camonis J., Egly J.M. (1997): A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three- hybrid system. *J. Biol. Chem.* 272 (37): 22995- 22999.

Towbin H., Staehlin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350- 4354.

Tsukita S., Yonemura S. (1999): Cortical actin organization: lessons from ERM (Ezrin/ Radixin/ Moesin) Proteins. *J. Biol. Chem.* 274 (49): 34507- 34510.

Ursitti J.A., Fowler V.M. (1994): Immunolocalization of tropomodulin, tropomyosin and actin in spread human erythrocyte skeletons. *J. Cell Sci.* 107: 1633- 1639.

Vaheri A., Carpen O., Heiska L., Helander T.S., Jaaskelainen 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.

Vera C., Sood A., Gao K.M., Yee L.J., Lin J.J.C., Sung LA. (2000): Tropomodulin- binding site mapped to residues 7- 14 at the N- terminal heptad repeats of tropomyosin isoform 5. *Arch. Biochem. Biophys.* 378 (1): 16- 24.

Vogel, H. (1978): Wie wächst der Alveolarechinokokkus? *Z. Tropenmed. Parasitol.* 29: 1- 11.

Wahlberg M.H., Johnson M.S. (1997): Isolation and characterization of five actin cDNAs from the Cestode *Diphyllobothrium dendriticum*: a phylogenetic study of the multigene family. *J. Mol. Evol.* 44: 159- 168.

Watakabe A., Kobayashi R., Helfman D.M. (1996): N-Tropomodulin: a novel isoform of tropomodulin identified as the major binding protein to brain tropomyosin. *J. Cell Sci.* 109: 2299- 2310.

Weber A., Pennise C.R., Babcock G.G., Fowler V.M. (1994): Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 127 (6): 1627-1635.

Weber A. (1999): Actin binding proteins that change extent and rate of actin monomer- polymer distribution by different mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* 190: 67- 74.

WHO- Arbeitsgruppe zur Echinokokkose (1997): Richtlinien zur Behandlung der zystischen und alveolären Echinokokkose beim Menschen. *Chemotherapie Journal* 6.Jahrgang 3: 111- 119.

Wilson J.F., Rausch R.L. (1980): Alveolar hydatid disease. A review of clinical features of 33 indigenous cases of *Echinococcus multilocularis* infection in Alaskan Eskimos. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 1340- 1355.

Wilson J.F., Rausch R.L., McMahon B.J., Schantz P.M. (1992): Parasitocidal effect of chemotherapy in alveolar hydatid disease: review of experience with mebendazole and albendazole in Alaskan Eskimos. *Clin Infect Disease* 15 (2): 234- 249.

Woo M.K., Fowler V.M. (1994): Identification and characterization of tropomodulin and tropomyosin in the adult rat lens. *J. Cell Science* 107: 1359- 1367.

Zhao S., Molnar G., Zhang J., Zheng L., Averboukh L., Pardee A.B. (1998): 3'- end cDNA pool suitable for differential display from a small number of cells. *BioTechniques* 24: 842- 852.

Zhang J.S., Duncan E.L., Chang A.C., Reddel, R.R. (1998): Differential display of mRNA. *Mol. Biotechnol.* 10 (2): 155- 165.

Zot A.S., Potter J.D. (1987): Structural aspects of troponin- tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16: 535-559.

7 Anhang

7.1 Genfragmente aus Differential Display-Versuch

7.1.1 AAxR24GA, T14AAxR24TC

```

CCCTTAAATAAGGTTTTTCCTTCTTCTCCTACGCCTCTTTTAGCAAACCTCGTCCTTTT 60
          . . . . .
          L L L P T P L L A N F V L F
TTATTTCGCCTCCTTTTAAAGTTTTCACGTCTTATTATCGTCGTGTTGTGGAACCTTCTTAAG 120
          . . . . .
          Y S P P K F S R L I I V V L W N F L S
TAAAGGTTAAATTTTCTGTGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA 157
          . . . . .
          K G *

```

Homologien im GenomeNet BLAST2 Server zu:

ArtM (*Pasteurella multocida*)

Identisch: 15/34 (44%), Positiv: 18/34 (52%)

```

Query:      20      LLLPTPLLANFVLFYSPPFKFSRLIIVVLWNFLS 121
              L  TPLL  F L Y+ P +F  L+  LW  LS
Sbjct:      55      LFTGTPLLVQFFLIYAGPGQFEWLVDLSALWPLLS 88

```

7.1.2 T14AAxR24GA

```

TTTAAACAAAAAGCACACCGTGCTATCTCCATACCCTCACTCGCCCATCCATCCATTCAC 60
          . . . . .
          K S T P C Y L H T L T R P S I H S
ATACTCCTCTTTCTACCCCACTACATCCCCCATTNAACGTCTGACGCCCGCCCAAC 120
          . . . . .
          H T P L S T
AAGGTCCTACTTCCCTCAATCGCACCTGCCTCTGCTTTGTGTCGCTTGAGCCCATGT 180
          . . . . .
          TTTTGATTGTACACATGTTCTGTTCTCACGAGGTGTGTGTAATATGAGCCTGATGATGT 240
          . . . . .
          GTTAAAAAAAAAAAAAAAAA 257

```

Homologien zu:

Cbfa1/Osf2 Transkriptionsfaktor isoform-3 (*Mus musculus*)

Identisch: 15/23 (65%), positiv: 17/23 (65%)

```

Query:      8      KSTPCYLHTLTRPSIHSTPLST 76
              +S P YL  LT PSIHS TPLS+
Sbjct:     146     QSYPSYLSQLTSPSIHSTPLSS 168

```

7.1.3 T14AAxR24GC

```

CGCTATGCACACGAGTCGCGTGCAGCCTATCAAGCTGGCCAGGGTAACCAAAGTGCTGGG 60
  M H T S R V Q P I K L A R V T K V L G
CAGAACCGGTTCGCAGGGCAGTGCACGCAGGTGCGTGTGGAATTTATGGATGACACCAG 120
  R T G S Q G Q C T Q V R V E F M D D T S
CCGCTCTATCATCCGAAACGTCAAAGGCCAGTTAGAGAGGGCGATGTGCTCACCCCTATT 180
  R S I I R N V K G P V R E G D V
GGAGTCAGAAAGAGAAGCTCGGAGGTTGCGCTGATCTTGCTGGGTCCTGGATATCCACCA 240
CTTGACTCATGGGATCACCTGCAACTGTAAATAAAGCATATTGTTTTAAAAAAAAAAAAA 300
AA 302

```

Homologie zu:

Ribosomales Protein S28 (Cricetulus griseus)

Identisch : 54/55 (98%), Positiv : 54/55 (98%)

```

Query:5 MHTSRVQPIKLARVTKVLGRTGSQGQCTQVRVEFMDDTSRSIIRNVKGPVREGDV 169
      M TSRVQPIKLARVTKVLGRTGSQGQCTQVRVEFMDDTSRSIIRNVKGPVREGDV
Sbjct:1 MDTSRVQPIKLARVTKVLGRTGSQGQCTQVRVEFMDDTSRSIIRNVKGPVREGDV 55

```

7.1.4 T14AAxR24TG

```

GAGCGCCTCACTCTGAAGCAGACTNKGAGGCAAGCCTCACCTTCCAAGGGGCTCCTCCT 60
CTGCTCTGCACCAGCCAGCCCTAGGGACCTCCCTGAGTAAACCTCTCACGCCACTAGGCA 120
GCTTTGTAACCGCCCTGAAGCCCCTCTCAAGNCTTGACCAAGCAAAAATAAAGCTTTTT 180
AAAACAGCAAAAAAAAAAAAAA 201

```

Homologie zu:

Catechol 1,2-Dioxygenase (Rhodococcus erythropolis)

Identisch: 9/16 (56%), positiv: 12/16 (75%)

```

Query: 89 GP.GWLVQSRGGAPWK 42
      GP GW ++S GG PW+
Sbjct: 206 GPTGWFIESHGHPWR 221

```

7.1.5 T14AAxR24CA

```

CTCCTCAGTTCCCAAGAGTTAGCGGGATGAAAATGTCTTCCCCGTGATTGTTTTTCATTC 60
  • R S S F T K G T I T K M E K K E
TTTCTTCTCGGCATCTGGGCGTGCACGGTTGAGCACCTTAAGGAAGTCAGATGTTTTTCGC 120
A D P R A R N L V K L F D S T K A R M R
TCGCATTTCGTGTGTGAATATAGGCCTTAGAGCACTTGATGTGGTAGTGCAGATAGTCCCG 180
T H I Y A K S C K I H Y H L Y D R F T H
GAACGTGTGGATCTGC 196
I

```

Homologie zu:

ARP 2/3 Komplex 34kDa subunit (P34-ARC) (Actin-related protein)

Identisch: 57/57 (100%)

Query: 192 IHTFRDYLHYHIKCSKAYIHTRMRAKTSDFLKVLRARPDAAEKEMKTITGKTFSSR 248
 IHTFRDYLHYHIKCSKAYIHTRMRAKTSDFLKVLRARPDAAEKEMKTITGKTFSSR
 Sbjct: 189 IHTFRDYLHYHIKCSKAYIHTRMRAKTSDFLKVLRARPDAAEKEMKTITGKTFSSR 245

7.1.6 T14CGxR24AA

```

TATCATCCAGGTTACTTTGGGAAAAGTTGGTATGAGGCATTACCACTTAAAGAGGAATCAG 60
Y H P G Y F G K V G M R H Y H L K R N Q
AGCTTCTGCCAACCGTCAACCTGGATAAATTGTGGACACTGGTCAGTGAGCAGACACGG 120
S F C P T V N L D K L W T L V S E Q T R
CTCAATGCTGCAAAAAACAAGACTGGGGCTGCTCCCATCATTGATGTTGTGCGATCGGGC 180
L N A A K N K T G A A P I I D V V R S G
TATTACAAAGTTCTGGGGAAGGGCAAGCTCCCTAAGCAGCCTGTCATCGTGAAGGCCAAA 240
Y Y K V L G K G K L P K Q P V I V K A K
TTCTTCAGCAGAAGAGCTGAAGAGAAGATTAAGGGTGTGGGAGGTGCCTGTGTCTCGGTG 300
F F S R R A E E K I K G V G G A C V L V
GCATAAAGCCTGCCAGGGAGGTTAATTAAATGCTAACATTTTCCACGAAAAAAAAAAAAAA 361
A *

```

Homologie zu:

Unbekanntes ORF (Bos Taurus)

Identisch: 102/111 (91%), Positiv: 105/111 (93%)

Query: 1 YHPGYFGKVGMRHYHLKRNQSFCTVNLDKLTWTLVSEQTRLNAAKNKTG
 YHPGYFGKVGMRHYHLKRNQSFCTVNLDKLTWTLVSEQTR+NAAKNKTG
 Sbjct: 55 YHPGYFGKVGMRHYHLKRNQSFCTVNLDKLTWTLVSEQTRVNAAKNKTG
 Query: AAPIIDVVRSGYYKVLGKGLPKQPVIKAKFFSRRAEKIKGVGGACV

Sbjct: AAPIIDVVRSGYYKVLGKGKLPKQPVIVKAKFFSRRAEKIKGVGGACV
 AAPIIDVVRSGYYKVLGKGKLPKQPVIVKAKFFSRRAEKIKGVGGACV

Query: LVA.SLPGRLIKC 133
 L + G+ IKC
 Sbjct: LWLEANAGKFIKC 165

7.1.7 T14GAxR24AA

GCACAAAGCACTGCAAGGATGATAAGGGCAAACTAGCAAAAGCAAGCGCTGCACTAGCA 60
 CCAAACGAAAAGAATCGCATTGCAAGCCACGTGCCACAGCTCAAGACGATAGGGGCTTG 120
 AATAATGATGGCACTCGAGGCGCACGAAGTCTACCGGAGTTAATGCTCACTTCCCTGTTG 180
 V R P A R L R G S N I S V E R N
 ACAAGTTCAGCCATCCACTTTCAAATAATTTTCTGCCTTTCAACAATTGTTTTAGGATAT 240
 V E R N V L E A M W K * I I K Q R E V I
 GTTTTTCGAGTTGGCATTAAACCTTTTGGTCAAAAAAAAAAAAAA 285
 T K P Y T K R

Homologie zu:

F11P17.17 Gen Produkt (*Arabidopsis thaliana*)

Identisch: 16/39 (41%), Positiv: 23/39 (58%)

Query: 248 RKTYPKTIVERQKII.KWMAELVNREVSINSGRLRAPRV 132
 RK ++ERQK I + A +R+VS++ G RAP V
 Sbjct: 848 RKRIENLVMERQKRIAERSAMTASRKVSLDKGSSRAPLV 886

7.1.8 T14GAxR24TT

CCTCCTCGTTCCTTCTCACCCCTCTGCTGTCCTGTGTAGTGATTTGGTGAGAGAAAGTATG 60
 L L S C V V I W * E K V C
 CTTTTGTCCCCTGCCCTCTGCACCACATATGTGTTTCAAGTTTTATTATTGCAATAAAAG 120
 F C P L P S A P H M C
 TGCTTTATGCTGGCTTTTCTCAAAAAAAAAAAAAA 154

Homologie zu:

K1 Glykoprotein (Humanes Herpesvirus 8)

Identisch: 11/24 (45%), Positiv: 16/24 (65%)

Query: 23 LLSCVVIW.EKVCFCPLPSAPHMC 94
 +L C+V+W K+ LPS PH+C
 Sbjct: 5 ILCCLVVWFPKLLSLHLPSFPHLC 28

7.2 Chromosomale Sequenz von *emto*

CTGGTTGATGCGCTTATTTGTTTTAAACATAACCAAATTCCTAAGTAACATAACCAAATT 60
 CTTAAGTAACACATTCGTTGGTCATGAGTGTGGTGCCGGTTTCTTCCATCTGTTATTCCA 120
 TAAATCAATATGGAGTAGTTTTGCATAGAGCTGACATAGTATTTTTATTTGCTTTATCTT 180
 GGACTACATTTTCAAAATAGTCAGTTCATCATTTGAACTTTTTATGCCTTCTAATCGTA 240
 TGCTGAAATTTAGTGTTCCTGAAAAGTTTGTTCGAAATGTTTTGGTATCGCTTTCTTGTA 300
 GGTAGGGTCATTTGTTATGTATCAGTTTTGGTATGCACTTCCATTGCCCAATTTTTCGGG 360
 GCTATTTTGTAATAAGATGATTGTTAAGAAAGTGGTTTCTTTAAATCCACCGTAGTGTTT 420
 GTAGCAAATGGTTTTGGGAATCAATTGTATGGGTTATTTGTTATTTTCGCTCCGTATGC 480
 TGCGAATTTTGACTCTATGCCATTTGTATTTTCGAATGTAATTTAATGAGACAACAAATA 540
 TTGTAATTGTAGAAATATGTCTAACAAGACGCTGTTTCGGTAAATCGCTGGACAAATACGAT 600
TCGAATATTGACGACATAGATGACCTACTTTTCGAAGCTGACGGAGGCGGAGATTAAGGAA 660
TTGAACGACGATATCGACCCGGACAACCTCGCTTCTCCCGCCTTCTCAACGCTGCCGCGAT 720
 CAGACTACGAAGGCGCCAACCTGGGCCCTTCAATCGCGAAAATCTCATCAAGTGGGCTCAA 780
 TAATTCCTTTTCCTTAGGCATAATATTTCAAAGCATAATTGAAAGAAAACCTGCTTTTCT 840
 TGTTAGCAGGTCATGCGAATCAAGCGATGGACTTGACATTTTCTGAAGTATTTGGGGACT 900
 GTCCATAGTCTTGTCATTTCAAAGCAAATTATGACCCCTGTAAATACTCACGCCATAA 960
 ATCGGAAGTATTTGGCTGAAAAGATTATGAAATAAATTACCCGTGACCACTTACCATTTG 1020
 CAATAATGTGGAGCGGTTGCGCATGTAGATTTTGTACGTTAACTGACTATCACGCAGCCT 1080
 ATTTACATTTTTGTCCACCACGTTGTGAGTCGCACGTAGTAGTGCTTGGACTTCGCTATT 1140
 CTCGTGGCTTTCTTTTGACTAGTAAGACTTCGTCCAGAACCTTCAAAGAGAGCTCGCGCG 1200
 GATTATTTCTGATTATTACCTCTGCAAATATTGGGTTTCAAATCAATTTCAAACCACTGT 1260
 TTTTTGGATTATCAATTATTCAGTAGCCATTGTTGTGGATTTTTAATTTACAGTTCAAC 1320
 TTCAAGTAGTCTTTTCGATTTCGTGGTTCGTGGGCAGTATCCTTGTTTAGTTACTTCTTTATC 1380
 TTCTTCCAGATTCTTTGTAGAAAAGGCAAAGAATGATCCAGACTGGGATGAAGCAGTTCC 1440
CTACGAGAAGAAGATTTCGTGGTAAGGTCTTTGAAAAGAAGAAGGTCGAACCGGTGGCGGG 1500
 GAGAAAAACGAGCTCTCTGAATTGGGCTTTGATGTAGAATTTGATGAAAGCATCAACGAG 1560

GCCTTGACAATGCTACAGACGACGAACTTATCGATTTGGCAGCCATCCTGGGTTTCACG 1620
GGCATGATGAATCAGGTGCAGTTCCACGCCAGTATCGAGAACCAGGGTTCAGGTGGGTGGC 1680
GGCTTTCTTGGTGTGCAAGGCTGAACAGCTCAAAATTGTGCCCGATGAGCCTCCCAAT 1740
ATGACTGATGTTGAGGTACGTTTATGCCTATCTTCGCTTGCCTTCACCTTGATCAGGAATT 1800
GGATGGCCAATGTTGGGGCGGACTTGTGACGGGTCACTGGCACCACAACCATTTAGAGG 1860
TTGAAGTTTTGAAAACCGTTTGCTTTGAGGGCTACGAATGCGAGCCGGGAGACTGGCTGC 1920
TTAAAGAGGGCTTCAGCAGGCAGTAGTATAGCCGTGCAATCAAATACACGAGATATTATT 1980
TTGCTATGCAGCCCCTGCTATGTTTCGGTAGATTTAGCCGTCCACTTTGGAGGCCCTCCT 2040
TTTTTACTTTTAAGCATGATGTCTAGTGAGATACGTACTTTGACGAGTTTAGCTGATCTG 2100
GTGGTAATGAAAAGTCGAGATCCTCTCGTGAGAGAATTAATTTGAGGAGCCTGTTACTCT 2160
TGGGATGTACGACCGAAGGAACATAATGTTGTGTGATGTGTTGCAATTTTAGGAGAGCATT 2220
AAGAAGCTCGCAGCGGACGACGCATCGTTAACGGTGTGAATCTGAACAACATTAATGT 2280
CTCGGCCAGAGGTGGTGTGCGCTCTATTACGGCGCTGGGCGAGAACACAAAGCTGCAT 2340
GAGCTCCACATGGCCGGGACGAACCTCACTTCGGCCATGGTGGAGCCTCTCCTCCTTCCA 2400
CTCAAGGTCAACCATACTTTGGAGGTCTCAATCTTGAATCGAACTTCATTACTGGTGAG 2460
TGCTGGCGCTTTTCACTCTCCGTCTCGCCATTTGGATTTCATCTGTCCCTCCCATCATTTCCA 2520
CCTATTCACTCAGCTTTGTATTAGTCTTTTGGCAGTATCTATCAATTTTTTTTATCATTC 2580
CTATTCTTAGCCATCCATTCCTCTCCGTCCCTTGAAGGAGAGATTTGTGCCATCTTT 2640
AAACTTATTCAAGGGCCACTTTCTCCTTCATTCATGCAATCATCTCGCATCCATCGACG 2700
CCTGACATTGATCCACCTTTCTCTCTCACCTGCACCTCCTACTATTTCATTTGTTTCATT 2760
TCGCATCCACTTATCCGCCTATCAATTCATCTACGTGTCTCCGAACTCCTCCCTCGTTTC 2820
TAACGTATCCCGTCCCTATGTTTATTTATCCATCCCTGATCCACTCATCCACCCATTCGC 2880
TCCAGATCCATTCATTGATCTCAGGTCCGCCTATTCGGTTATGTACCTCGATCGACCTG 2940
TCGATTCTCCATCTATTGATCACCNAAGTTTTTATTTTTTCCATTAAAGTCAAAAA 3000
TTCATCCACCCCTGATATATTCCTCTATCCACAAGTTTGCTACCCCATTTGTGATCTCCCC 3060

```

AAACGTCTATTCCCTCTATCAGTTCATTCGGATTTGATCAAACCTTGTCGGTCCCTCATCA 3120
      .      .      .      .      .
ATCTGTCCACATCAGATCCACCTGTGATCCGTCCATCCTTCTCTTATTCTATTCATCCAT 3180
      .      .      .      .      .
TCTTGACCCAACCAACCTTTGTCGACCAAAATTATCTTCCATACATTGGCCAATTCCCTTA 3240
      .      .      .      .      .
GCACATGTTTCGTTCTTGAGATCTCCCCAAACGTCTTATTCCTGTTATCAGTTCATTCGGA 3300
      .      .      .      .      .
TTTGATCAAACCTTGTCGGTCCCTCAATCAATCTGTCCACATCAGATCCGCCTGTGATCC 3360
      .      .      .      .      .
GTCCATCCTTCTCTTATTCTATTCATCCATTCTTGACCCAACCAACCTTTGTCGACCAAA 3420
      .      .      .      .      .
ATTATCTTCCATACATTGGCCAATTCCTTAGCACATGTTTCGTTCTTGATTCCCACACTTC 3480
      .      .      .      .      .
ATTTCTCCTATAGGCGACATGATTTTAAAGATTTTGGACTCTATTTCCGGACTCAAAGAGC 3540
      .      .      .      .      .
GCCGTAAAAGACCTTCGACTGGCCAATCAGCGCCAACGCGTGCTCGGTGTGCAGGTGGAG 3600
      .      .      .      .      .
GAGCAGATTGCCAAACTGGTGCAGAAATCCACGACTCAGCAACCTCAGTCTGTACTTC 3660
      .      .      .      .      .
GACACACCGTATGCGCGTGTCAAATCAACGAGCACCTGAAGAAGACCGTAGACGCCAAT 3720
      .      .      .      .      .
AAACGGCTTGCCCGTGCAATAAGGGTGCCTAG 3753

```

Abb.22: **Vollständige chromosomale Sequenz von *emto*** mit dem nichtcodierenden 5'- Ende (bp 1- 555), den vier Exons (fettgedruckt) sowie den drei Introns. Das ATG- Start- sowie das TAG- Stopcodon sind unterstrichen. Die Spliced- Leader- Acceptor- Sequenz ist hinterlegt.

8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AE	Alveoläre Echinokokkose
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindedomäne
Blot	Transfer von DNA, RNA oder Proteinen auf eine Membran
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CE	Cystische Echinokokkose
C- Terminus	Carboxy- Terminus
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DD	Differential Display
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC- ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser mit Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	N/ N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Mischung der Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>emto</i>	<i>echinococcus multilocularis tropomodulin-</i> Gen
<i>emty</i>	<i>echinococcus multilocularis tropomyosin-</i> Gen
<i>elp</i>	<i>erm- like protein-</i> Gen
erm	ezrin/ radixin/ moesin
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
GITC	Guanidiumthiocyanat
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- 1- thio β- D- galaktosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	milli
M	molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MOPS	3- (N- Morpholino) Propansulfonsäure

mRNA	<i>messenger- RNA</i>
n	nano
N- Terminus	Amino- Terminus
OD _{xxx}	optische Dichte bei _{xxx} nm
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
<i>ori</i>	Replikationsstartpunkt (<i>origin of replication</i>)
P	Protoskolex
PAA	Poly- Acryl- Amid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase- Ketten- Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
Primer	Oligonukleotid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>spdo</i>	<i>sanpodo</i>
Tab	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TMOD	Tropomodulin
Tris	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan
<i>UAS</i>	<i>Upstream activation sequence</i>
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
WHO	World Health Organisation
X- Gal	5- Bromo- 4- Chloro- 3- Indolyl- β- D- Galaktopyranosid
Z	Zyste

Danksagung

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

Dr. K. Brehm danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und seine ausgesprochen fachkundige und tatkräftige Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Dr. K. Hubert bin ich zu großem Dank verpflichtet für ihre intensive Unterstützung bei der Durchführung der Two- Hybrid- Versuche.

Für die äußerst angenehme Zusammenarbeit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Echinokokken- Arbeitsgruppe. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Antje Kroner, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Lebenslauf

Name: Heidi Beland
Geburtstag: 28.03.1976
Geburtsort: Coburg
Familienstand: ledig

1986- 1995: Friedrich-Rückert-Gymnasium Ebern
1995: Allgemeine Hochschulreife
1995- 2002: Studium der Humanmedizin
an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1997: Ärztliche Vorprüfung
1998: Erstes Staatsexamen
2001: Zweites Staatsexamen
2002: Drittes Staatsexamen

Würzburg, Juli 2002