

**Isolierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse von
TGF β -Signaltransduktionskomponenten des Fuchsbandwurms
*Echinococcus multilocularis***

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

vorgelegt von
Ricardo Zavala Góngora
aus Poza Rica/Mexiko

Würzburg, November 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Frosch

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Diese Arbeit hat bisher in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsverfahren mit dem Ziel der Erlangung eines akademischen Grades vorgelegen, auch in anderen Fakultäten erfolgte noch keine vollständige oder teilweise Vorlegung.

Ich erkläre hiermit, dass ich 1993 an der Universität von Tuxpan, Mexiko den in Deutschland dem akademischen Grad des Diplom-Biologen äquivalenten Abschluss erreicht habe.

Würzburg, den 20.11.2005

Ricardo Zavala Góngora

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Echinococcus multilocularis</i>	1
1.1.1	Phylogenie	1
1.1.2	Der Lebenszyklus von <i>E. multilocularis</i>	2
1.1.3	Epidemiologie und Krankheitsbild der Alveolären Echinokokkose	2
1.1.4	Molekularbiologische Erkenntnisse über <i>Echinococcus multilocularis</i>	4
1.1.5	<i>In vitro</i> -Kultur von <i>E. multilocularis</i>	4
1.2	TGFβ-Zytokine und TGFβ-Signaling	5
1.2.1	Die TGF β Rezeptoren	5
1.2.1.1	Strukturmerkmal der Typ I Rezeptoren	8
	<ul style="list-style-type: none"> • Die Extrazellulärdomäne • Die Transmembrandomäne • Die zytoplasmatische Domäne 	
1.2.2	FKBP12: ein Regulator des TGF β Signaling	10
1.2.3	Die Smad Proteinfamilie: zytoplasmatische TGF β Signaltransduktoren	10
1.1.1.1	Die Smad Subfamilien	11
1.2.3.1	Strukturmerkmale der Smads	11
1.2.3.2	SARA als positiver Regulator der TGF β Signale	13
1.2.3.3	Die R-Smad Phosphorylierungsstelle	13
1.2.4	Transforming growth factor β activated kinase 1 (TAK1)	13
1.2.5	TGF β Signaling und Erkrankungen des Menschen	14
1.2.6	TGF β Komponenten in Helminthen	15
1.1.1.1	TGF β -Signaling bei Helminthen	16

2	Ziel und Fragestellung der Arbeit	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	Geräte	18
3.1.2	Chemikalien	18
3.1.3	Oligonukleotide	19
1.1.1.1	Primer zur Synthese des cDNA Erststranges	19
3.1.3.1	Vektorenprimer	19
3.1.3.2	Degenerative Primer	20
3.1.3.3	Konstrukte und verwendete Primer	20
3.1.4	Enzyme	22
3.1.5	Wachstumsfaktoren	22
3.1.6	Antikörper	22
3.1.7	Expressionsvektoren	23
3.1.8	Bakterienstämme	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Techniken zur Arbeiten mit <i>E. multilocularis</i>	25
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	26
1.1.1.1	RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen	26
3.2.2.1	Qiagen Rneasy Mini Kit Protokoll	26
3.2.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA	26
3.2.2.3	Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	27
3.2.2.4	DNA-Gelelektrophorese	29
3.2.2.5	TOPO TA Cloning [®]	30
3.2.2.6	Plasmid-DNA-Amplifikation in einer LB-Flüssigkultur	31
3.2.2.7	Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien	32
3.2.2.8	DNA-Sequenzierung	34

3.2.2.9	Restriktionsverdau	35
3.2.2.10	Gelextraktion	36
3.2.2.11	Transformation von kompetenten Bakterien	36
3.2.2.12	Mutagenese	38
3.2.2.13	Konstruktion einer Chimären-DNA	39
3.2.2.14	Amplifikation von TGF β -Faktoren-Sequenzen aus <i>E. multilocularis</i> über degenerative PCRs	41
3.2.2.15	Yeast Two Hybrid System	42
3.2.2.15.1	Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3	45
3.2.2.15.2	Hefe-Transformation	45
3.2.2.15.3	Detektion der exprimierten Fusionsproteine	46
3.2.2.15.4	Interaktionsstudien in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109	46
3.2.3	Zellbiologische Methoden	47
3.2.4	Proteinchemische Methoden	52
4.	Ergebnisse	55
4.1.	Smads: die zytoplasmatischen TGFβ Signal Transduktoren	55
4.1.1.	Klonierung und Charakterisierung der cDNA von <i>emsmadB</i> und <i>emsmadC</i>	55
4.1.2.	EmSmadB: cDNA und Aminosäurequenz	56
4.1.3.	EmSmadC: cDNA- und Aminosäurequenz	58
4.1.4.	Strukturelle Charakterisierung von EmSmadB und EmSmadC	60
4.1.4.1.	EmSmadB - Homologien	60
4.1.4.2.	EmSmadC - Homologien	60
4.1.5.	Strukturelle Charakterisierung von EmSmadB und EmSmadC	61
4.1.5.1.	Die Phosphorylierungsstelle	61
4.1.5.2.	Der L3-Loop	62
4.1.5.3.	Strukturelemente für die Bindung an SARA (Smad Anchoring for Receptor Activation)	63

4.1.5.4.	Das nukleäre Export- (NES) und Lokalisierungssignal (NLS)	63
4.1.6.	Charakterisierung der chromosomalen Loci von <i>emsmadB</i> und <i>emsmadC</i>	64
4.1.7.	Nachweis der Parasiten-Spezifität der identifizierten Smad-Faktoren	66
4.1.8.	Analyse der Expression von <i>emsmadB</i> und <i>emsmadC</i> in verschiedenen Isolaten von <i>E. multilocularis</i>	67
4.1.9.	Analyse der Expression der <i>emsmad</i> -Gene in zwei verschiedenen <i>E. multilocularis</i> Larvenstadien	67
4.1.10.	Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen der <i>Echinococcus</i> -Smad-Faktoren	68
4.1.10.1.	Herstellung der EmSmad-Konstrukte in den pGBKT7 und pGADT7 Vektoren und Durchführung der Yeast Two Hybrid-Experimente	69
4.1.10.2.	Die verschiedenen Oligomierzustände der EmSmads	71
4.1.10.3.	Interaktionsfähigkeit der MH2 Domänen der EmSmad-Faktoren	72
4.1.10.4.	Die aktivierungsabhängige Interaktion der EmSmads	73
4.1.11.	Phosphorylierung von <i>Echinococcus</i> EmSmadA und EmSmadB durch Säuger- TGF β - und BMP-Rezeptoren	75
4.1.12.	Phosphorylierung von <i>Echinococcus multilocularis</i> EmSmadC	77
4.1.12.1.	Der Activin Typ IIb Rezeptor (ActRIIb) interagiert mit der konstitutiv aktivierten Form des TGF β Typ I-Rezeptors (TRI-ka) zur Bildung eines aktiven Komplexes	79
4.1.12.2.	Der Activin Typ IIb Rezeptor (ActRIIb) interagiert mit der konstitutiv aktivierten Form des BMP Typ I-Rezeptors (BRIa-ka) zur Bildung eines aktiven Komplexes	80
4.2.	Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von Rezeptoren der TGFβ- Superfamilie aus <i>E. multilocularis</i>	83
4.2.1.	Identifizierung von TGF β Rezeptoren mittels degenerativer PCR	84
4.2.2.	Charakterisierung des EmRSK2 Rezeptors der TGF β Superfamilie aus <i>E. multilocularis</i>	85
4.2.3.	Charakterisierung vom EmRSK3 Rezeptor der TGF β Superfamilie aus <i>E. multilocularis</i>	88
4.2.4.	EmRSK2 und EmRSK3 zeigen hohe Homologien zu TGF β - und Activin- Rezeptoren aus Säugern	90
4.2.5.	Strukturelle Merkmale von EmRSK2 und EmRSK3	91

4.2.5.1.	Analyse des extrazellulären Abschnittes	91
4.2.5.2.	Analyse der Transmembrandomäne von EmRSK2 und EmRSK3	93
4.2.5.3.	Analyse der intrazellulären Domäne von EmRSK2 und EmRSK3	93
4.2.5.3.1.	Die GS-Domäne und die GS-Box	94
4.2.5.3.2.	Das Leucin/Prolin (LP)-Motiv: Bindungsstelle für das Immunophilin FKBP12	94
4.2.5.3.3.	Die Serin/Threonin -Kinase-Domäne	95
4.2.5.3.4.	Der Ser/Thr-Kinase Konsensus	96
4.2.5.3.5.	Der Loop L45 bestimmt die Spezifität der Smad-Interaktion	96
4.2.6.	Funktionsanalyse des in <i>Echinococcus multilocularis</i> identifizierten TGFβ-Rezeptors EmRSK1	97
4.2.6.1.	Klonierung von <i>emrsk1</i> zur Erstellung der Konstrukte	97
4.2.6.2.	EmRSK1-EmSmad-Interaktionsstudien mittels Yeast Two Hybrid	99
4.2.6.3.	Funktionsanalyse von EmRSK1 in Säugerzellen	100
4.2.6.3.1.	EmRSK1 benötigt zur Aktivierung einen Typ II-Rezeptor der TGFβ/BMP-Familie	101
4.2.6.3.2.	Humanes BMP2 aktiviert EmRSK1 in Anwesenheit von BRII	102
4.2.6.3.3.	Untersuchungen zum Einfluss einer Q-D-Mutation auf EmRSK1	104
4.2.6.4.	Untersuchung der EmRSK1-Kinase-Aktivität mit Hilfe von Rezeptor-Chimären	107
4.2.6.4.1.	Untersuchung der Kinase Aktivität der Chimären QEmRSK1-ka und QEmRSK1-ka-SG (in Abwesenheit eines Typ II-Rezeptors)	110
4.2.6.4.2.	Untersuchung der Kinaseaktivität der Chimäre QEmRSK1-ka-SG in Anwesenheit eines Typ II-Rezeptors	111
4.2.6.4.3.	QEmRSK1-ka-FIA mit dem BR II-Rezeptor	113
4.2.6.4.4.	Die Kinase-Domäne in der Chimäre QEmRSK1-ka-SG phosphoryliert EmSmadB	113
4.2.6.4.5.	Zusammenfassung der Chimärenexperimente	115
4.2.7.	Untersuchung einzelner Mutationen auf die Kinase-Aktivität des EmRSK1ka Rezeptors	115
4.2.8.	Untersuchung der Funktion des Leucin-Zipper-Motivs in EmRSK1 (EmRSK1ØLZ-ka)	118
4.2.8.1.	Herstellung eines EmRSK1ka mit C-terminaler Deletion	118

4.2.9.	Veränderung des LP Motivs im humanen BRIaka beeinflusst die Kinase-Aktivität.	119
4.2.9.1.	Mutation L ₂₂₂ -K des Motives L ₂₂₂ PLL im humanen BRIaka (BRIaKP)	120
4.2.10.	QEmRSK1SG-ka aktiviert den BMP-Signaltransduktionsweg in C2C12 Zellen	121
4.2.10.1.	Die Expression von QEmRSK1SG-ka induziert das Reporterogen in einem Luciferase Assay	121
4.3.	Klonierung und Charakterisierung von EmBMP, einem BMP-kodierenden Faktor aus <i>E. multilocularis</i>	124
4.3.1.	Klonierung und Charakterisierung der <i>embmp</i> -Spleiß-Varianten	124
4.3.2.	Der chromosomale Locus von <i>embmp</i>	129
4.3.3.	Expressionsanalyse von <i>embmp</i> in 2 verschiedenen <i>E. multilocularis</i> Larvenstadien	130
4.3.4.	Strukturmerkmale von EmBMP	131
4.4.	Klonierung und Charakterisierung der cDNA für ein „TGFβ Activated Kinase“ (TAK) -Homologes aus <i>E. multilocularis</i> (EmTAK1)	132
4.4.1.	Klonierung und Charakterisierung der <i>emtak1</i> -cDNA	132
4.4.2.	Strukturelle Merkmale von EmTAK1	134
4.4.3.	Charakterisierung des chromosomalen <i>emtak1</i> Locus	135
4.4.4.	Nachweis der Parasiten-Spezifität von <i>emtak1</i>	136
4.4.5.	Analyse der Expression von <i>emtak1</i> in zwei verschiedenen <i>E. multilocularis</i> -Larvenstadien	136
4.4.6.	TAK Interaktionsuntersuchungen mittels Yeast Two Hybrid	137

5.	Diskussion	139
5.1.	Das TGF β -Signaltransduktionssystem in <i>E. multilocularis</i>	139
5.2.	<i>Echinococcus</i> Smads als TGF β /Activin- und BMP-Signaltransduktoren	139
5.3.	<i>Echinococcus</i> TGF β aktivierte Kinase (TAK1)	143
5.4.	<i>Echinococcus multilocularis</i> TGF β Typ I Rezeptoren	144
5.4.1.	Der Leucin-Zipper in den <i>Echinococcus</i> Ser/Thr Kinasen	149
5.5.	Wachstumsfaktor der Bone Morphogenetic Protein (BMP) Familie in <i>E. multilocularis</i>	151
5.6.	Die wichtige Frage nach einem TGF β Typ II Rezeptor aus <i>E. multilocularis</i>	153
5.7.	<i>Echinococcus</i> Smads und humane Rezeptoren	154
5.7.1.	Das L ₂₂₂ PLL Motiv im humanen BR1a-ka	155
6.1	Zusammenfassung	156
6.2	Summary	158
7.	Literaturverzeichnis	160
8.	Anhang	172
8.1	Abkürzungen	172
8.2	Genomische DNA-Sequenzen	174
8.2.1	EmSmadB	174
8.2.2	EmSmadC	174
8.2.3	EmRSK2	176
8.2.4	EmBMP	177
8.2.5	EmTAK1	177

1. Einleitung

1.1 *Echinococcus multilocularis*

Der Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* ist der Erreger der alveolären Echinokokkose (AE), einer der gefährlichsten und tödlichsten Krankheiten, die von Parasiten verursacht werden (Craig, 2003).

1.1.1 Phylogenie

Phylogenetisch gehört *E. multilocularis* dem Genus *Echinococcus* an. Die Echinokokken sind der Klasse der Zestoden (Bandwürmer) angehörig. Die Zestoden werden dem Stamm der *Plathelminthes* (Plattwürmer) zugeordnet (Thompson, 1995). Eine genauere Klassifikation ist unten tabellarisch aufgeführt.

Phylum: *Plathelminthes*

Klasse: *Cestodes*

Unterklasse: *Eucestoda*

Ordnung: *Cyclophyllidea*

Familie: *Taeniidae*

Gattung: *Echinococcus*

Art: *Echinococcus multilocularis*

Neben *E. multilocularis* zählen noch drei weitere Bandwurmerarten zur Gattung *Echinococcus*: *E. granulosus*, *E. vogeli* und *E. oligarthus*. *E. vogeli* und *E. oligarthus* sind Erreger der Polyzystischen Echinokokkose, welche in der Humanmedizin von untergeordneter Bedeutung ist. Diese Bandwürmer sind aufgrund ihres engen Wirts- und Zwischenwirtsspektrum (Wildtiere) hauptsächlich in Süd- und Mittelamerika verbreitet (Rausch et al., 1978, Thompson et al., 1995, Eckert & Deplazes, 2004). Von medizinisch signifikanter Bedeutung sind hingegen *E. multilocularis* und *E. granulosus*. *E. granulosus* ist der Erreger der Zystischen Echinokokkose. Mit dem Hund als Endwirt und domestizierten Nutztieren als Zwischenwirten zeigt er eine weltweite Verbreitung (Eckert und Deplazes, 2004). Als Erreger der Alveolären Echinokokkose ist der gefährlichste dieser Bandwürmer allerdings *E. multilocularis*.

1.1.2 Der Lebenszyklus von *E. multilocularis*

Der Lebenszyklus des *Echinococcus multilocularis* setzt sich aus verschiedenen Entwicklungsstadien in zwei unterschiedlichen Wirten zusammen, wobei der Fuchs (manchmal auch Hunde oder Katzen) Endwirt ist. Das Erwachsenenstadium durchläuft der *Echinococcus multilocularis* im Dünndarm des Fuchses, wo er sogenannte „infektiöse Eier“ bildet. Gemeinsam mit den Exkrementen scheidet der Fuchs die Bandwurmeier aus und verteilt sie so in der Umgebung. Dabei werden auch essbare Pflanzen und Waldfrüchte kontaminiert, die auf Bodenniveau wachsen.

Zwischenwirte sind hauptsächlich kleine Nager, jedoch auch der Mensch. Beim Verspeisen kontaminierter Nahrung infiziert der Zwischenwirt sich mit den Eiern des Parasiten. Diese wiederum setzen nach ihrer Passage durch den Magen trakt die Onkosphären frei, welche dem ersten Larvenstadium des Parasiten entsprechen. Die Onkosphären penetrieren die Dünndarmwand und verteilen sich über den Blutstrom in die verschiedenen Organe, wobei hier die Leber bevorzugt besiedelt wird. Dort durchlaufen die Onkosphären eine Metamorphose zum zweiten Entwicklungsstadium durch und entwickeln sich zu Metazestoden. Diese sind durch flüssigkeitsgefüllte Vesikel gekennzeichnet, welche wachsen und proliferieren und dabei in das umliegende Gewebe einwachsen. In diesen Zysten findet die Entwicklung der Protoskolizes statt, dem dritten Entwicklungsstadium. Wenn der Zwischenwirt vom Endwirt gerissen wird, gelangen die Protoskolizes in den Dünndarm des Endwirtes, und der Lebenszyklus hat sich vollendet (Thompson, 1995).

1.1.3 Epidemiologie und Krankheitsbild der Alveolären Echinokokkose

Das Verbreitungsgebiet der AE ist auf die nördliche Hemisphäre beschränkt (s. Abb. 1). Dies beruht darauf, dass die Krankheit nur dort anzutreffen ist, wo der Fuchs als Endwirt des *E. multilocularis* seinen natürlichen Lebensraum hat. Hier sind vor allem Nordamerika, Mitteleuropa und Eurasien zu nennen (Craig P 2003). In diesen Gebieten wird die AE als gefährlichste Parasiteninfektion eingeschätzt (Brehm et al., 1999).

1. Einleitung

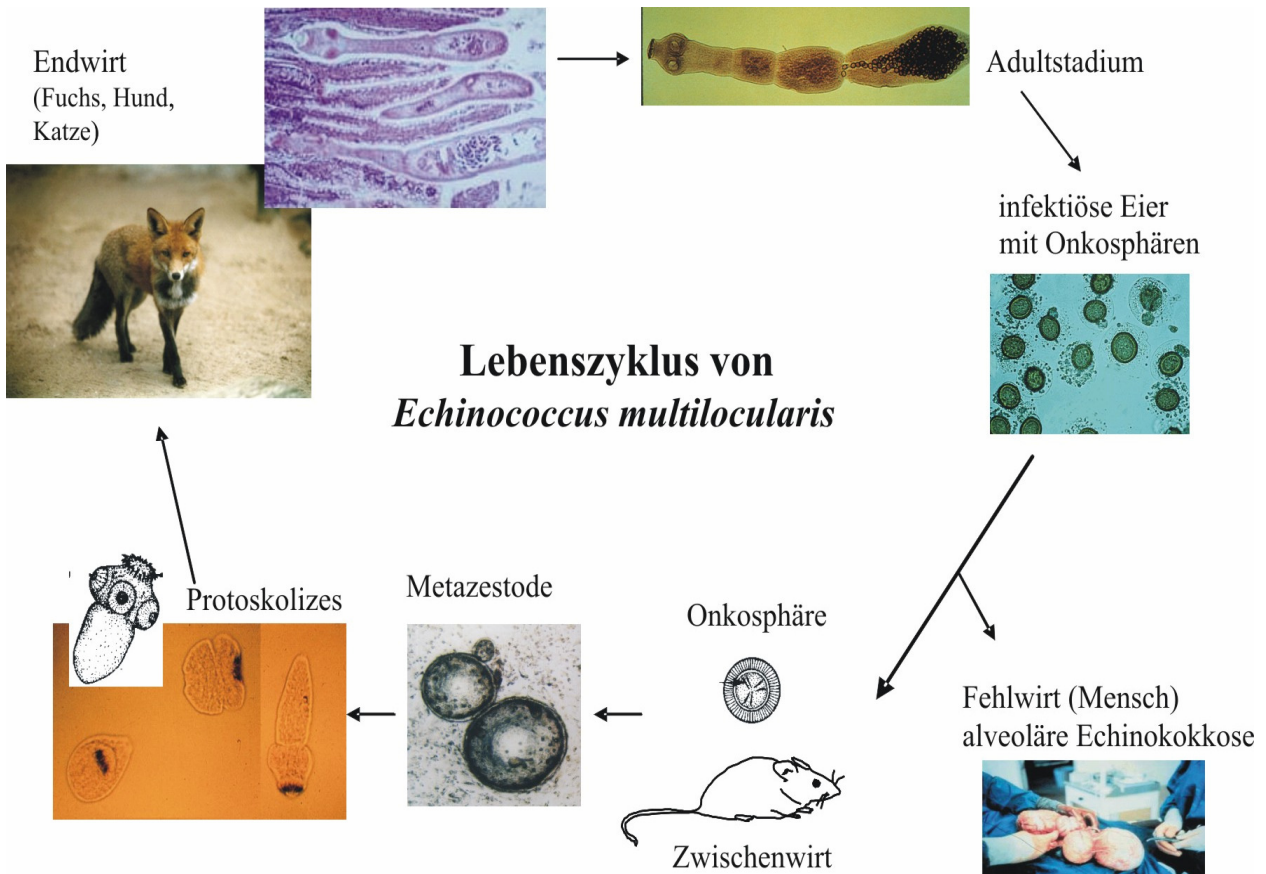


Abbildung 1. Lebenszyklus des *E. multilocularis*. Die Adulten Bandwürmer leben im Dünndarm der Füchse; die Eier werden mit dem Kot freigesetzt. Nach ihrer oralen Aufnahme schlüpft die Onkosphäre, und gelangt über den Blutkreislauf in die Leber; hier entwickeln sich die Metazestoden. Nach einigen Monaten entwickeln sich die Protoskolizes, die sich nach oraler Aufnahme durch den Endwirt zum Adultwurm entwickeln.

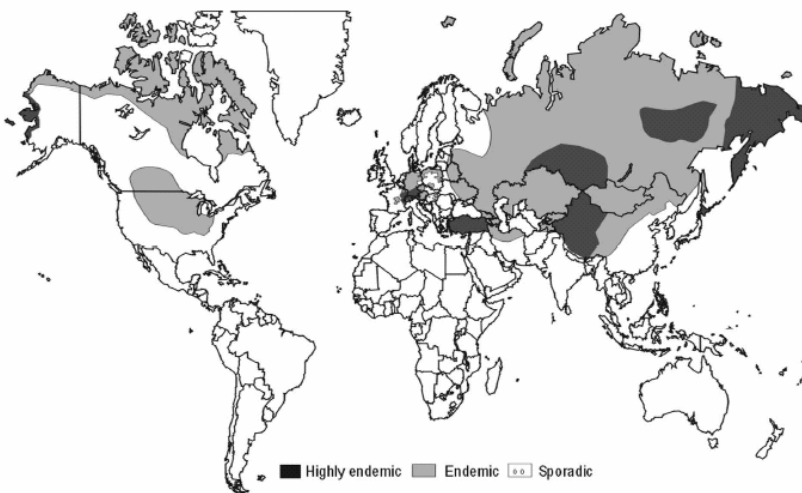


Abbildung 2: Verbreitungsgebiet von *E. multilocularis* (Eckert & Deplazes, 2004).

Die AE präsentiert sich klinisch durch Abdominalschmerzen, Gelbsucht und Hepatomegalie. Manchmal ist sie auch von Fieber, Anämie und Gewichtsverlust begleitet (Eckert und Deplazes, 2004). Die AE wird über bildgebende Verfahren (Ultraschall, CT, NMR) und immunologische Methoden (ELISA, PCR) diagnostiziert. Befindet sich die AE in einem frühen Infektionsstadium mit begrenzter Organinfiltration ist manchmal eine radikale Resektion des Parasitengewebes noch möglich. Eine lebenslange medikamentöse Behandlung mit helminthostatischen Benzimidazolen ist notwendig. Limitierend sind dabei die starken Nebenwirkungen dieser Behandlung.

1.1.4 Molekularbiologische Erkenntnisse über *Echinococcus multilocularis*

Während es schon seit längerer Zeit epidemiologische und diagnostische Daten über *E. multilocularis* in der Literatur gibt, wurden erste molekularbiologische Aspekte des Parasiten erst relativ spät publiziert. Beim Screening von cDNA-Bibliotheken aus *E. multilocularis* mit Patientenserum konnten einige cDNA Klone identifiziert werden, die nützliche Antigene für die Serodiagnostik von AE exprimierten (Vogel et al., 1988; Hemmings et al., 1989, 1990; Frosch et al., 1991, 1992; Hubert, 2004). Eines dieser Antigene war das immundominante Elp-Protein (Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)-like Protein) (Frosch et al., 1991). 1999 wurde das zugehörige *elp*-Gen charakterisiert (Brehm et al., 1999); Die Identifizierung des Trans-Spleiß-Mechanismus bei *E. multilocularis* (Brehm et al., 2000) brachten weitere molekularbiologische Erkenntnisse. Vor kurzem konnten weitere Echinokokken-Faktoren vollständig charakterisiert werden wie z. B. das β -Tubulin Gen (Brehm et al., 2000), sowie Faktoren des EGF- (Spiliotis et al., 2003), Insulin- (Konrad et al., 2003) und TGF β -signaling (Zavala-Góngora et al., 2003).

1.1.5 *in vitro* Kultur des *E. multilocularis*

Da der Lebenszyklus von *Echinococcus multilocularis* sehr komplex ist, ist eine *in vitro* Kultivierung nicht einfach. Zunächst wurden *in vitro* Systemkulturen etabliert, bei denen es für das Wachstum des Parasiten eine Ko-Kultivierung mit Wirtszellen bedurfte (Hemphill und Gottstein, 1995; Jura et al. 1996). Das legte nahe, dass das Wachstum und die Differenzierung von *Echinococcus multilocularis* direkt von vom Wirt produzierten Wachstums- und Entwicklungsfaktoren beeinflusst werden (Jura H et al., 1996). Spiliotis et al. gelang es, ein weiteres Kultivierungsmodell einzuführen, bei dem es unter axenischen Bedingungen, d.h. ohne eine Ko-

Kultivierung mit Wirtszellen, zum Wachstum der Metazestoden kam. Allerdings ist in diesem System der Einsatz von konditioniertem Medium erforderlich, welches zuvor mit Hepatozyten kultiviert wurde (Spiliotis et al., 2004). Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Wirtsfaktoren für das Wachstum des Parasiten.

1.2 TGF β -Zytokine und TGF β -Signaling

Die TGF β Superfamilie enthält eine große Zahl von Wachstumsfaktoren, die strukturell ähnlich sind, und kontrolliert eine Vielzahl von Funktionen wie z. B. Zellwachstum, -entwicklung, -differenzierung, die Regulation der Immunantwort und Apoptose.

Aufgrund struktureller Eigenschaften wurden die Faktoren der TGF β Superfamilie in Subfamilien gruppiert. Dazu gehören unter anderem die Transforming Growth Factor β -Familie (TGF β), die Bone Morphogenetic Protein Familie (BMP), die Activine, die Anti-Müller-Hormone und auch der Growth and Differentiation Factor (GDF) (Piek et al., 1999; Lutz & Knaus, 2002; Shi & Massague, 2003; Nohe et al., 2004; de Caestecker, 2004).

Die Zytokine der TGF β Superfamilie werden von den meisten Zellen als ein Proteinkomplex sezerniert. Der Komplex besteht aus dem aktiven 25 kDa großen TGF β -Homodimer und zwei Pro-Segmenten, die das „Latency associated Peptid“ (LAP) bilden. Andere Zellen wie z.B. Thrombozyten sezernieren TGF β im Komplex mit dem „Latent TGF β Binding Protein“ (LTBP), das an eines der LAP-Segmente gebunden ist.

LAP und LTBP schützen das aktive TGF β vor einem Abbau (Halbwertszeit im Plasma beträgt nur einige Minuten) und vor „unkontrollierten“ Interaktionen mit seinen Rezeptoren. Die Tatsache, dass die Aktivierung des TGF β zuerst am Zielort stattfindet, vermeidet eine Aktivierung von unspezifischen Zellen, die auch TGF β Rezeptoren exprimieren (Massague, 1998; Piek et al., 1999).

1.2.1 Die TGF β Rezeptoren

Die Zytokine der TGF β Superfamilie übertragen ihre Signale mittels zwei verschiedener transmembraner Serin/Threonin Kinase Rezeptoren, die so genannten Typ I und Typ II Rezeptoren. Ein Komplex aus beiden Rezeptoren ist für die Signalübertragung notwendig (Piek et al., 1999; Lutz & Knaus, 2002; Shi & Massague, 2003; Nohe et al., 2004; de Caestecker, 2004).

Rezeptoren der TGF β Superfamilie wurden schon in zahlreichen Species von den Cnidariern (Samuel G. et al., 2001), Schwämmen (Suga et al., 1999), *C. elegans* (Georgi et al., 1990) *D. melanogaster* (Penton et al., 1994) bis zu den Säugern identifiziert.

Als genauere Kenntnisse über die Funktion der verschiedenen Typ I Rezeptoren noch nicht vorlagen, wurden diese mit einer neutralen Nomenklatur als ALK (Activin Receptor Like Kinase) bezeichnet (ten Dijke et al., 1994). So gibt es bei den Vertebraten die Rezeptoren Alk1-7. Sobald aber die jeweils physiologischen Liganden identifiziert waren, wurden für diese Rezeptoren deskriptive Namen vergeben. Der TGF β Typ I Rezeptor, der am Anfang Alk5 genannt wurde, wurde wegen seiner TGF β Bindungsfähigkeit nun als TRI β bezeichnet; ALK4 als Activin Typ I Rezeptor wurde ActRIb genannt; BRIa und BRIb (zuvor als Alk3 und Alk6 bekannt) sind BMP Typ I Rezeptoren. Alk7 und Alk1 binden TGF β Faktoren und ActRIa (Alk2) bindet Activin und BMP.

Tabelle 1 – Nomenklatur der Typ I Rezeptoren der TGF β -Superfamilie bei Vertebraten

ALK1	-	TGF β Rezeptor
ALK2	ActRIa	BMP Rezeptor
ALK3	BRIa	BMP Rezeptor
ALK4	ActRIb	Activin Rezeptor
ALK5	TRI β	TGF β Rezeptor
ALK6	BRIb	BMP Rezeptor
ALK7	-	TGF β Rezeptor

Aufgrund ihrer Kinasedomäne (L45 Loop) und Signalübertragungsaktivität werden die Vertebraten Typ I Rezeptoren in 3 Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe enthält Alk4, Alk5 und Alk7; die zweite Gruppe Alk3 und Alk6 und die dritte Alk1 und Alk2.

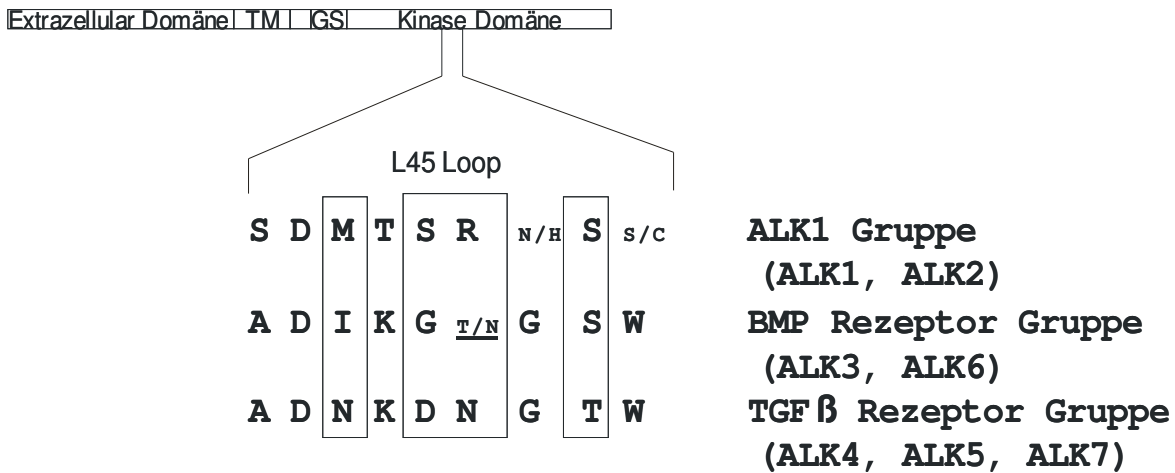


Abbildung 3 – Subgruppierung der Typ I Rezeptoren aufgrund des L45 Loop der Kinasedomäne

Bisher sind 5 verschiedene Typ II Rezeptoren identifiziert: TβRII bindet TGβ, Activin RIIa und Activin RIIb binden Activin, BRII bindet BMP und AMHR bindet das Anti-Müller-Hormone.

Der TGFβ Typ II Rezeptor besitzt eine konstitutive Kinase Aktivität und bindet mit hoher Affinität den Liganden. Nach der Bindung des Liganden an den Typ II Rezeptor wird der Typ I Rezeptor rekrutiert und phosphoryliert. Der aktive Hetero-Tetramer-Komplex besteht aus 2 Typ I Rezeptoren und 2 Typ II Rezeptoren (Kirsch et al., 2000; Qin et al., 2002).

Das Signal wird von zytoplasmatischen Smad Proteinen bis zum Zellkern übertragen. Im Zellkern interagieren die aktivierten Smad Proteine mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren/Repressoren), um bestimmte Gene an- bzw. auszuschalten (Moustakas et al., 2001), was Abbildung 4 veranschaulicht.

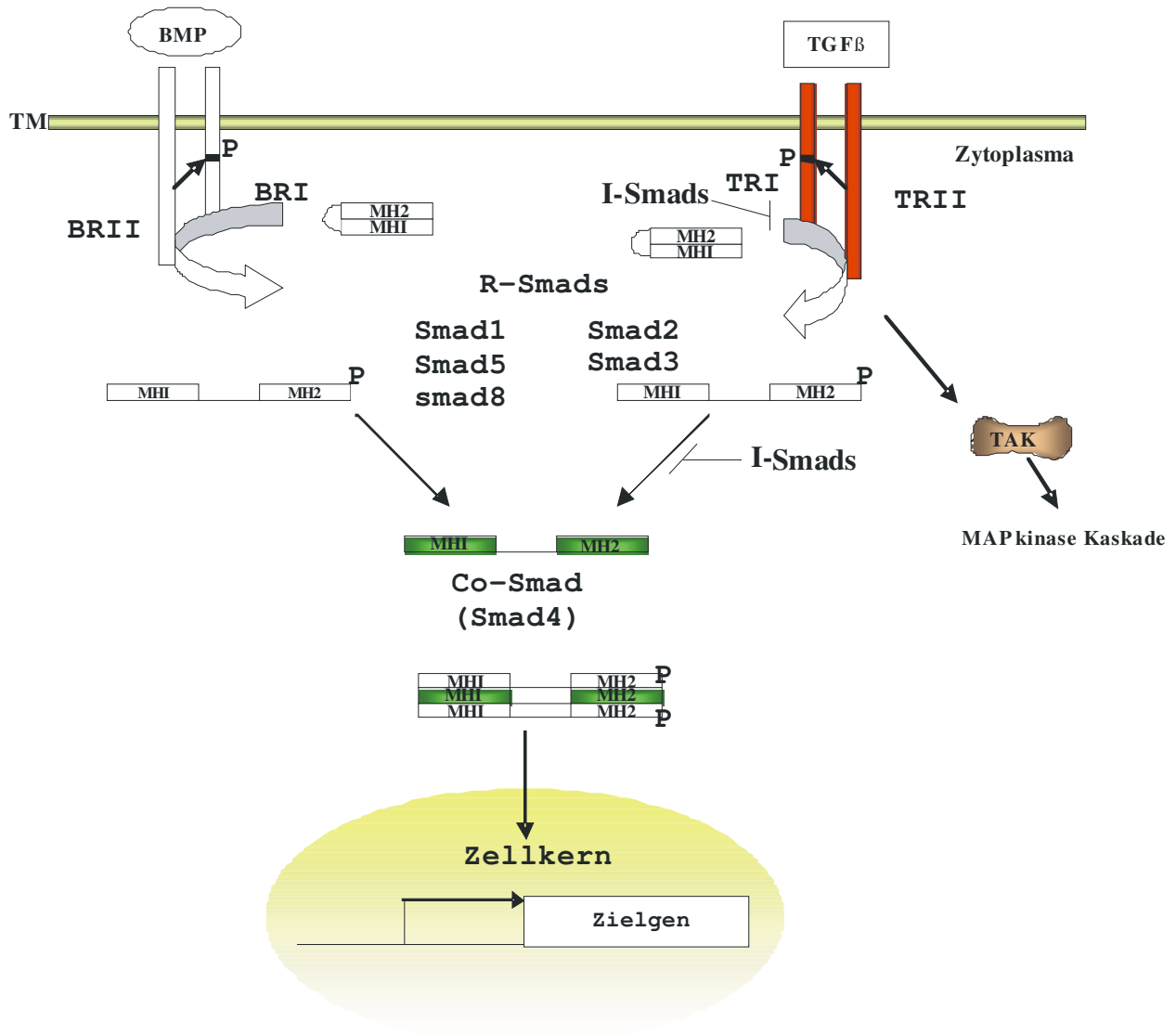


Abbildung 4 – Signaltransduktionskaskade der TGFβ Superfamilie. Die Abbildung zeigt das Zusammenspiel von Liganden, Rezeptoren und Effektorproteinen bei der TGFβ- bzw. BMP-Signaltransduktionskaskade.

1.2.1.1 Strukturmerkmale der Typ I Rezeptoren

Typischerweise bestehen die Typ I Rezeptoren der TGFβ Superfamilie aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne. Typ I Rezeptoren weisen ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa auf und bestehen aus ca. 500 Aminosäuren inklusive Signalpeptid.

- **Die Extrazellulärdomäne**

Die Extrazellulärregion ist mit ca. 150 Aminosäuren relativ kurz. Sie ist N-glykosyliert und enthält 10 oder mehr Cysteine, welche die Struktur dieser Region determinieren können. Drei der Cysteine bilden einen charakteristischen Knoten in der Nähe der Transmembranregion. Er wird als Cystein Box ($CC_{x_{4,5}}CN$) bezeichnet. Die Extrazellulärdomäne ist bei den Typ I Rezeptoren konservierter als bei den Typ II Rezeptoren (Derynck & Feng, 1997). Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung des Liganden. Dabei ist es bei der Subfamilie der TGF β -Rezeptoren so, dass der Ligand mit hoher Affinität an den Typ II Rezeptor bindet. Hierdurch wird eine Heteromer-Komplex-Bildung mit dem Typ I Rezeptor induziert. Bei der Subfamilie der BMP-Rezeptoren hingegen bindet der Ligand mit höchster Affinität an den Typ I Rezeptor, was wiederum eine Heteromer-Komplex-Bildung mit dem Typ II Rezeptor bewirkt (Liu et al., 1995; Rosenzweig et al., 1995).

- **Die Transmembrandomäne**

Das 22 Aminosäuren lange Fragment, welches die extrazelluläre mit der intrazellulären Domäne verbindet, wird als Transmembrandomäne bezeichnet. Sie dient der Verankerung des Rezeptors in der zellulären Membran. Zhu et al schlagen zudem eine wichtige Rolle der Transmembrandomäne bei der Aktivierung der TGF β Rezeptoren vor (Zhu et al., 1999).

- **Die zytoplasmatische Domäne**

Die zytoplasmatische Domäne kann in zwei Abschnitte unterteilt werden: Erstens die so genannte GS-Domäne, die typisch für die Typ I Rezeptoren ist, sich aber nicht bei den Typ II Rezeptoren findet. Zweitens die Serin/Threonin Kinase-Domäne, die fast den gesamten zytoplasmatischen Teil umfasst.

Die GS Domäne

Die GS-Domäne ist eine konservierte Region von ca. 30 Aminosäuren Länge, die die Aktivierung der Typ I Rezeptoren reguliert. Sie liegt direkt upstream der Ser/Thr-Kinase-Domäne. In der GS-Domäne ist ein Abschnitt von 3 aufeinanderfolgenden Serin/Glycin-Aminosäuren (SGSGSG) auffällig, welcher als GS-Box bezeichnet wird. Die GS-Box gilt als Charakteristikum der Superfamilie der TGF β Typ I-Rezeptoren. Die GS-Domäne dient als Phosphorylierungsstelle zur Aktivierung der Typ I Rezeptoren (Wrana et al., 1994a, b; Ventura et al., 1994). Eine Mutation von zwei oder mehr Serin- oder Threonin-Resten im TGF β Typ I-Rezeptor-Motiv TTSGSGSG stört die Phosphorylierung und behindert somit die Signalweiterleitung (Wieser et al., 1995). Andererseits führt hier eine Mutation der Aminosäure Threonin₂₀₄ zu Aspartat (T₂₀₄-D) in der GS-Box zu einer vom Liganden und vom Typ II Rezeptor unabhängigen konstitutiven Aktivierung. Auch beim BMP

Typ I Rezeptor kann durch eine Austauschmutation in dieser Region eine konstitutive Aktivierung hervorgerufen werden. Allerdings wird hier Glutamin durch Aspartat ersetzt (Q-D Mutation).

1.2.2 FKBP12: ein Regulator des TGF β Signaling

Bei allen Säuger Typ I Rezeptoren folgt der GS-Box ein Leucin Prolin (LP) Motiv, welches als Bindungsstelle für das Immunophilin FKBP12 dient. FKBP12 ist ein 12 kDa großes Bindungsprotein für das Immunsuppressivum FK506. Es hat eine Rotamase-Funktion (cis-trans Peptidyl-Prolyl Isomerase) und ist somit an der Proteinstrukturierung beteiligt. Bei FKBP12 wurde ein negativ regulierender Einfluss auf das TGF β -Signaling beobachtet (Chen et al., 1997).

Die TGF β Typ I und Typ II Rezeptoren haben eine Affinität zueinander und gehen so miteinander trotz Abwesenheit eines Liganden eine Bindung zu einem heterooligomeren Komplex ein. Im Grundzustand bindet FKBP12 an das LP Motiv des Typ I Rezeptors (Chang et al., 1996; Chen et al., 1997) und verhindert somit eine spontane Phosphorylierung/Aktivierung des Typ I Rezeptors durch den Typ II Rezeptor bei Abwesenheit eines Liganden (Chen et al., 1997; Wang et al., 1996). Ist ein Ligand jedoch anwesend, so wird der Typ I Rezeptor durch den Typ II Rezeptor phosphoryliert. Dann trennt sich FKBP12 vom Typ I Rezeptor und die Signalübertragung kann beginnen.



Abbildung 5 – Proteinstruktur der FKBP12- und T β R-I-Interaktionspartner

1.2.3 Die Smad Proteinfamilie: zytoplasmatische TGF β Signaltransduktoren

Die Proteine der Smad Familie sind die ersten identifizierten Substrate für die TGF β Typ I Rezeptoren. Sie wurden zuerst in *Drosophila* (Mad Proteine) (Sekelsky, 1995) und *C. elegans* (Sma Proteine) identifiziert. Der Name Smad entstand durch eine Fusion von „Mad“ (mothers against decapentaplegic) und „Sma“ (small body size) (Savage et al., 1996).

Die Smad Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung der von den Rezeptoren an der Membran produzierten Signale bis zum Zielgen im Zellkern. Bisher wurden bei den Vertebraten 8 verschiedene Smad Proteine identifiziert (Attisano & Wrana, 2002).

1.2.3.1 Die Smad Subfamilien

Aufgrund ihrer Struktur und Funktion werden die Smads in drei Gruppen eingeteilt: die R-Smads (Smad1, 2, 3, 5 und 8) interagieren direkt mit den Typ I Rezeptoren und werden phosphoryliert und aktiviert. Aufgrund ihrer Spezifität unterteilen sich die R-Smads in AR-Smads (z.B. Smad2 und Smad3) und BR-Smads (z.B. Smad1, Smad5 und Smad8). Die AR-Smads übertragen die TGF β - und Activin-Signale (Eppert et al., 1996; Zhang et al., 1996; Macias-Silva et al., 1996). Die BR-Smads übertragen die durch BMP induzierten Signale (Hoodless et al., 1996).

Einmal aktiviert translozieren die R-Smads zum Zellkern. Auf diesem Weg interagieren die R-Smads mit der zweiten Smad-Gruppe, den Co-Smads (Smad4). Dieser Komplex bindet entweder selbst an der DNA oder nach Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, um eine Transkriptionsantwort hervorzurufen.

Die dritte Gruppe wird durch die I-Smads (Smad6/7) gebildet. Diese hemmen das TGF β Signal, wobei Smad6 hauptsächlich nur das BMP- Signale und Smad7 sowohl das TGF β - als auch das BMP Signale hemmt (Hayashi et al 1997; Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997). Abbildung 3 stellt die Funktion der verschiedenen Smads bei der Signaltransduktion dar.

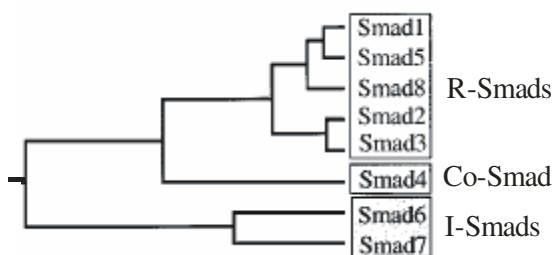


Abbildung 6 – Die Säuger Smad-Familie (Piek et al 1999).

1.2.3.2 Strukturmerkmale der Smads

Die Smad Proteine bestehen aus zwei hoch konservierten Domänen: der N-terminalen MH1 (Mad homolog 1) -Domäne und der C-terminalen MH2 Domäne. Beide Domänen sind durch eine variable, Prolinreiche Region, dem „Linker“, verbunden.

1. Einleitung

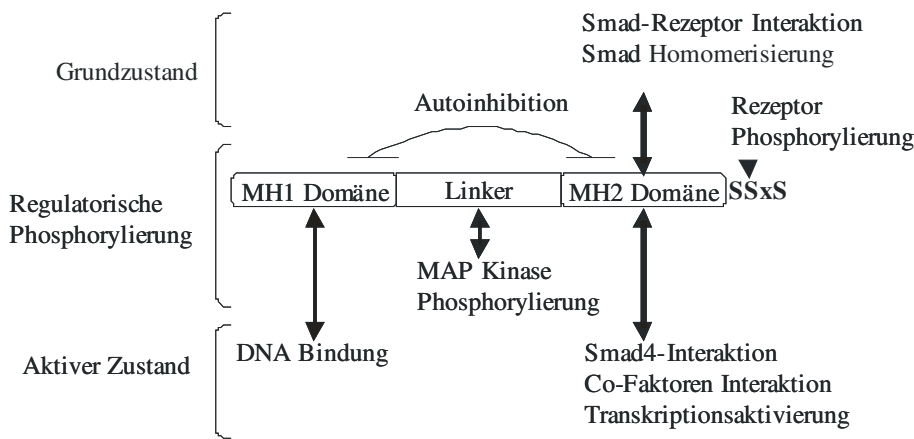


Abbildung 7 – Schematische Darstellung der verschiedenen Regionen/Domänen der Smad-Proteine mit den jeweiligen Funktionen im Grund- und aktiven Zustand.

Die aminoternale Region der I-Smads ist nicht konserviert. Deshalb sagt man, dass die I-Smads keine MH1-Domäne besitzen. Im Grundzustand aller anderen Smads bindet die MH1-Domäne an der MH2-Domäne und hemmt ihre biologische und transkriptionelle Aktivität. Im aktivierten Zustand hat die MH1-Domäne eine DNA-Bindungs-Funktion (Kim et al., 1997). Die MH1-Domäne enthält das nukleäre Lokalisierungssignal (NLS) (Xiao et al., 2001).

Die „Linker“-Region ist nicht konserviert und hat eine variable Länge. In der „Linker“-Region der R-Smads befinden sich MAP-Kinase-Phosphorylierungsstellen (Kretschmar et al., 1997). Nach Aktivierung der MAP-Kinase phosphoryliert diese die Phosphorylierungsstellen der „Linker“-Region. Daraus resultiert eine Inhibition der Translokation der Smads zum Zellkern, die TGF β -Signaltransduktion wird gehemmt.

Die MH2-Domäne ermöglicht Protein-Protein-Interaktionen und beteiligt sich an der Homo- und Heterooligomer-Bildung. Über die MH2-Domäne findet die Interaktion zwischen R-Smads und den Typ I Rezeptoren statt. Die Spezifität der Interaktion zwischen den R-Smads und den Rezeptoren wird durch den L3 Loop, einer 18 Aminosäure langen Region in der MH2-Domäne, und durch den L45 Loop, der sich im intrazellulären Teil des Typ I Rezeptors befindet, bestimmt (Feng & Derynck, 1997; Lo et al., 1998;).

Anhand des Sequenzmusters des L3 Loops kann man die R-Smads in zwei Untergruppen einteilen: Die AR-Smads (Smad2/3), die mit TGF β und Activin Rezeptoren interagieren und die BR-Smads (Smad1, 5 und 8), die mit den BMP Rezeptoren interagieren.

Die MH2-Domäne enthält auch ein nukleäres Exportsignal (NES), das aus mehreren nicht-polaren Aminosäuren in charakteristischer Anordnung besteht.

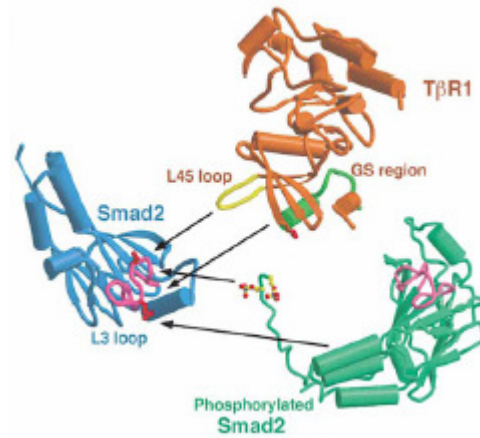


Abbildung 8 – Proteinstruktur von TβR1 und Smad2. Hervorgehoben sind die für die Interaktion der L45 Loop bei TβR1 und der L3 Loop bei Smad 2 (Wu et al., 2001).

1.2.3.3 SARA als positiver Regulator der TGFβ Signale

Eine für die Interaktion der AR-Smads mit den Typ I Rezeptoren wichtige Rolle spielt das Protein SARA (smad anchor for receptor activation). Es interagiert mit der MH2 Domäne der nicht phosphorylierten AR-Smads, nicht aber mit der MH2 Domäne der BR-Smads. Mit seiner carboxyterminalen Domäne kann SARA den aktivierten TGFβ Rezeptor- Komplex binden. Auf diese Weise ermöglicht SARA die Interaktion der AR-Smads mit den aktivierten TGFβ Rezeptoren und beeinflusst somit positiv das TGFβ Signal (Tsukazaki et al., 1998).

1.2.3.4 Die R-Smad Phosphorylierungsstelle

Nach der Liganden-Bindung werden die R-Smads Serin-phosphoryliert (Hoodless et al., 1996; Macias-Silva et al., 1996; Eppert et al., 1996; Lagna et al., 1996; Zhang et al., 1996). Als Phosphorylierungsstelle für die aktivierten TGFβ Rezeptoren dient dabei das Motiv SS(V/M)S am C-terminalen Ende der R-Smads (Kretschmar et al., 1997; Macias-Silva et al., 1996). Allerdings findet man diese Phosphorylierungsstelle weder bei den I-Smads noch bei den Co-Smads.

1.2.4 Transforming growth factor activated kinase 1 (TAK1)

Die TGFβ-Faktoren können nicht nur den kanonischen Signalübertragungsweg über die Smad-Proteine eingehen, sondern auch die von der Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)

bestimmten Signalwege aktivieren. Der MAP Kinasen-Signalübertragungsweg setzt sich grundsätzlich aus 3 Proteinkinasen zusammen: MAPKKK (mitogen activated protein kinase kinase kinase), MAPKK (mitogen activated protein kinase kinase) und MAPK (mitogen activated protein kinase); Im ersten Schritt phosphoryliert und aktiviert eine MAPKKK eine MAPKK. Diese phosphoryliert und aktiviert dann eine MAPK (Nishida & Gotoh, 1993; Blumer & Johnson, 1994; Marshall, 1995).

Die TGF β Aktivierte Kinase 1 (TAK1) war die erste identifizierte MAPKKK, die über das TGF β - und BMP-Signalübertragungssystem aktiviert wird (Yamaguchi et al., 1995). TAK1 kann auch von Interleukin 1- (IL-1), von Tumor Nekrose Factor α - (TNF α) und von Toll Like- Rezeptoren reguliert werden (Holtmann et al., 2001; Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Sakurai et al., 1999; Takaesu et al., 2000; Irie et al., 2000). Viele Downstream-Effekte von TAK1 involvieren die „Stress Activated Protein Kinasen“ (SAPKs) wie zum Beispiel JNK und p38. Dabei aktiviert TAK1 die SAPKs über die MAPKKs inklusive MKK6, MKK3 (p38; Moriguchi et al., 1996; Shirakabe et al., 1997), MKK4 und MKK7 (JNK; Yamaguchi et al., 1995).

1.2.5 TGF β Signaling und Erkrankungen des Menschen

Das TGF β Signaling hat eine tragende Rolle bei der Regulierung des zellulären Wachstums. Eine Störung dieser Signalkaskade geht also mit einem gestörten Zellwachstum einher. So konnte in verschiedenen humanen Neoplasien ein gestörtes TGF β Signaling nachgewiesen werden: Mutationen im Typ II Rezeptor fanden sich bei Magen- und Coloncancer, in T-Zell Lymphomen und Kopf- und Nacken-Karzinomen (Massague, 1998).

Smad4-Mutationen wurden beim humanen Pankreaskarzinom und kolorektalen Tumoren identifiziert (Massague, 1998). Beim Kolonkarzinom fanden sich auch Mutationen im Smad2.

Mutationen in GDF5 führen zu einer Fehlentwicklung von spezifischen Skelett-Komponenten (hereditary chondrodysplasia).

Mutationen im Alk1-Rezeptor oder seinem akzessorischen Protein Endoglin und führen zu der Krankheit der humanen hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie, einer epithelialen vaskulären Dysplasie, bei der es gehäuft zu nasalen und gastrointestinalen Schleimhautblutungen kommt.

1.2.6 TGF β Komponenten in Helminthen

Aufgrund ihres komplexen Lebenszyklus bedürfen die parasitären Helminthen bestimmter Entwicklungsmechanismen, die ein Überleben in unterschiedlichen Umgebungen ermöglichen. Diese Mechanismen regulieren das Wachstum und die Entwicklung des Parasiten in Abhängigkeit von den jeweiligen Umgebungsbedingungen und von den Wirtsfaktoren. Eine wichtige Überlebensstrategie für die parasitären Helminthen ist dabei, die Immunantwort des Wirtes herunterzuregulieren.

Auch bei den Helminthen konnten verschiedene Komponenten der TGF β Superfamilie identifiziert werden. So konnten Faktoren nachgewiesen werden, die eine hohe Homologie zu den Liganden der TGF β Familie aufweisen, z. B. BpTGH1 (*Brugia pahangi*), BmTGH1 und BmTGH2 (*Brugia malayi*).

Auch Rezeptoren der TGF β Superfamilie konnten in Helminthen identifiziert werden, z. B. die Typ I Rezeptoren der TGF β Familie von *C. elegans* (DAF-1 und SMA-6 (Georgi et al., 1990), *Brugia pahangi* (BpTRK1 (Gomez-Escobar et al., 1997) und *Schistosoma mansoni* (SmRK1 (Davis et al., 1998)). Typ II Rezeptoren konnten ebenfalls identifiziert werden, z.B. DAF-4 in *C. elegans* (Estevez et al., 1993) und vor kurzen auch SmRK2 in *S. mansoni* (Forrester et al., 2004).

Die deutliche Konservierung der TGF- β Signalfaktoren bei Helminthen und ihren Wirten könnte zu Kreuzinteraktionen während einer Infektion führen; d.h. Zytokine des Parasiten oder des Wirts könnten die entsprechenden Rezeptoren des anderen Partners aktivieren. Derartige Interaktionen könnten an Mechanismen der Immunmodulation durch Helminthen oder an Organtropismen innerhalb des Wirts beitragen.

So wurde beobachtet, dass der in *B. malayi* identifizierte Ligand BmTGH2 Säuger TGF β Rezeptoren stimulieren konnte (Gómez-Escobar et al., 2000). Umgekehrt konnte in einem Experiment auch beobachtet werden, dass humanes TGF β den in Säugerzellen exprimierten *S. mansoni* Rezeptor SmRK1 stimulieren konnte (Beall & Pearce, 2001). Es zeigte sich zudem, dass dieser Rezeptor auch an der Oberfläche des Parasiten exprimiert ist, so dass man vermuten kann, dass SmRK1 eine Rolle bei der Wahrnehmung von Wirtsfaktoren in *S. mansoni* spielt. Über diesen TGF β -Rezeptor könnten dann die Wirtsfaktoren das Parasiten-Wachstum und die Entwicklung beeinflussen.

1.2.6.1 TGF β -Signaling bei Helminthen

Der frei lebende, nicht parasitäre Wurm, *C. elegans* kann je nach Umgebungsbedingungen zwei verschiedene Entwicklungswege einschlagen: Bei günstigen Umgebungsbedingungen entwickelt er sich schnell zum reproduktiven Adultstadium, dem so genannten „non dauer“ Stadium; Bei ungünstigen Umgebungsbedingungen findet eine arretierte Entwicklung zum sogenannten „dauer“ Stadium statt: hier tritt der Wurm in ein alternatives drittes Larvenstadium ein, welches auf ein Überleben unter ungünstigen Umweltbedingungen spezialisiert ist (Cassada & Russell, 1975).

Die Bildung dieses alternativen „Dauer“-Larvenstadium in *C. elegans* wird von einem TGF β -ähnlichem System reguliert (Riddle & Albert, 1997; Padgett et al., 1998).

Bei bestimmten Umgebungsbedingungen wird DAF-7, ein TGF β ähnlicher Faktor, von den Neuronen des Wurmes produziert. DAF-7 bindet dann an DAF-1 und DAF-4 -Rezeptoren (s. o.) und initiiert eine Signalkaskade mit den Smadfaktoren DAF-8, DAF-14 und DAF-3, um die Entwicklung zum adulten Stadium zu einzuleiten.

In einer *in vitro* Analyse wiederum konnte gezeigt werden, dass Faktoren der TGF β Superfamilie einen Einfluss auf die Entwicklung der parasitären Nematode *Ancylostoma caninum* haben (Arasu et al., 2001).

Die *Ancylostoma caninum* L3 Larve befindet sich in einem Stadium der arretierten Entwicklung. Nach Eintritt in den Wirt tritt sie vermutlich, über Wirtsfaktoren vermittelt, in ein reproduktives Stadium über. So konnten Arasu et al. in *in vitro* Studien zeigen, dass sowohl humanes TGF β 1 als auch TGF β 2-Isoformen die Reaktivierung der Tissue-Arrest Larve hervorrufen. Auch durch Einsetzen von Hundeserum konnte eine ähnliche Aktivierung bewirkt werden. Dieser stimulierende Serumeffekt konnte wiederum durch eine Präinkubation des Serums mit Anti-TGF β -Antikörpern blockiert werden (Arasu et al., 2001).

2 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Die molekularen Mechanismen der Wirt-Parasit-Interaktion bei Helminthosen sind bislang weitgehend unverstanden. Genomische Untersuchungen an Helminthen zeigten in den letzten Jahren jedoch, dass diese Organismen ihren Säugerwirten auf molekularer Ebene nahe verwandt sind und mit diesen viele evolutionsgeschichtlich konservierte Signaltransduktionswege teilen.

Ob es während einer Helminthen-Infektion zu Kreuz-Interaktionen zwischen konservierten Zytokinen und entsprechenden Rezeptoren beider Partner kommen kann, ist eine der grundlegenden Fragen, deren Beantwortung mit dieser Arbeit in Angriff genommen werden sollte. Da sich bei vorhergehenden Untersuchungen zum Nematoden *Brugia malayi* und dem Trematoden *Schistosoma mansoni* bereits eine mögliche Rolle von TGF β -Signalmechanismen an hormoneller Kreuz-Kommunikation zwischen Parasit und Wirt ergeben hatten, wurden in dieser Arbeit entsprechende Mechanismen am Zestoden *Echinococcus multilocularis* untersucht.

Die Zytokine der TGF β -Superfamilie geben ihr Signal über zwei verschiedene, an der Zellmembran exprimierte Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren weiter. Die so aktivierten Rezeptoren phosphorylieren die zytoplasmatischen Smad-Proteine, die dann das Signal bis zum Zellkern weiterleiten und hier die Transkription von bestimmten Zielgenen beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von TGF β -Komponenten im Cestoden *Echinococcus multilocularis*. Es sollten die genauen Aktivierungsmechanismen der Rezeptoren und die verschiedenen möglichen Signalübertragungswegen in *Echinococcus multilocularis* genauer untersucht werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob Zytokine der TGF β -Familie aus Säugern in der Lage sind, entsprechende Rezeptoren des Parasiten zu stimulieren.

Die dadurch gewonnen Erkenntnisse über die Molekularbiologie von *Echinococcus multilocularis* und die mögliche Rolle der TGF β -Faktoren bei der Wirt-Parasit-Kommunikation sollten dazu beitragen, die Erkrankung der Echinokokkose besser zu verstehen. Dies könnte in Zukunft dazu beitragen, neue Behandlungsmöglichkeiten der bislang meist unheilbaren Erkrankung aufzudecken.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte sind hier tabellarisch aufgeführt.

Geräteart	Gerätename	Hersteller
PCR-Thermocycler	Trio-Thermoblock™	Biometra
Spektrophotometer	U-2000	Hitachi
Elektrophorese-Powersupply		
DNA-Elektrophorese-Apparatur		BioRad
Protein-Elektrophorese-Apparatur	-	BioRad
Tisch-Mikrozentrifuge	Centrifuge 5417C	Eppendorf
Zentrifuge	Sepatech Megafuge 1.0	Heraeus
Kühl-Zentrifuge	Beckman J2-21	Beckman
Inkubator	Heraeus 6000	Heraeus
Lichtmikroskop	Leitz DM IL	Leica
Fein-Waage	2001 MP2	Sartorius
Film-Entwicklermaschine	Caompact 35	Protec
Elisa-Reader	MR5000	Dynatech
Biacore-Messgerät	BIA2000	BIAcore
Scanner	Epson Perfection 2450	Epson
Heizblock	-	Liebisch
Sequenziergerät	ABI Prism™ Sequencer 377	Perkin Elmer

Tabelle 2 – verwendete Geräte.

3.1.2 Chemikalien

Lösungen und Puffer wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und entweder steril filtriert oder autoklaviert. Doppelt destilliertes Wasser wurde verwendet, um enzymatische Reaktionen durchzuführen. Bei Arbeiten mit RNA wurde RNase-freies Wasser verwendet.

Agarose NEEO

Aminosäuren, Antibiotika (Sigma, Deisenhofen)

Benchmark™ Prestained Protein Ladder (Life Technologies)

dNTPs lyophilisiert (Roth, Heidelberg)

ECL Chemiluminescence Kit (Amersham Buchler, Braunschweig)

Matchmaker Two Hybrid System 3 (Clontech, Heidelberg)

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

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

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

Titan One Tube RT-PCR System (Roche)

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

QuikChange[™] XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

3.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von ARK-SIGMA bezogen und in lyophilisiertem Zustand geliefert. Durch Lösung in ddH₂O wurden sie stets auf eine Endkonzentration von 50µM verdünnt. Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in 5'>3'-Richtung angegeben.

3.1.3.1 Primer zur Synthese des cDNA Erststranges

CD3RT: ATCTCTTGAAAGGATCCTGCAGGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVX

3.1.3.2 Vektorprimer

pCR2.1[®] TOPO:

M13 (forward): GTAAAACGACGGCCAGT

M13 (reverse): CAGGAAACAGCTATGACC

pGADT7:

T7-Sequencing Primer: TAATACGACTCACTATAGGGC

AD Sequencing Primer: AGATGGTGCACGATGCACAG

pGBKT7:

T7-Sequencing Primer: TAATACGACTCACTATAGGGC

BD Sequencing Primer: TAAGAGTCACTTTAAAATTTGTAT

3.1.3.3 Degenerative Primer

Degenerative Primer zur Amplifikation der Smads

N1: 5' CTC CCC CAY GTN ATH TAY TG
 C1: 5' TAG TGG TAN GGR TTD ATR CA
 N2: 5' GTT GAC GGN TTY ACN GAY CC
 C2: 5' GCA CCC CAN CCY TTN ACR AA

Degenerative Primer zur Amplifikation der Rezeptoren

TGRFIA: 5'- AACATCCTCGGXTTYATHGC
 TGRMAP: 5'- TCTAGTACYTCXGGXGCCAT

3.1.3.4 Konstrukte und verwendete Primer

Insert/Bemerkung	Vektoren	Primer
EmSmadA wt	AD	Dw: AGTTAATCGATTAATGTCCAATATTGCTCT Up: ATGTAGGATCCTTTAGCTGACAGAGGTGCA
EmSmadA wt	BD	Dw: AGTTACCATGGTAATGTCCAATATTGCTCT Up: ATGTAGGATCCTTTAGCTGACAGAGGTGCA
EmSmadB wt	AD/BD	Dw: GAATTCAGGCTGCTCGGTTGGAAGCAAGGTGAC Up: AAAGAGGATCCTCAGGAAACAGAAGAGATGGG
EmSmadC wt	AD/BD	Dw: GAATTCATGGGTCCCTCCTATCGC Up: GGATCCGTCTAGCTTACTGACGTGCATG
MH2 (EmSmadA)	AD/BD	Dw: GGCCATGGAGGCCTGGTGCTCTGTCTTCTACTACG
MH2 (EmSmadB)	AD/BD	Dw: GGCCATGGAGGCCTACCAAGAACCAAAGTACTGG
MH2 (EmSmadC)	AD/BD	Dw: GGCCATGGAGGCCTACCAAGAGCCAGACTGCTGGTGC
EmSmadA * (S-E Mut.)	BD	Up: GCTCGATGGATCCTTTACTCGACCTCGGTGCACGGAGTCGAGGG
EmSmadB * (S-E Mut.)	AD/BD	Up: GGATCCATCACTCAACCTCCTCGATGGGATTGCGTGGAGTGCCC
EmSmadC * (S-E Mut.)	AD	Up: GGATCCGTCTACTTACTTCCGTGCATGGATGGTTAGGAG
EmSmadA 3-3 (+VGG-3')	AD	Up: CAATGGGATCCTCCTACGCTGACAGAGGTGCACGGAGTCGAGGG
EmSmadB 3-3 (+VGG-3')	AD	Up: GGGTGAAAGGATCCGCCTACGAAACAGAAGAGATGGG
EmSmadC 3-3 (+VGG-3')	AD	Up: GAATTGGATCCGCCACGCTTACTGACGTGCATGGATGG
Rezeptoren		
EmRSK1i (Intrazellulärteil)	AD/BD	Dw: CATATGAACTTCAGCAAACATGAGAA Up: GAATTCTCAGCTCACAGTCGCCTCGATGACTG
EmRSK1i ka (Q-D Mut.)	AD/BD	Dw: GTCAAACAATTGCTCGTGACACAACCTTCTGGTATGTATCGG Up: CCGATACATAACCAGAAGGGTTGTGTCACGACGAATTGTTTGGAC

3. Material und Methoden

EmRSK1i ka dm (Q-D/T-D Mut.)	AD/BD	Dw: CGTTCCTTAGTTAGTCAAGACATTGCTCGTGACACAACCCCTTCTGG Up: CCAGAAGGGTTGTGTCACGAGCAATGTCTTGACTAACTAAGAACG
EmRSK1 wt	pSecTag2 Hygro	Dw: CCTGTAAGCTTAATGAAAAACATACCA Up: GCGTCTCGAGAGCTCACAGTCGCCTCGATGACTG
EmRSK1 ka (Q-D Mut.)	pSecTag2 Hygro	Dw: GTCAAACAATTGCTCGTGACACAACCCCTTCTGGTATGTATCGG Up: CCGATACATACCAGAAGGGTTGTGTCACGAGCAATTGTTTGAC
EmRSK1 LP ka (K-L Mut.)	pSecTag2 Hygro	Dw: GGCAGCGGGTCGGGACTGCCGTTCTTAGTTAG Up: CTAACCTAAGAACGGCAGTCCCGACCCGCTGCC
EmRSK1 LPLL ka (K-L/F-L Mut.)	pSecTag2 Hygro	Dw: GGTCGGGACTGCCGCTCTTAGTTAGTCAA Up: TTGACTAACTAAGAGCGGCAGTCCCGACC
EmRSK1ØLZ	pSecTag2 Hygro	Dw: CCTGTAAGCTTAATGAAAAACATACCA Up: CTCGAGAATTGTCTTCATCACACTCC
Chimären		
QEmRSK1-ka	pSecTag2 Hygro	Dw: CCCGAATTTACTGATAGTGGCAGCGGGTCGGG Up: GCGTCTCGAGAGCTCACAGTCGCCTCGATGACTG
QEmRSK1-ka SG	pSecTag2 Hygro	Dw: CGATATGGAGAAGTATGGCGAGCCGTC Up: GCGTCTCGAGAGCTCACAGTCGCCTCGATGACTG
QEmRSK1-ka FIA	pSecTag2 Hygro	Dw: ACTTGGTTTCATAGCGAGTGATATGATTTACGCG Up: GCGTCTCGAGAGCTCACAGTCGCCTCGATGACTG
BR1aHind		Dw: AAGCTTACAATTGAACAATGAC
BR1aXho		Up: GTTTACTCGAGAGATTTTACATCTTGGGA
BR1aHind		Dw: AAGCTTACAATTGAACAATGAC
BR1aTrans		Up: ACCCGCTGCCACTACTTTGTGACTGGTC
BR1aHind		Dw: AAGCTTACAATTGAACAATGAC
BR1aSG		Up: CCATACTTCTCCATATCGGCC
BR1aHind		Dw: AAGCTTACAATTGAACAATGAC
BR1aFIA		Up: CGCTATGAAACCAAGTATG
BR1a kz1	pSecTag2 Hygro	Dw: AAGCTTACAATTGAACAATGAC Up: CTCGAGTTTGTGACTGGTCAATAAAG
BR1a kz2	pSecTag2 Hygro	Dw: AAGCTTACAATTGAACAATGAC Up: CTCGAGATACTTCTCCATATCGGC
BR1a LK (L-K Mut.)	pSecTag2 Hygro	Dw: GGTAGTGGTCTGGAAAACCTTTATTGGTTCAG Up: CTGAACCAATAAAGGTTTCCAGACCCACTACC
EmRSK2i (Intrazellulärteil)	AD/BD	Dw: GAATTCGCCGGCTGGTGCTTCTGGCG Up: GGATCCTCAACAATATCCGAGATTTC
EmRSK2i ka (Q-D Mut.)	AD/BD	Dw: GGAACGCACAGTTGCGCGTGACGTCACCTTTGAGTGCACG Up: CGTGCACTCAAAGTGACGTCACGCGCAACTGTGCGTTCC
EmRSK2i ka dm (Q-D/T-D Mut.)	AD/BD	Dw: GCCACTGCTAGTGGAACGCGACGTTGCGCGTGACGTCACCTTTGAGTGC Up: GCACTCAAAGTGACGTCACGCGCAACGTGCGTTCCACTAGCAGTGGC
EmRSK2 wt	pSecTag2 Hygro	Dw: AAAATAAGCTTCATGTTGCCCTCTCGCTACTCC Up: ATTTCTCGAGAACAAATATCCGAGATTCTCTTCC
EmRSK2 ka (Q-D Mut.)	pSecTag2 Hygro	Dw: GGAACGCACAGTTGCGCGTGACGTCACCTTTGAGTGCACG Up: CGTGCACTCAAAGTGACGTCACGCGCAACTGTGCGTTCC

Tabelle 3 – Übersicht über die wichtigsten Konstrukte und verwendeten Primer

3.1.4 Enzyme

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

Polymerasen: Pfu Turbo Polymerase (Stratagene, Amsterdam), Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden)

3.1.5 Wachstumsfaktoren

Sämtliche zu stimulatorischen Zwecken eingesetzte TGF β -Isoformen (rekombinantes humanes TGF β 1, -2 und -3) wurden von der Firma R&D (Minneapolis) bezogen.

Rekombinantes BMP-2 wurde von Prof. W. Sebald, Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

3.1.6 Antikörper

Tabelle 4 - Primärantikörper

Bezeichnung:	gerichtet gegen:	aus:	blocking-Bed.:	Hersteller:	Verdünnung im Western-Blot:
α HA	HA-Epitop	Hase	3% BSA in TBS-T (0,1%Tween)	Santa Cruz B. Santa Cruz	1:1000 in TBS-T (0,1%Tween)
α HA	HA-Epitop	Maus	3% BSA in TBS-T (0,1%Tween)	Roche, Mannheim	1:1000 in TBS-T (0,1%Tween)
α MYC	Myc-Epitop	Maus	3% BSA in TBS-T (0,1%Tween)	Santa Cruz B. Santa Cruz	1:1000 in TBS-T (0,1%Tween)
α P-Smad1/5	phosphorylierte SSXS-Domäne in Smad 1 oder 5	Hase	3% Milchpulver in TBS-T (0,1%Tween)	C.H. Heldin, Uppsala	1:5000 in TBS-T (0,1%Tween)
α P-Smad2/3	phosphorylierte SSXS-Domäne in Smad 2 oder 3	Hase	3% Milchpulver in TBS-T (0,5%Tween)	C.H. Heldin, Uppsala	1:3000 in TBS-T (0,5%Tween)
α Smad2/3	Linker-Region in Smad 2 oder 3	Maus	2,5%Milchpulver in TBS-T	Signal- Transduction-	1:500 in TBS-T (0,1%Tween) +

3. Material und Methoden

			(0,1%Tween)	Laboratories Madison	2,5% Milch
anti-V5	V5-Epitop	Maus	5% Milchpulver in PBS-T (0,05%Tween)	Invitrogen, Groningen	1:5000 in PBS- T 0,05%Tween) + 5% Milchpulver

Tabelle 5 - Sekundärantikörper

Bezeichnung:	gerichtet gegen:	aus:	Hersteller:	Verdünnung im Western-Blot:
POX-anti mouse	Maus-IgG	Ziege	Dianova, Hamburg	1:10000
POX-anti- rabbit	Hase-IgG	Ziege	Dianova, Hamburg	1:5000

Die Zweitantikörper sind Meerrettich-Peroxidase(pox)-gekoppelt.

3.1.7 Expressionsvektoren

Vektoren zur Expression von rekombinanten Proteinen in:

E. coli:

- pCR 2.1 TOPO TA: Invitrogen, Groningen

Hefen:

- pGBKT7: Clontech, Heidelberg
- pGADT7: Clontech, Heidelberg

Säugerzellen:

- pcDNA1: Invitrogen, Groningen
- pcDNA3: Invitrogen, Groningen
- pSecTag2/Hygro: Invitrogen, Groningen
- pCMV-HA/MYC: Clontech, Heidelberg

Die folgenden Vektoren wurden freundlicherweise von Fr. Prof. P. Knaus, Biozentrum, Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

Typ I Rezeptor	Familie	Beschreibung	Eigenschaft
TRI	TGFβ	wild Typ	
TRIIka	TGFβ	T-D Mutation	konstitutiv Aktiv
BRIa	BMP	wild Typ	
BRIIaka	BMP	Q-D Mutation	konstitutiv Aktiv
Typ II Rezeptor			
TRII	TGFβ	wild Typ	
BRII	BMP	wild Typ	
BRII-KR	BMP	K-R Mutation	Kinase inaktiv
ActRIIb	Activin	wild Typ	
Smads			
Smad1	BR-Smad	wild Typ	
Smad2	AR-Smad	wild Typ	

Tabelle 6 – Zur Verfügung gestellte Vektorkonstrukte.

3.1.8 Bakterienstämme

Escherichia coli MC 1061:

Genotyp: F⁺ hsdR (r_k⁻, m_k⁻) araD139 Δ(araABC-leu)7679 galU galK ΔlacX74 rpsL thi
mer {P3: KanaR AmpR (am) Tet(am)}

Escherichia coli DH5α:

Genotyp: Φ80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (R_k⁻, m_k⁺), supE44,
relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169

XL10-gold ultracompetent cells:

Genotyp: Tet^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1
lac Hte [F⁺ proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]^a

S. cerevisiae:

Y187α, Y190(a), SFY526(a), CG1945(a), HF7c(a), AH109(a)

3.2 Methoden

3.2.1 Techniken zur Arbeiten mit *E. multilocularis*

Passagieren von Larvenmaterial:

0.5 ml von in sterilem PBS homogenisiertem Parasitenmaterial werden alle 2 Monate durch intraperitoneale Injektion in mongolischen Wüstenmäusen (*Meriones unguiculatus*) kultiviert.

Isolierung und Aufbereitung von *E. multilocularis* Larvengewebe:

Aus der Bauchhöhle des infizierten *M. unguiculatus* wird das Larvengewebe mit sterilem Material (Pinzetten und Skalpell) entnommen. Nach der Entfernung von Blut und Wirtsgewebe wird das Larvengewebe mit sterilem PBS gewaschen. Dann wird das Larvengewebe mit der Rückseite eines sterilen 10 ml Spritzenkolbens durch ein steriles Küchensieb gesiebt. Das gewonnene Homogenisat wird 3x mit PBS gewaschen und mit Ciprobay® (2mg/ml) behandelt. Eine weitere Wäsche mit PBS findet nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C statt.

Techniken zum Umgang mit *E. multilocularis*-RNA:

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

- Präparation von Zysten-RNA:

Ca. 10 Zysten (mit 1mm Durchmesser) werden unter dem Lichtmikroskop aus der Zellkultur abpipettiert und mit PBS dreimal gewaschen. Mittels einer sterilen Küvette werden sie in einem sterilen Einmalbehälter zerstoßen und anschließend bei 5000 rpm für 5-10 Minuten zentrifugiert. Die RNA-Isolierung wird mit Hilfe des Rneasy mini kits (Qiagen) isoliert und in 30 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

- Präparation von Protoskolex-RNA:

Das Parasitengewebe wird unter sterilen Bedingungen aus dem Zwischenwirt isoliert, über ein steriles Sieb zerkleinert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Protoskolexe werden unter dem Lichtmikroskop selektiv mit einer Pipette angereichert. Nach der Lyse von etwa 50 Protoskolexen erfolgt die RNA-Isolierung mit dem Rneasy Mini Kit (Qiagen). Anschließend erfolgt die Resuspension in 30 µl DEPC-Wasser.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Auch bei der Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen macht man sich die selektiven Bindungseigenschaften einer Silikamembran zur nutze, die überwiegend RNA und nicht DNA bindet. Zusätzlich wird vorher das Zelllysat homogenisiert, um die genomische DNA zu scheren.

3.2.2.2 Quiagen Rneasy Mini Kit Protokoll

Dieses Protokoll zeigt die Möglichkeit, bis zu 100µg Gesamt-RNA mit einer jeweiligen Molekülgröße von über 200 bp aus Kulturzellen oder Gewebe zu isolieren.

Arbeitsanweisung:

- Lyse der Zellen (höchstens 10^7 Zellen) in 350µl (6cm-Platte) bzw. 600µl (10cm Platte) Puffer RLT
- Homogenisieren des Zell-Lysates mit Hilfe einer Qiasredder-Säule
- Zugabe von 1 Volumen Ethanol (70%). Fällung der Nukleinsäuren
- Auftragen der Probe auf eine Rneasy Mini Säule. 15 s bei 10000 rpm zentrifugieren
- 700 µl Waschpuffer RW1 auf die Säule geben. Wiederum zentrifugieren.
- 500 µl RPE-Puffer auf Säule auftragen und wieder zentrifugieren.
- Letzten Schritt wiederholen.
- Elution der RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser: 1min Zentrifugation bei 10000rpm
- Lagerung der RNA bei -20°C

3.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA

Die Konzentrationen der isolierten Nukleinsäuren wurden photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Um Kontaminationen mit Proteinen auszuschließen, wurde jeweils das Verhältnis der Extinktionen E_{260}/E_{280} bestimmt. In proteinfreien Proben sollte es im Fall der RNA bei ca.1.6 liegen, bei DNA um 1.8.

Berechnung der Konzentration nach erhaltener Extinktion:

- DNA: $c = 50 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g/ml}]$
- RNA: $c = 40 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g/ml}]$

3.2.2.4 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine vielfache Amplifikation von geringsten Mengen DNA aus einem bestimmten Abschnitt des Genoms. Voraussetzung ist, dass bestimmte Randsequenzen, die den Abschnitt flankieren, bekannt sind. Diese Sequenzen werden benötigt um dazu komplementäre Oligonukleotide zu synthetisieren, wobei deren Basensequenz jeweils zu einem der beiden Stränge komplementär ist.

Diese zwei DNA-Oligonukleotide dienen als Primer bei der nun folgenden *in vitro*-DNA-Synthese durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Da die Primer flankierend an den entgegengesetzten Punkten der zu vervielfältigenden Sequenz liegen, bestimmen sie auch die Enden der amplifizierten Region.

Ablauf eines PCR-Reaktionszyklus:

- **Trennung** der DNA-Doppelhelix durch kurzes Erhitzen auf 96°C.
- **Primerannealing:** Die Primer binden beim Abkühlen an die komplementären DNA-Einzelstränge (50-60°C).
- **Replikation** der beiden DNA-Stränge durch die Polymerase: Die downstream (in 3' Richtung) von den Primern gelegenen DNA-Abschnitte werden selektiv neu synthetisiert (72°C), wobei etwa 1000 Basen in 60 s synthetisiert werden

Vor Eintritt in den ersten Zyklus liegt noch ein Denaturierungsschritt bei 94°C und nach den Zyklen ein relativ langer DNA-Syntheseschritt bei 72°C, der die Replikation vervollständigen soll.

50µl-PCR-Ansatz :

37 µl steriles ddH₂O
5 µl Taq-Polymerase-Puffer (10x), ohne MgCl₂
1 µl (0.4 mM) dNTP mix
3 µl (1.5 mM) MgCl₂ stock solution: 25mM MgCl₂
1 µl (0.2 µM) Primer 1 (downstream)
1 µl (0.2 µM) Primer 2 (upstream)
1 µl template DNA (~ 100ng)
1 µl (~1U) Taq-Polymerase

Bei einer PCR bietet sich zudem die Möglichkeit, an den Rand des PCR-Produktes Restriktionsschnittstellen einzubauen. Die Sequenz der Schnittstellen muss lediglich als Überhang an die beiden Primer angefügt werden.

- Nested- bzw. Semineded-PCR:

Ziel solch einer PCR ist die deutliche Verringerung der Bildung unspezifischer Nebenprodukte. Dabei wird zunächst eine Amplifikation mit einem „ersten“ Primerpaar unter Standardbedingungen durchgeführt. Im Anschluss daran wird ein Aliquot dieses Ansatzes einer zweiten PCR zugeführt, bei der ein weiteres Primerpaar eingesetzt wird, das intern in das Produkt der ersten Amplifikation hineinverschoben ist. Bei einer Semineded PCR stammt einer der beiden Primer noch aus der ersten Reaktion.

- Touchdown-PCR:

Die Anwendung dieses PCR-Verfahrens ermöglicht eine schnelle und unkomplizierte Optimierung der PCR-Bedingungen nur über die Programmierung des Thermocyclers bzw. die Primerannealing-Temperatur. Dabei beginnt die PCR 2-4°C über dem berechneten Schmelzpunkt (T_M) des Primerpaares. Bei dieser hohen Annealing-Temperatur wird sichergestellt, dass die ersten Primer-Matrizenhybride unter höchster Spezifität gebildet werden. Nun wird die Annealing-Temperatur langsam gesenkt (1-2°C pro Zyklus) bis ca.10°C unter dem berechneten T_M -Wert. Bis nun eine Temperatur erreicht wird, die unspezifische Hybridisierungen zulässt, wird das spezifische Produkt bereits exponentiell amplifiziert und die entstehenden unspezifischen Produkte werden vernachlässigbar.

- PCR mit degenerativen Primern:

Will man die Sequenz eines bislang unbekanntes Genes bestimmen, so arbeitet man mit degenerativen Primern. Dabei vergleicht man die zu dem zu untersuchenden Gen homologen Gene anderer Spezies und wählt von diesen die hochkonservierten Abschnitte als Ansatzstellen der zu konstruierenden Primer aus. Da die meisten Aminosäuren von mehr als einem Codon kodiert werden, werden nach Möglichkeit Sequenzen verwendet, bei denen ein großer Teil der Aminosäuren von nur einem oder zwei Codons kodiert werden. Für die PCR verwendet man dann einen Pool aller möglichen degenerativen Primer.

3.2.2.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäure-Strängen, nach ihrem Molekulargewicht (ihrer Größe), werden diese in die Taschen eines Agarosegels aufgetragen. Nukleinsäuren tragen eine negative Nettoladung und wandern, nach Anlegen einer Spannung (80 V), in Richtung Anode.

Längere Nukleinsäurefragmente laufen langsamer als kürzere Fragmente.

4 Herstellung eines 1% Agarosegels

10 x TAE-Puffer: 48,4g Tris
20ml 0,5M EDTA, pH 8,0
11,4ml konz. Essigsäure
→ ad 1l ddH₂O

Zu 40ml 1x TAE werden 400 mg Agarose gegeben und die Mischung in einer Mikrowelle oder über einem Bunsenbrenner aufgeköcht. Sobald die Agarose auf ca. 55°C abgekühlt ist, wird es in einen mit zwei Klebebändern abgedichteten und einem Kamm versehenen Gelschlitten gegossen. Blasenbildung sollte dabei vermieden werden.

4.1.1.1 Durchführung der Gelelektrophorese

Der Kamm und die Klebebänder werden, nach der Auspolymerisierung, entfernt und der Gelschlitten in einer Gelkammer platziert, die 1x TAE-Puffer enthält. Vor dem Auftragen der zu untersuchenden DNA muss diese nun noch mit Probenpuffer (6x konzentriert) versetzt werden.

10x Probenpuffer: 200 µl 50 x TAE
4.8 ml H₂O
5 ml Glycerin
1 Spsp. Bromphenolblau
1 Spsp. Xylencyanol

Der Probenpuffer hat zum einen die Funktion, anzuzeigen wie weit die DNA im Gel bereits gelaufen ist, denn das dunkelblaue Bromphenolblau bildet die unterste Lauffront, wohingegen das hellblaue Xylencyanol die oberste langsamere Lauffront darstellt, zum anderen erleichtert das

Glycerin im Probenpuffer das Beladen des Gels erheblich, da es durch sein Gewicht die Probe in die Geltasche absinken lässt.

Zusätzlich muss in jedem Gel eine Tasche mit einem Marker beladen werden. Mit dessen Hilfe ist man überhaupt erst in der Lage, die Größe bzw. das Molekulargewicht der aufgetragenen Proben zu bestimmen.

Nun folgt die Gelelektrophorese bei 80 V für ca. 60 min.

Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen wird das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad ca. 10 min gelagert. Ethidiumbromid ist in der Lage in Nukleinsäuren zu interkalieren und es fluoresziert rosafarben bei Anregung mit UV-Licht.

3.2.2.6 TOPO TA Cloning[®]

Die TOPO TA-Klonierungsstrategie stellt eine schnelle und effiziente Methode zum Einbringen von Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten in Plasmidvektoren dar, wobei dabei keinerlei Ligase oder spezifische PCR-Primer benötigt werden.

Durch die matrizenunabhängige, terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase, wird an die 3'-Enden des PCR-Produktes je ein einziges Desoxyadenosin angefügt. Der im TOPO TA Cloning[®] Kit enthaltene linearisierte Vektor hat dazu passend einzelne überhängende 3'-Desoxythymidinreste und zudem noch eine kovalent gebundene Topoisomerase I. Die aus dem Vaccinia-Virus isolierte Topoisomerase I bindet an spezifischen Stellen dsDNA und ist in der Lage, das Phosphodiesterückgrat eines Stranges nach 5'-CCCTT zu spalten.

Die Energie, die bei diesem Vorgang frei wird, wird für die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Stranges und einem Tyrosinrest (Tyr-274) der Topoisomerase I genutzt. So erhält man einen aktivierten Vektor, der einen nucleophilen Angriff der 5'-Hydroxylgruppe des einzuklonierenden PCR-Produktes auf die Phospho-Tyrosin-Bindung des Vektors ermöglicht. Im Zuge dieses Angriffs wird das Enzym freigesetzt und das PCR-Produkt aufgrund der zum TOPO-Vektor komplementären Enden (A-T) effizient inkloniert.

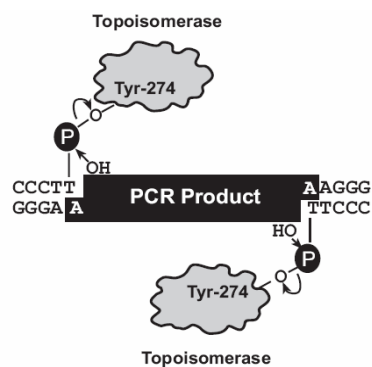


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Prinzips des TOPO TA Cloning. Der linearisierte Vektor hat einzelne überhängende 3'-Desoxythymidinreste mit einer kovalent gebundenen Topoisomerase I. Durch das in der PCR-Reaktion durch die Taq-Polymerase an den 3'-Enden eingefügte Desoxyadenosin fügt sich das PCR-Produkt ohne Bedarf weiterer Schnittstellen oder Ligasen in den Vektor ein.

Reaktionsansatz für die TOPO TA Cloning[®]-Reaktion

PCR-Produkt	0,5-4µl (ca. 80ng/µl)
Salzlösung (1,2M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	1µl
pCR [®] II-TOPO [®] -Vektor	1µl
ddH ₂ O	ad 6µl Endvolumen

Der Ansatz wird gemischt und 5min bei RT inkubiert, dann auf Eis gelagert.

Zur Transformation werden 2µl des Reaktionsansatzes zu den in einem Eppendorf-Cap gelagerten, chemisch kompetenten One Shot[®] *E. coli*-Bakterien gegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert.

Es folgt ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C, bei dem die Bakterien die DNA aufnehmen.

Nach kurzem Abkühlen auf Eis (2 min) werden 250 µl SOC-Medium zugegeben und das Cap 1 Std. bei 200 rpm und 37°C geschüttelt.

15 µl dieses Ansatzes werden nun auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2.7 Plasmid-DNA-Amplifikation in einer LB-Flüssigkultur

Um Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien zu analysieren bzw. isolieren, muss sie zunächst amplifiziert werden. Hierfür pickt man mit einer autoklavierten Pipettenspitze den entsprechenden Klon von der LB-Agar-Platte und gibt die Spitze in ein mit LB-Medium und dem passenden Antibiotikum gefüllten Röhrchen oder Kolben.

Das eingesetzte Volumen hängt von der anschließenden Verwendung der DNA bzw. der benötigten Menge an DNA ab: Für eine Midi-Präparation über eine Säule werden 100 ml LB-Medium (die das entsprechende Antibiotikum enthalten) angeimpft. Für eine Mini-Präparation die beispielsweise nur der Kontrolle dient, ob der auf der Platte gewachsene Klon tatsächlich das Plasmid mit Insert enthält oder nur eine Autoligation vorliegt, ist ein 3ml Ansatz voll ausreichend.

Die unverschlossenen Gefäße werden über Nacht auf dem Schüttler (ca. 200 rpm) bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Morgen (nach 12-16 Std.) sollten die Bakterien geerntet werden, da sie sich nach dieser Zeit am Ende ihrer logarithmischen bzw. am Anfang ihrer stationären Wachstumsphase befinden. Längeres Wachstum sollte vermieden werden da die Bakterien nach 16-18 Std. beginnen zu lysieren und sich die DNA-Ausbeute verringern könnte.

3.2.2.8 Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien

Das Prinzip von DNA-Präparationen beruht auf der Kombination einer alkalischen Lyse mit einer Silikamembran, die sehr selektive und reversible Nukleinsäure-Bindungseigenschaften besitzt.

Zunächst werden die Bakterien aus der LB-Flüssigkultur durch 10minütiges zentrifugieren pelletiert. Das Pellet wird in einem RNase-haltigen Resuspensionspuffer resuspendiert. Dieser Abbau der RNA stellt sicher, dass tatsächlich nur Plasmid-DNA an die Silikamembran bindet.

Nun folgt die Lyse der Bakterien mit Hilfe eines NaOH und SDS (Natriumdodecylsulfat) enthaltenden Lysispuffers. Das SDS löst die Phospholipid- und Proteinbestandteile der Zellmembran, während das NaOH Proteine, chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Dies ist daher auch ein sehr zeitkritischer Schritt, der 5 min nicht überschreiten sollte. Bei einer optimalen Lysisdauer wird die maximale Menge an Plasmid-DNA freigesetzt ohne die Freisetzung chromosomaler DNA und ohne die Plasmid-DNA allzu lange den denaturierenden Bedingungen auszusetzen.

Der Neutralisierungspuffer, der die Lysisreaktion abstoppt, enthält KAc (pH 5.5), was zum einen dazu führt, dass das SDS ausfällt und die denaturierten Proteine, die chromosomale DNA und die weiteren Zelltrümmer in Salz-Detergenz-Komplexen gebunden werden, zum anderen befähigt es die Plasmid-DNA, an die Silikamembran zu binden. Die Plasmid-DNA ist aufgrund der geringeren Größe im Vergleich zur chromosomalen DNA in der Lage, vollständig zu renaturieren und in Lösung zu gehen. Nach Zentrifugation verbleibt sie daher im Überstand.

Dieses klare (da frei von Proteinen) Lysat wird auf eine Säule geladen. Die hohen Salzkonzentrationen und pH-Bedingungen des Lysates sorgen nun dafür, dass lediglich Plasmid-

3. Material und Methoden

DNA an die Silica-Membran bindet. Es folgt ein Waschschriff bei dem mit Hilfe eines Wasch-Puffers Nucleinsäure-bindende Proteine, Salze und RNA-Spuren entfernt werden.

Abschließend wird die DNA mit einem geeigneten Volumen an autoklaviertem ddH₂O oder Elutionspuffer eluiert. Gelagert werden kann die in Wasser gelöste DNA bei -20°C.

QIAGEN Plasmid Midi Kit Protokoll

Dieses Protokoll zeigt die Möglichkeit, bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus einer 100 ml Übernachtkultur von *E. coli* in LB-Medium zu isolieren.

Benötigte Puffer:

- Resuspensions-Puffer P1: 50 mM TrisCl, pH8.0
 10 mM EDTA
 100 µg/ml RNase A
 → nach Zugabe von RNase A bei 4°C lagern
- Lysis-Puffer P2: 200 mM NaOH
 1 % SDS
- Neutralisations-Puffer P3: 3 M KAc, pH 5.5
- Äquibrierungs-Puffer QBT: 750 mM NaCl
 50 mM MOPS, pH 7.0
 15 % Isopropanol
 0.15 % Triton X-100
- Wasch-Puffer QC: 1 M NaCl
 50 mM MOPS, pH 7.0
 15 % Isopropanol
- Elutionspuffer QF: 1.25 M NaCl
 50 mM TrisCl, pH 8,5
 15 % Isopropanol

Arbeitsanweisung:

- Bakterien aus Übernachtkultur durch Zentrifugation für 15 min bei 6000g und 4°C pelletieren
- Bakteriensediment in 10 ml Puffer P1 resuspendieren und in ein Zentrifugenröhrchen überführen.

- Zugabe von 10 ml Puffer P2 und vorsichtiges 4-6maliges Invertieren. 5 min Inkubation bei RT
- Abstoppen der Lysisreaktion durch Zugabe von 10 ml Puffer P3.
- Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm für 30 min. Übertragen des Überstandes in neues Zentrifugenröhrchen und erneutes Zentrifugieren bei 13000rpm für 15 min
- Währenddessen wird die Säule (QIAGEN-tip 100) äquilibriert indem 10 ml Puffer QBT aufpipettiert werden
- Sobald der gesamte Puffer QBT durch die Säule gelaufen ist, wird sie mit dem Überstand beladen
- Nach Durchlaufen des gesamten Überstandes wird die Säule mit 2x 10 ml Puffer QC gewaschen. Nun kann die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert werden.

3.2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) und erfolgt im ABI PrismTM Sequencer von Perkin Elmer.

Um DNA zu sequenzieren wurde 0.4 µg Plasmid-DNA (0,1µg bei PCR-Produkt), 5 pmol Primer und 2 µl Sequenziermix in einem Volumen von 10 µl in ein 0.2 ml Reaktionsgefäß gegeben.

Die doppelsträngige DNA wird zur Denaturierung für 10 Sek. auf 96°C erhitzt und anschließend für 5 Sek. auf eine Primer-spezifische Annealingtemperatur, die nach der Formel $4x(G+C)+2x(A+T)-5^{\circ}C$ berechnet wird, abgekühlt. Der angelagerte Primer ist der Initiationspunkt der DNA-Synthese für die Taq-Polymerase, die bei 60°C für 4 min erfolgt. Der Sequenziermix enthält neben den 2'-Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch einen geringen Anteil an 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs), die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Der Einbau eines ddNTPs führt zum Abbruch der Elongationsreaktion, da keine 3'OH-Gruppe zur Ausbildung einer Phosphodiesterbindung mit dem nächsten Nukleosidtriphosphat vorhanden ist. Durch den Einbau der ddNTPs entsteht ein Gemisch doppelsträngiger DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die an unterschiedlichen 3'-Nukleotiden terminiert sind. Je kürzer das Fragment ist, desto weiter 5' auf dem zu sequenzierenden Strang liegt das eingebaute ddTNP.

Nach der DNA-Synthese werden die präzipitierten Reaktionsansätze in Probenpuffer aufgenommen, für 2 min bei 90°C denaturiert und im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die

fluoreszierenden ddNTPs werden von einem Laserscanner im Sequenzierer erfasst, wodurch die Sequenz des DNA-Fragments ermittelt wird.

Sequenzieransatz:

0.4 µg Plasmid oder 0.1µg PCR-Produkt

5 pmol Primer

2 µl Sequenziermix

ad 10µl ddH₂O

3.2.2.10 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind spezifische Endonukleasen, die an spezifischen, meist palindromartigen Sequenzen doppelsträngige DNA spalten, indem sie in jedem Strang eine Phosphodiesterbindung lösen. Sogenannte „blunt ends“ (stumpfe Enden) entstehen, wenn die Schnittstellen auf dem DNA-Doppelstrang genau einander gegenüber liegen. Sind die Schnittstellen auf den DNA-Strängen gegeneinander versetzt, so entstehen überhängende „sticky ends“, die zueinander komplementär sind.

Ablauf eines Restriktionsverdaus

20 µl Restriktionsansatz:

DNA	2-3 µl
10x Puffer für 1. Restriktionsenzym	2 µl
1. Restriktionsenzym (10 U/µl)	2 µl
autoklaviertes ddH ₂ O	Ad 20 µl Endvolumen

Dieser Ansatz wird für 1 Std. bei 37°C inkubiert.

Zur Kontrolle, ob der Restriktionsverdau erfolgreich verlaufen ist, wird anschließend ein Testgel gefahren.

3.2.2.11 Gelextraktion

In einer Gelextraktion wird die in einer Gelelektrophorese aufgetrennte DNA wieder aus dem Gel gewonnen und für spätere Arbeitsschritte aufgereinigt und dabei von Ethidiumbromid- und Gelrückständen und Probenpuffer befreit.

Bei DNA-Fragmenten von 70 bp bis 10 kb wird der QIAquick Gel Extraction Kit verwendet.

Die DNA wird über eine spezielle Silika-Membran, aufgereinigt. Diese Membran bindet bei hohen Salzkonzentrationen spezifisch DNA während andere kontaminierende Substanzen hindurchfließen.

Arbeitsanweisung laut QIAquick Gel Extraktion Kit Protocol using a microcentrifuge:

- Ausschneiden des DNA-Fragmentes mit sauberem Skalpell
- Gelstück wiegen (max. Gewicht für eine Säule: 400mg) und mit drei Volumenanteilen des QG-Puffers versetzen (100mg~100µl). Inkubation für 10min bei 50°C und mehrmaligem Vortexen zum Lösen des Gelstückes.
- Zugabe von einem Gelvolumenanteil an Isopropanol.
- Zentrifugen-Säule auf 2ml Sammeltubus stecken und mit DNA beladen (max. 800µl). Eine Minute bei 14000rpm zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen und Säule waschen mit 750µl des Waschpuffers PE: Eine Minute zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen. Um Pufferreste zu entfernen Säule nochmals für eine Minute zentrifugieren.
- Säule auf ein steriles Eppendorf-Cap stecken und Eluierung der DNA mit 30-50µl autoklaviertem Wasser (bzw. Elutionspuffer EB).
- Lagerung der DNA bei -20°C.
-

3.2.2.12 Transformation von kompetenten Bakterien

Unter einer Transformation versteht man die genetische Veränderung eines Bakteriums nach der Aufnahme von DNA eines genetisch anderen Bakteriums.

Vorraussetzung für eine erfolgreiche Transformation ist die Kompetenz der zu transformierenden Bakterien, d.h. die Bakterien müssen zunächst zur Aufnahme von DNA aus dem Medium befähigt werden. Dies geschieht durch die Behandlung der Bakterien mit DMSO (Dimethylsulfoxid), was die Membranpermeabilität erhöht, und durch MgSO₄, welches in der Lage ist, Nukleinsäuren zu komplexieren.

3. Material und Methoden

Die kompetenten Bakterien werden aliquotiert (je 100µl) und bei –80°C gelagert.

Arbeitsanweisung für eine Hitzetransformation:

- Auftauen der kompetenten Bakterien auf Eis und Zugabe von ca. 1-10 ng der zu transformierenden DNA bzw. 10µl eines Ligationsansatzes.
- Mischen und Inkubation für 30min auf Eis.
- Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 90s. → Aufnahme der DNA aus dem Medium.
- Abkühlen der Bakterien auf Eis und Zugabe von 1ml SOC-Medium (Zusammensetzung: siehe unten).
- Inkubation auf dem Schüttler bei ca. 50rpm und 37°C. Inkubationszeit bei Ampicillin-Resistenz: 30min.
- Sedimentieren der Bakterien für 2min bei 6000rpm und resuspendieren in 60µl LB-Medium
- Ausplattieren auf vorgewärmte LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum.

Medienzusammensetzung und Agar-Platten-Herstellung:

- SOC-Medium: 2 % Trypton
0.5 % Hefe-Extrakt
10 mM NaCl
2.5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose
- LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton
5 g Yeast (Hefe)-Extrakt
10 g NaCl
→ auf 1 L ddH₂O; pH 7.4

Das Medium ist danach zu autoklavieren.

- LB-Agar-Platten für Ampicillin-Selektion:
500 ml LB-Medium
7.5 g Bacto Agar (1.5 % [w/v])
→ Ansatz autoklavieren, auf ca. 55°C abkühlen lassen und
100 µg/ml Ampicillin zugeben.

Das flüssige Agar-Medium wird nun in Petrischalen gegossen (nicht höher als 5 mm) und die Schalen verschlossen. Sobald der Agar ausgehärtet ist werden sie kopfüber bei 4°C gelagert.

3.2.2.13 Mutagenese

Zur Veränderung der Aminosäuresequenz des vom jeweiligen Gen kodierten Proteins wurde das QuikChange™ XL site-directed mutagenesis Kit von Stratagene verwendet.

Bei dieser Methode wird ein doppelsträngiger DNA-Vektor (dsDNA) eingesetzt, der das zu mutierende Insert trägt. Als Primer werden zwei Oligonukleotide verwendet, die die gewünschte Mutation enthalten. Die Mutagenese-Oligonukleotide müssen gegenseitig komplementäre zu den Vektor-Strängen sein. In einer PCR Reaktion mit *Pfu-Polymerase* wird das Plasmid mit den Mutagenese-Oligonukleotiden amplifiziert. Um die neu synthetisierte mutierte DNA zu selektieren, wird die unmutierte Parental-DNA mit der Endonuklease *Dpn I* verdaut. Dieser selektive Verdau beruht auf der Tatsache, dass *Dpn I* nur methylierte oder hemimethylierte DNA (5'-Gm⁶ATC-3') verdaut. Das Parental-Plasmid wurde in einem dam⁺-Stamm propagiert (fast alle Wildtyp-*E. coli* Stamme sind dam⁺), bei dem es zu einer Methylierung des Plasmids kommt. Das mutierte Plasmid wurde in XL10-Gold® ultrakompetenten Zellen transformiert.

PCR-Ansatz:

10x Pfu-Puffer	5 µl
dNTP Mix	1 µl
dsDNA	10 µg
Primer 1	125 µg
Primer 2	125 µg
QuikSolution	3 µl
Pfu-Polymerase	1 µl
Wasser	ad 50 µl

Thermocycler-Einstellungen:

Heizdeckel	110°C
<hr/>	
1x	95°C 1 Min
	95°C 50 Sek.
18x	60°C 50 Sek.
	72°C 2 Min/kb
<hr/>	
1x	72°C 7 Min

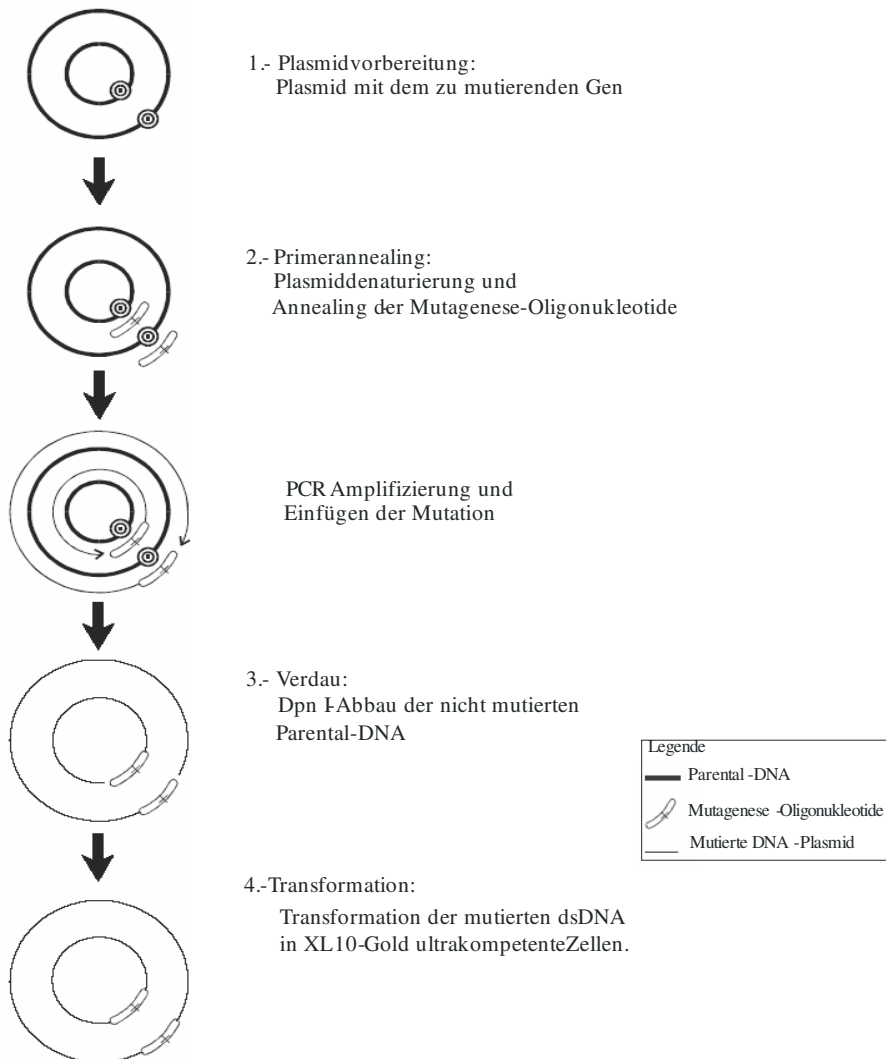


Abbildung 10: Die QuikChange™ XL site-directed mutagenesis Methode. Um die gewünschten Mutationen einzufügen, wurde eine Mutagenese gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2.14 Konstruktion einer Chimären-DNA

Mittels PCR können 2 DNA Fragmente durch Überlappung komplementärer Bereiche miteinander verbunden werden. Abbildung 11 soll diese Methode veranschaulichen. Die verschiedenen zu fusionierenden DNA-Abschnitte werden hier durch weiße bzw. schwarze Farbe dargestellt. Für jedes Fragment werden jeweils zwei Primer eingesetzt: Für Fragment 1 (des in weiß markierten DNA-Abschnitts) Primer A und B, für Fragment 2 (des in schwarz markierten DNA-Abschnitts) Primer C und D. Primer A hat eine zu Fragment 1 vollständig komplementäre Region, Primer D zu Fragment 2. Primer B weist zum einen eine Sequenz auf, die komplementär zu Fragment 1 ist (in weiß dargestellt), zum anderen schließt sich hier aber eine Sequenz an, die komplementär zu

3. Material und Methoden

Fragment 2 ist (in schwarz dargestellt). Dasselbe Prinzip findet sich bei Primer C. Er besteht aus einer Sequenz, die komplementär zu Fragment 2 (schwarz) ist, aber zusätzlich noch eine zu Fragment 1 komplementäre Sequenz (weiß) aufweist. In zwei getrennten PCR-Reaktionen werden jeweils das Fragment 1 und 2 amplifiziert. Die beiden PCR-Produkte werden aufgereinigt und in äquimolarer Menge zusammengemischt. Bei hoher Temperatur werden die Doppelstränge in Einzelstränge aufgetrennt. Nach Absenken der Temperatur kommt es zu einer Hybridbildung zwischen den beiden Fragmenten. Durch Polymerisierung werden die Fragmente verlängert bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt.

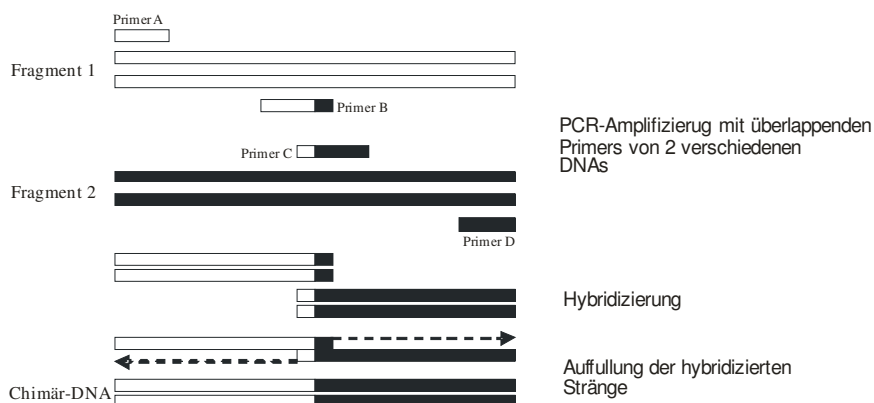


Abbildung 11: Konstruktion einer Chimär-DNA. Amplifikation von Fragment 1 (weiß) mit dem Primer A und dem überlappenden Primer B. Amplifikation von Fragment 2 (Schwarz) mit dem überlappenden Primer C und Primer D. Die beiden PCR-Produkte werden aufgereinigt und in äquimolarer Menge zusammengemischt. Auftrennung bei hoher Temperatur in Einzelstränge. Hybridbildung zwischen den beiden Fragmenten durch Absenken der Temperatur. Verlängerung der Fragmente bis zur kompletten doppelsträngigen DNA durch Polymerisierung.

PCR-Ansatz für die Herstellung von der Chimär-DNA

10x Pfu-Puffer	5 µl
dNTP	1 µl
Template 1	50 -100 µg
Template 2	50 -100 µg
Pfu-Polymerase	1 µl
Wasser	ad 45 µl

Thermocycler-Einstellungen

Heizdeckel	110°C	
1x	95°C	1 Min
	95°C	1 Min
2x	60°C	30 Sek.
	72°C	2 Min/kb
1x	72°C	7 Min

3.2.2.15 Amplifikation von TGFβ-Faktoren-Sequenzen aus *E. multilocularis* über degenerative PCRs

- Amplifikation von *emrsk2* und *emrsk3* von *E. multilocularis*

Die hergestellten degenerative Primer haben eine Länge von ca. 20 Nukleotiden und richten sich gegen die hoch konservierten Motive NILGFIA 5' AAC ATC CTC GGX TTY ATH GC-3' und MAPEVLD 5'-TCT AGT ACY TCX GGX GCC AT-3'. Die PCR wird bei niedrigen Stringenzbedingungen aus einer *E. multilocularis*-cDNA durchgeführt (Annealingtemperatur ca. 50°C). Das amplifizierte Fragment wird mit einem TOPO-TA Cloning® kit zur weiteren Sequenzierung kloniert.

Amplifikation des 5'- und 3'-Endes über RACE Strategie.

Die Isolierung des 5' und 3'-Endes der PCR-amplifizierten Fragmente erfolgt über die RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) Strategie und Gen-spezifische Oligonukleotide. Dafür wurde das „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ der Firma Clontech (Palo Alto, USA) nach Herstellerangabe durchgeführt.

emrsk2 RACE

Die Amplifikation des *emrsk2* 5' Endes wurde durch eine PCR mit dem Vektor-Primer PJG4-5PR (5'-GATGCCTCCTACCCTTATGATG-3') und dem *emrsk2* spezifischen Primer RSK2-UP (5'-GGGATTTGAGGTCACGATG-3') aus einer *E. multilocularis* cDNA Bibliothek, die für das Metacestode-Stadium hergestellt worden war, durchgeführt. Für die Amplifikation des *emrsk2* 3' Endes wurde der *emrsk2*-Primer RSK2-DW1 (5'-GTAAACCACCAATAGCTCA-3') und der Vektor-Primer PJG4-5-3 (5'-TTGGAGACTTGACCAAACCT-3') eingesetzt. Für eine nested-PCR wurde der *emrsk2*-Primer RSK2-DW2 (5'-CGACAGTCTCACTGGCCG-3') und der Vektor-Primer PJG4-5-3Nest (5'-CCTCTGGCGAAGAAGTCC-3') verwendet.

emrsk3 RACE

Die Amplifikation des *emrsk3* 5' Endes wurde durch eine PCR mit dem Vektor-Primer PJG4-5PR (5'-GATGCCTCCTACCCTTATGATG-3') und dem *emrsk3* spezifischen Primer RSK3-UP (5'-GAAAAGTTGCTCCAGTTGCAG -3') vorgenommen. Für die Amplifikation des *emrsk3* 3' Endes wurde der *emrsk3*-Primer RSK3-DW1 (5'- GGAGATCTGGGACTAGCTG -3') und der Vektor-Primer PJG4-5-3 (5'-TTGGAGACTTGACCAAACCT-3') eingesetzt. Für eine nested-PCR wurde der *emrsk3*-Primer RSK3-DW2 (5'- GCACCTGGTTCGACGGAAA -3') und der Vektor-Primer PJG4-5-3Nest (5'-CCTCTGGCGAAGAAGTCC-3') verwendet.

- Amplifikation von *emtak1*

Aus dem Plasmid Ig312 aus der cDNA-Bibliothek aus der Metacestode von *E. multilocularis* konnte ein 250 Nukleotid langes Fragment isoliert werden, welches für ein Protein kodiert, das hohe Homologie zu der Familie der TAK1-Proteine aufweist. Es wurde darum als *emtak1* bezeichnet. Über eine 5'-3' RACE PCR mit den Primer PU (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') und TAKup3 (5'-GTACGTTTCGCGGTAGTTG-3'); TAKdw3 (5'-ACCTGGCGATGGTCAGGA-3') und PJG4-5-3 (5'-TTGGAGACTTGACCAAACCT-3') konnte die komplette Sequenz identifiziert und charakterisiert werden.

- Amplifikation von *embmp*

Aus der cDNA-Bibliothek EST von *Echinococcus granulosus* konnte eine Sequenz identifiziert werden (BF643002), die eine hohe Homologie zu der cDNA von dem bone morphogenetic protein 2/4 aufweist (Fernandez & Maizels, 2000). Anhand dieser Sequenz wurden die Primer BMPDw1 5'-GTAAACCAATCGGTGAAAA-3' und BMPup 5'-ATCTTGATTTTAGGGTCAATA-3' konstruiert, mittels derer eine PCR mit *E. multilocularis* cDNA durchgeführt wurde. Um von dem dabei amplifizierten Fragment das 5' Ende zu charakterisieren, wurde eine weitere PCR mithilfe der cDNA-Bibliothek von *E. multilocularis* durchgeführt, bei der der Vektor-Primer PJG4-5PR (5'-GATGCCTCCTACCCTTATGATG-3') und der Insert-Primer BMPup2 (GAGATATCGCGAATTGCGC) verwendet wurden.

3.2.2.16 Yeast Two Hybrid System

Two hybrid assays können benutzt werden um neue Protein-Protein Interaktion zu identifizieren, eine vermutliche Interaktion zu bestätigen oder um Interaktionsdomänen zu definieren.

Beschreibung der verwendeten Yeast Two Hybrid Systeme

Das MATCHMAKER Gal4 Two-Hybrid System 3 (Clontech) ist ein Gal4-basiertes Two-Hybrid System, das mittels eines Transkriptions-Assays, Protein-Protein Interaktionen *in vivo* in Hefezellen detektiert.

Die zentrale Komponente des Systems ist der Hefe-Faktor GAL4, ein Transkriptionsaktivator-Protein. GAL4 besteht aus 2 Domänen: die DNA Bindungsdomäne (BD) ermöglicht die Bindung des Faktors an die Ziel-DNA (in Promotorregionen), die Aktivierungsdomäne (AD) wird benötigt um die RNA-Polymerase an der Zielregion zu aktivieren und somit die Transkription eines Zielgens zu bewerkstelligen. Das Prinzip des Systems ist, dass diese Domänen nicht kovalent verbunden sein

3. Material und Methoden

müssen, sondern dass sie die Transkription schon induzieren können, wenn sie sich in räumlicher Nähe zueinander befinden.

Um eine Protein-Protein-Interaktion nachweisen zu können, wird jede einzelne Domäne in der Hefe als Fusionsprotein mit einem anderen Protein exprimiert.

Dabei unterscheidet man zwischen einem „Bait“-Konstrukt und einem „Prey“-Konstrukt. Unter dem „Bait“-Konstrukt versteht man einen Vektor (pGBKT7) mit einer GAL4 DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD), die mit einem der beiden zu untersuchenden cDNA-Fragmente fusioniert ist. Das „Prey“-Konstrukt besteht aus einem Vektor (pGADT7) mit einer GAL4 Aktivierungsdomäne (DNA-AD), welches mit dem anderen zu untersuchenden cDNA-Fragment fusioniert ist (Fields & Song, 1989; Chen et al., 1991).

Wenn beide Proteine in der AH109 Hefezelle miteinander interagieren, bringt diese Interaktion die BD und AD in räumliche Nähe, so dass vier Reportergene (HIS3, ADE2, lacZ, MEL1) angeschaltet werden. Falls die beiden verwendeten Proteine nicht miteinander interagieren, wird die Transkription der Reportergene nicht aktiviert.

Die DNA-BD- (pGBKT7) und AD-Fusionsvektoren (pGADT7) ermöglichen eine Proteinexpression höchsten Niveaus. Außerdem besitzen beide Vektoren T7-Promotoren für eine *in vitro* Transkription und Translation der entsprechenden Fragmente. pGBKT7- und pGADT7-Inserts werden als GAL4-Fusionsproteine mit c-Myc- bzw. Haemagglutinin (HA)- Epitop exprimiert.

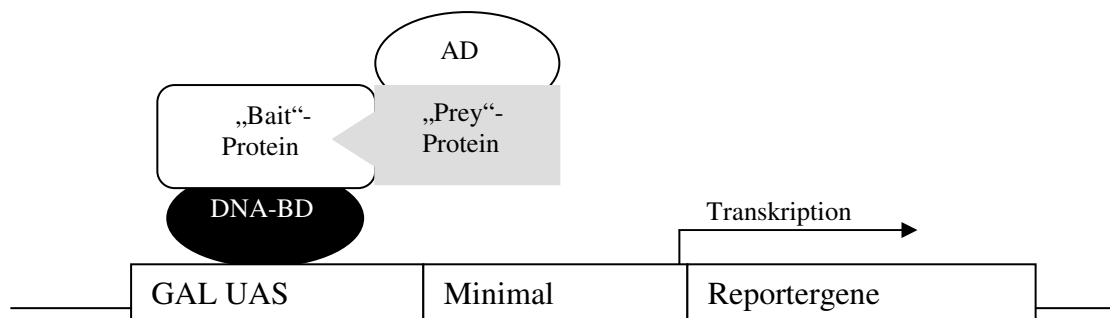


Abbildung 12 Das Two Hybrid Prinzip. Die DNA-BD enthält die Aminosäuren 1-147 von dem Hefe GAL4 Protein; diese Sequenz bindet an dem GAL UAS upstream des Reportergens. Die AD enthält die Aminosäuren 768-881 von dem GAL4 Protein und funktioniert deshalb als Transkriptionsaktivator.

Medien

- YPDA: 20 g/l Difco Pepton
10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Agar (für Platten)
dH₂O ad 950 ml
pH 5,8

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55°C:

50 ml 40% sterilfiltrierte Glucose (Endkonzentration 2%)
3 ml 1% Adenin-Hemisulfat (Endkonzentration 0,003%)

- SD: 6,7 g Difco™ Yeast Nitrogen Base ohne Amino Acids
20 g Difco™ Bacto Agar (für Platten)
X g des entsprechenden Drop Out (DO) Supplement Pulvers
dH₂O ad 950 ml
pH 5,8

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55°C:

50ml 40% sterilfiltrierte Glucose (Endkonzentration 2%)

Zugabe weiterer Komponenten:

DO Supplements: Clontech –Leu/-Trp DO Supplement (0,64 g/l)
Clontech –Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement (0,6 g/l)
3-Amino-1,2,4triazol (3-AT; Sigma Aldrich) in verschiedenen Konzentrationen
50x Adenin-Hemisulfat (1 g/l)

- ONE-Step Buffer 0.2 M Lithiumacetat pH7,5
40% Polyethylenglycol 3350 (PEG)
100 mM Dithiothreitol (DTT)

DTT wurde kurz vor der Transformation aus einer 1 M Stammlösung zugegeben.

3.2.2.16.1 Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3

Für die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen wurde das Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 von Clontech verwendet. Der eingesetzte *Saccharomyces cerevisiae* Stamm war:

AH109: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ ,

LYS2: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,

URA3: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

Als Expressionsvektoren sind in diesem System enthalten:

- pGADT7

Dieser Vektor ermöglicht die Expression von Proteinen in AH109, die an ihrem Aminoterminus mit der GAL4 Aktivierungsdomäne fusioniert sind, unter der Kontrolle des konstitutiven Promoters ADH1 (P_{ADH1}). Zusätzlich enthalten die Fusionsproteine ein HA-Epitop, über das die Expression durch gegen das Epitop gerichtete Antikörper detektiert werden kann. Für die Selektion in *E. coli* kodiert das Plasmid für eine Amp^R und für die Selektion in AH109 enthält das Plasmid *LEU2* Gen.

- pGBKT7

Dieser Vektor ermöglicht die Expression von Proteinen, die an ihrem Aminoterminus mit der GAL4 DNA-Bindungsdomäne fusioniert sind. Dieses Plasmid entspricht weitestgehend pGADT7, nur dass der Selektionsmarker für *E. coli* eine Kana^R und für in AH109 das *TRP1* Gen ist

3.2.2.16.2 Hefe-Transformation

Die Transformation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Chen et al (1992).

Dazu wurden 100 ml YPDA mit 4-5 2-3 mm Kolonien angeimpft und für 16-18 h bei 30°C und 250 rpm inkubiert ($OD_{600} > 1,5$). Je nach Anzahl Transformationen wurde ein bestimmtes Volumen der Kultur, für 10 Transformationen 20 ml, für 5 min bei 1000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml frisch hergestellten ONE-STEP-Buffer resuspendiert. Pro Transformation wurden 0,5 μ g des zu transformierenden Plasmiden zu 100 μ l der resuspendierten Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 45°C im Heizblock inkubiert und danach auf SD –Trp/-Leu-Platten ausplattiert. Nach 2 Tagen waren die ersten Kolonien sichtbar und es wurden nur Kolonien für die Interaktionsstudien verwendet, die nach 3 Tagen einen Durchmesser von Σ 1 mm hatten.

3.2.2.16.3 Detektion der exprimierten Fusionsproteine

Die Expression der hergestellten Fusionsproteine in AH109 wurde durch Western-Blot-Analyse kontrolliert. Wie bereits aufgeführt, enthalten die AD-Fusionsproteine zusätzlich ein HA-Epitop, während die BD-Fusionsproteine ein c-myc Epitop enthalten. Mit Antikörpern, die gegen das eine bzw. andere Epitop gerichtet sind, können die Fusionsproteine in AH109 nachgewiesen werden. Um genügend Protein für den Nachweis im Western Blot zu erhalten, wurden 15 ml SD-Trp/-Leu mit jeweils einer der unterschiedlich kotransformierten Hefe angeimpft und bei ca. 170 rpm bei 30°C im Schüttler inkubiert, bis die OD₆₀₀ der Kultur Ψ 0,7 betrug. Anschließend wurden die Hefen pelletiert, in 200 μ l 1x Probenpuffers der Polyacrylamid-Gelelektrophorese resuspendiert und 5-10 min gekocht. Danach wurde kurz abzentrifugiert und 25 μ l des Überstandes auf das Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurden 15 ml YPDA mit einer nicht transformierten Kolonie von AH109 angeimpft und ebenfalls bei 30°C im Schüttler inkubiert, bis die OD₆₀₀ Ψ 0,7 betrug. Diese Kultur wurde wie die oberen Kulturen weiterverarbeitet und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt. Sowohl vom anti-HA-POX Antikörper, als auch vom anti-c-myc -POX Antikörper wurden 4 mg/ml zur Detektion der Fusionsproteine eingesetzt.

3.2.2.16.4 Interaktionsstudien in *Saccharomyces cerevisiae* AH109

Zur Bestimmung vorhandener Interaktionen wurde von jeder Doppeltransformation 3 Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und jeweils in 50 μ l 1xPBS verdünnt und davon 2 μ l auf die Selektionsplatten pipettiert. Die Verdünnung hat den Vorteil gegenüber dem Ausstreichen, dass die Zellen feiner verteilt werden und eventuell mit pipettiertes Medium der Transformationsplatte verdünnt wird.

In einem typischen Versuch wurde auf folgende Platten pipettiert:

SD -Trp/-Leu	Selektion auf Plasmide
SD -His/-Trp/-Leu	Selektion auf Interaktion unter mittlerer Stringenz
SD -Ade/-His/-Trp/-Leu	Selektion auf Interaktion unter hoher Stringenz

In der Regel war nach 4-6 Tagen Inkubation bei 30°C Wachstum festzustellen, wenn die Fusionsproteine interagierten. Um das Wachstum der Transformanden besser einschätzen zu können, wurde bei jedem Versuch Klone mitausplattiert, die die im Matchmaker System 3 enthaltenen Kontrollkonstrukte exprimierten. Die Positivkontrollen exprimierten das SV40 große T-

3. Material und Methoden

Antigen als BD-Fusion und das humane p53 als AD-Fusion. Diese beiden Proteine interagieren stark und sollten daher gut auf allen Platten wachsen. Die Negativkontrollen exprimierten auch das humane p53 als AD-Fusion, aber statt des großen T-Antigens das humane Lamin C als BD-Fusion. Lamin C interagiert mit so gut wie keinen Proteinen, und daher sollten Klone, die p53-AD und Lamin C-BD exprimieren nur auf SD –Trp/-Leu-Plattenwachsen. Ausgehend vom Wachstum der Kontrollen wurde das Wachstum der anderen Klone auf der Platte eingeschätzt.

Eine zusätzliche Komponente in den mittleren Stringenzplatten war, wo angegeben, noch 3-AT, das ein kompetitiver Inhibitor des His3 Proteins ist. Einige Hefestämme exprimieren *His3* zu einem gewissen Hintergrundlevel, ohne dass die Transkription durch Proteininteraktion initiiert wurde und obwohl das endogene *His3* deletiert ist (Fields, 1993; Durfee et al., 1993; Van Criekinge et al., 1999). Grundsätzlich ist das Problem beim Einsatz von 3-AT, dass bei einer zu hohen Konzentration schwache Interaktionen nicht mehr detektiert werden, während eine zu geringe Konzentration Falschpositive liefert. Die eingesetzten 3-AT Konzentrationen sind für jeden Versuch empirisch zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden die Kontrolltransformanden, auf Platten mittlerer Stringenz ohne und mit steigenden Konzentrationen an 3-AT (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 und 15 mM), ausplattiert bei 30°C inkubiert. Die richtige Konzentration an 3-AT war in den Platten enthalten, wenn nach ungefähr 7 Tagen keine Kolonien wuchsen.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

Kultivierung von COS-, HEK293-T- und C2C12-Zellen

Sämtliche Zelllinien waren adhärent wachsende Monolayer-Zellen und wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS kultiviert. Tabelle 7 zeigt sonstige wichtige Daten zu diesen Zellen.

Tabelle 7 – Verwendete Säugerzellen

	COS	HEK293-T	C2C12
Bezugsquelle	DSMZ	DSMZ	ATCC
Herkunft	Affen-Nierenzellen	Humane Nierenzellen	Maus Myoblasten
Teilungsrate	35-48h	20-24h	8h
Morphologie	„Spiegelei“-förmig, keine Pseudopodien	Relativ klein, „Backstein“-förmig	Fibroblasten-förmig

Zellzahlbestimmung

Die Menge bzw. Konzentration an lebenden Zellen in einer Zellsuspension wurden nach Anfärbung der Zellen mit Trypan Blau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Färbung mit Trypan-Blau bietet den Vorteil, gleichzeitig die Rate an toten Zellen bestimmen zu können, da lebende Zellen in der Lage sind, den Farbstoff aktiv aus dem Zytoplasma zu pumpen und daher heller erscheinen als tote. Zur Zählung wurden 50µl Zellsuspension mit 50µl Trypan-Blau gemischt und in die Kammer getropft. Es wurden zwei Quadrate ausgezählt und die Zellkonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = N/n * V * 10^4$$

mit: N = Zellzahl in allen gezählten n Quadraten

n = Anzahl der gezählten Quadrate

V = Trypan-Blau-Verdünnungsfaktor (=2)

Transfektionsmethoden

Je nach Zelllinie wurden verschiedene Transfektionsmethoden angewandt, um Plasmid-DNA in diese Zellen einzuschleusen und damit die Expression der auf diesen Plasmiden enthaltenen Gene zu induzieren.

- DEAE/Dextran-Transfektion von Cos- und HEK293-T-Zellen

Die Transfektion wurde in 10cm-Platten durchgeführt, die zu 50-70% konfluent bewachsen waren. 10µg Plasmid-DNA wurden zunächst in 1140µl Transfektionspuffer verdünnt, und 60µl DEAE-Dextran (10mg/ml) wurden zugegeben. Nun wurden die Zellen dreimal mit vorgewärmtem Transfektionspuffer gewaschen und dann für 30min bei 37°C in dem DNA/DEAE-Dextran-Gemisch inkubiert. Nun folgte die Zugabe von 14ml Chloroquin-NS-Medium auf die Zellen. Eine weitere Inkubation von 2,5-3Std. bei 37°C folgte. Während dieser Zeit heftet sich die DNA an die Plasmamembran der Zellen an. Der nun folgende DMSO-Schock führt zu kleinen Perforationen der Plasmamembran, was zu einer Aufnahme der DNA führt. Hierzu wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und die Zellen für genau

3. Material und Methoden

2,5min mit 3ml Wachstumsmedium behandelt, das 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) enthält. Nach Absaugen dieses Mediums wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und schließlich wieder in normales Wachstumsmedium überführt. Nach 48Std. kann die Expression der transfizierten DNA untersucht werden.

Transfektionspuffer:	250mM NaCl 2,3 mM NaH ₂ PO ₄ 7,7mM Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O, pH7.5
DEAE/Dextran:	10mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert
Chloroquin(40mM):	20mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert
Chloroquin-NS-Medium:	10% NU-Serum 80µM Chloroquin in DMEM-Medium ohne Zusätze

- Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293-T-Zellen

Die Zellen (2×10^6) wurden am Tag vor der Transfektion in 6cm-Platten ausgesät. Vor der Transfektion wurden zunächst 15µg DNA in ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 438µl verdünnt und 62µl CaCl₂ zugegeben. Nach Mischen des Ansatzes wurden 500µl 2x HBS zugegeben und diese Mischung sofort auf die Zellen getropft. Nach 7-10Std. Inkubation bei 37°C wird das Transfektionsmedium durch Wachstumsmedium ersetzt. Nach 48 Std. kann die Expression der transfizierten DNA untersucht werden.

<u>2x HBS:</u>	50mM HEPES 10mM KCl 12mM α-D-Glukose 280mM NaCl 1,5mM Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O lösen; pH7.05; autoklavieren und bei -20°C lagern
<u>2M CaCl₂:</u>	in ddH ₂ O lösen; autoklavieren und bei -20°C lagern

- Lipofectamin™- Transfektion von C2C12 Zellen

Lipofectamine™ Reagens ist eine 3:1 (w/w) Liposomen-Mischung aus dem polykationischen Lipid 2,3-Dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium-trifluoroacetat (DOSPA) und dem neutralen Lipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) in durch eine Membran filtriertem Wasser.

Ein Tag vor der Transfektion wurden die C2C12 Zellen in einer Zahl von 2.5×10^4 Zellen pro Well in komplettem DMEM Medium ausgesät. Nach der Übernachtskultur bei 37°C war eine Konfluenz von ca. 60% zu sehen. Die zu untersuchende DNA wurde in DMEM mit 0.2% Serum gemischt (Solution A), parallel dazu wurde das Lipofectamine™ pur in DMEM Medium gelöst (Solution B). Beide Lösungen wurden zusammengegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit der Transfektionslösung bei Raumtemperatur (welche notwendig für die DNA-Liposomen-Komplex-Bildung ist), wurden die Zellen mit purem DMEM Medium gewaschen. Dann wurde pures DMEM Medium zu der Transfektionslösung hinzugefügt und diese Lösung auf die C2C12 Zellen verteilt. Nach 5 Std. Transfektionszeit bei 37°C wurde die Transfektionslösung durch normales DMEM (10% FCS) ersetzt und die Zellen bei 37°C über Nacht kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen in 0.2 % FCS Medium über 5 Std. gehungert. Schließlich wurden sie über 24 Std. mit 10 nM BMP2 stimuliert. Die Zellen wurden dann durch passive Lysepuffer lysiert und das Lysat bei -80°C eingefroren.

Zur Messung der *Photinus*-Luciferase wurden 20 µl Zellextrakt zu 100 µl Luciferase-Assay-Reagenz II pipettiert und die Biolumineszenz direkt im Röhren-Luminometer FB12 (Berthold Detection Systems GmbH) quantifiziert. Direkt danach wurde die *Photinus*-Reaktion durch die Zugabe von 100 µl Stop & Glo-Reagenz abgestoppt und gleichzeitig die *Renilla*-Luciferase aktiviert.

- PEI-Transfektion von HEK293-T Zellen

Das Prinzip der PEI-Transfektion ist gleich wie bei der oben beschriebenen Lipofectamin-Transfektion. Polyethylenimin (PEI, SIGMA) ist eine Komponente dieses Transfektionsreagenz. Es ist geeignet, eukaryotische Zellen zu transfizieren. HEK293-T oder C2C12 Zellen wurden in kompletten DMEM Medium ausgesät, so dass am Transfektionstag

3. Material und Methoden

eine Konfluenz von ca. 60% erreicht war. Die gewünschte DNA wurde in DMEM mit 0.2% Serum gemischt. Parallel wurde PEI in von Zusätzen freiem Medium in einem separaten Röhrchen gelöst. Beide Lösungen wurden dann zusammengemischt und bei RT inkubiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit der Transfektionslösung wurde DMEM ohne Zusätze hinzugefügt. Die Zellen wurden mit purem DMEM gewaschen und mit der Transfektionslösung 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung durch normales DMEM ersetzt und bei 37°C 24 – 48 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit konnten die Zellen für weitere Experimente genutzt werden.

PEI Lösung: 0.2 µg/µl- 2µg/µl PEI in ddH₂O

Die Lösung wird bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Kontrolle der Transfektionseffizienz.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden jeweils Kontroll-Plasmide mit dem GFP-Gen oder mit β-Galaktosidase-Gen transfiziert.

- GFP-Transfektionseffizienz-Kontrolle

Die Zellen wurden mit dem green fluorescent protein (GFP) Gen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz mit dem Fluoreszenz-Mikroskop geprüft.

- β-Galaktosidase assay

Die Effizienz der Zell-Transfektion wurde mit dem β-Galactosidase Assay kontrolliert. Dafür wurden die Plasmide, die das β-Galaktosidase Gen enthalten, in HEK293-T Zellen transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit 200 µl Glutaraldehyd (25%) in 5.5 ml PBS während 15 min bei 37°C fixiert. Danach wurde diese Lösung entfernt und die Zellen in 2.7 ml X-Gal Inkubationspuffer plus 300 µl einer 2% X-Gal Lösung inkubiert. Durch das Abbauen des X-Gal durch die β-Galactosidase kommt es zu einer Blaufärbung derjenigen Zellen, die die β-Galactosidase exprimieren. Das numerische Verhältnis der gefärbten Zellen im Vergleich zu den ungefärbten Zellen zeigt die Transfektionseffizienz an.

Fixierungslösung: 0.9% Glutaraldehyd in PBS

2% X-Gal: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid in Dimethylformamid

X-Gal Inkubationspuffer:	150 mM NaCl
	10 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.5
	1 mM MgCl ₂
	3.3 mM K ₃ Fe(CN) ₆
	3.3 mM K ₄ Fe(CN) ₆

3.2.4 Proteinchemische Methoden

Herstellung von Zell-Lysaten

Die HEK293T-Zellen wurden auf 6 cm-Zellkulturplatten ausgesät und die konfluenten Platten am nächsten Tag transfiziert. Durch Zugabe von je 200µl TNE Lysispuffer pro Platte wurden die Zellen lysiert und schließlich mittels eines Zellschabers in Eppendorf-Caps überführt. Nach 20 min rotieren bei 4°C und 10 Minuten abzentrifugieren der ungelösten Zellbestandteile wurden die Lysate, nach Versetzen mit 1 Vol. Laemmli-Puffer, direkt in einer SDS-PAGE aufgetragen (s.u.).

TNE-Lysispuffer:

20mM	Tris-HCl, pH 7.4
150mM	NaCl
1mM	EDTA
1%	TritonX-100

Arbeitslösung pro ml:

645µl	TNE Lysispuffer
40µl	PI (25x Protease-Inhibitoren) Complect®
10µl	100x PMSF
250µl	200mM NaF
50µl	200mM Na ₄ P ₂ O ₇
5µl	200mM Na ₃ VO ₄

Na₃VO₄ Vorbereitung:

Für eine 100 mM Lösung Natrium Orthovanadat wurden 184 mg in 9 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Zugabe von 25 µl 5M HCl kam es zum Gelbumschlag der Farblösung. Nach 5-minütiger Inkubation bei 90°C wurde die nun wieder farblose Lösung in eiskaltem Wasser gekühlt.

3. Material und Methoden

Dieser Vorgang musste so oft wiederholt werden, bis die Lösung nach Zugabe von 25 µl 5M HCl auch nach der 5-minütigen Inkubation bei 90°C gelb blieb. Das Volumen wurde dann zu 10 ml adjustiert und bei -20°C in 1 ml Fraktionen eingefroren.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht es, Proteine in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem Polyacrylamid-Gelsystem elektrophoretisch aufzutrennen. SDS ist ein stark negativ geladenes Detergens, das fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in Proteinen zerstört. Zur zusätzlichen Reduktion von Disulfidbrücken gibt man in den SDS-haltigen Probenpuffer (Laemmli-Puffer) β-Mercaptoethanol. Nach Anlagerung der SDS-Anionen an die Hauptkette der Proteine (ca. ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste), entsteht ein SDS-Protein-Komplex, dessen stark negative Ladung ungefähr der Masse des Proteins proportional ist. Die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins wird durch die erworbene stark negative Ladung des SDS vernachlässigbar.

Die denaturierten und mit 1 Vol. SDS-Probenpuffer versetzten Proteine werden zunächst in einem Sammelgel konzentriert und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in einer BIORAD-Minigel-Apparatur durchgeführt, zwischen 8 x 10 cm großen Glasplatten und 1.5 mm breiten Abstandshaltern (Spacern) bei 200 V für ca. 2 Std.

Tabelle 8 - Gelzusammensetzung eines 12.5 % Acrylamid-Gels

	Sammelgel	Trenngel
1.5 M Tris, pH8.8; 0.4%SDS	-	3 ml
0.5 M Tris, pH 6.8; 0.4% SDS	1 ml	-
AA/ Bis-AA(30 :0.8)	500 µl	5 ml
ddH ₂ O	2.5 ml	4 ml
40% APS	8 µl	20 µl
TEMED	8 µl	20 µl

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel entweder mit Coomassie Blau gefärbt oder auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

Coomassie-Blau Färbung

Das Gel wird nach der Gelelektrophorese ca. 30 min in der Färbelösung geschwenkt. In dieser Zeit lassen sich die Proteine bei einer Nachweisgrenze von 100 ng färben. Danach wird das Gel unter

mehrmaligem Waschen mit Entfärbelösung entfärbt, solange bis der Gelhintergrund klar erscheint und die Proteinbanden sichtbar werden. Zum Trocknen wird das Gel zwischen zwei Cellophanfolien gelegt.

Protein-Nachweis durch Western-Blot

- **Das Blotten:**

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine in einer BIORAD-Blotting-Apparatur in WB-Transfer Puffer auf eine Nitrocellulose Membran bei 100V für 1 Std geblottet.

- **Antikörper-Inkubation und Entwicklung:**

Je nach Antikörper wurde die Membran 1 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C in unterschiedlichen Mengen an BSA oder Magermilch geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Danach folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper wiederum über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem jeweils 10-minütigem Waschen der Membran in TBS-T-Puffer, folgte nun für 1 Std. bei RT die Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper, der gegen die konservierte Domäne des Erstantikörpers (F_c-Teil) gerichtet ist. Der Blot wurde danach wiederum dreimal 10 min in TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend in einer ECL (enhanced chemo luminescence)-Reaktion mit den beiden Entwicklungs-Lösungen A (1ml Luminol + 4,4µl Para-Cumarsäure) und B (1ml Tris-HCl pH8.8; 0,1M + 1µl H₂O₂) entwickelt: Die Peroxidase des Zweitantikörpers katalysiert zusammen mit Wasserstoffperoxyd die Reaktion von Luminol zu einem aktivierten Zwischenprodukt, Stickstoff und Licht. Diese dabei entstehende Chemilumineszenz wurde auf Röntgenfilmen (Kodak) festgehalten.

- **Strippen der Membran:**

Zur Entfernung der Antikörper von der Membran werden zu 10ml Stripping-Puffer 1,4µl β-Mercaptoethanol gegeben und der Blot in dieser Mischung 20 min bei 55°C inkubiert. Danach muss der Blot gründlich mit PBS gewaschen werden um schließlich wieder geblockt werden zu können.

Stripping-Puffer:

5 ml (5mM) Phosphatpuffer (NaH₂PO₄, 0.2 M)

20 ml (2%) SDS (20 %; 100 g SDS + 500 ml ddH₂O)

175 ml ddH₂O

4 Ergebnisse

4.1 Smads: die zytoplasmatischen TGF β Signal Transduktoren

Die Smad-Proteine sind die Hauptsignaleffektoren downstream der TGF β -Superfamilie der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren (Ser/Thr-Kinase-Rezeptoren), die das Signal bis zum Zellkern weiterleiten (Massagué 1998; ten Dijke & Hill 2004). In Vertebraten wurden bisher acht verschiedene Smad-Faktoren beschrieben, die homolog zu denen von *Drosophila* und *C. elegans* sind. Alle Smads sind sich strukturell ähnlich und zeigen im Sequenzalignment zwei hoch konservierte Domänen: die N-terminale Domäne bzw. MH1-Domäne und die C-terminale Domäne bzw. MH2-Domäne, die miteinander über eine variable Linkerregion verbunden sind.

Bezüglich ihrer Struktur und Funktion können die Smads in drei Klassen unterteilt werden; Die rezeptoraktivierten Smads (R-Smads) werden von aktivierten Rezeptoren an ihrem C-terminalen SSxS-Motiv phosphoryliert; Co-Smads (common mediator) assoziieren mit den aktivierten R-Smads; den inhibitorischen Smads (I-Smads) fehlt eine konservierte MH1-Domäne. Sie hemmen die TGF β -Signale. C-terminale SSxS Motive fehlen sowohl bei Co-Smads, wie auch bei I-Smads.

Die R-Smads können nochmals aufgrund ihrer Signalspezifität in zwei Subklassen unterteilt werden: Die AR-Smads (wie z.B. Smad2 und 3) übertragen Signale, die von TGF β und/oder Activin produziert werden, während die BR-Smads (z.B. Smad1, 5 und 8) BMP-Signale übermitteln. Diese Spezifität reflektiert sich in spezifischen Sequenzmerkmalen der L3-loops der R-Smads.

4.1.1 Klonierung und Charakterisierung der cDNAs für *emsmadB* und *emsmadC*

Im Rahmen der Charakterisierung von Transkripten, die in *Echinococcus multilocularis* über Trans-Splicing exprimiert werden (Brehm et al., 2000a), konnte die cDNA von *emsmadA* aus einer Spliced-Leader cDNA Bibliothek identifiziert werden. Die cDNA von *emsmadA* (Kroner, 2002) zeigte, dass das kodierte Protein eine hohe Homologie zu AR-Smads aus Vertebraten hat.

Für die Suche weiterer Smad-Moleküle in *E. multilocularis* wurde die Methode der degenerativen PCR ausgewählt. Dabei wurden verschiedene Smad-Sequenzen unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft miteinander verglichen, um konservierte Aminosäure-Sequenzen zu finden. Zwei hoch konservierte Regionen (VDGFTGP und FVKGWGA), die in der MH2 Domäne lokalisiert sind, wurden als Bindungsmotive für die Primer ausgewählt. Als Primer wurden zwei degenerative

Oligonukleotide (SM-DN: 5'-GTTGACGGNTTYACNGAYCC-3' und SM-DC: 5'-GCACCCCANCCYTTNACRAA-3') für die RT-PCR verwandt.

So wurde aus der aus dem Metacestoden gewonnenen cDNA ein Fragment in der erwarteten Größe von 380 Basenpaaren (bp) amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit der Hilfe des TOPO-TA-cloning kit (Invitrogen) kloniert und mit Vektor-spezifischen Primern mittels eines ABI prism 377 DNA sequencer (Perkin Elmer) sequenziert.

Die Sequenzanalyse von über 50 untersuchten Klonen zeigte zwei Fragmente, die sich von *emsmadA* unterschieden, aber hohe Homologie zu Smad-Faktoren aufweisen. Die zugehörigen Gene wurden *emsmadB* und *emsmadC* genannt. Die von ihnen kodierten Proteine erhielten jeweils den Namen EmSmadB bzw. EmSmadC. Diese hier vorgenommene Benennung, dass Gene mit Kleinbuchstaben bezeichnet werden und die von ihnen kodierten Proteine mit Großbuchstaben, wird über die ganze Arbeit weiter fortgeführt werden.

Die komplette Charakterisierung der Sequenzen von *emsmadB* und *emsmadC* erfolgte mittels der unter Kapitel 3.2.2.4 genauer erläuterten Methode der 5'- und 3'- rapid amplification of cDNA ends (RACE) Strategie. Dafür wurden im Fall von *emsmadB* für die 3' RACE die folgenden spezifischen Primer SB-DW1 (5'-TGTCTCGGTCTCCTCTCC-3') und das nested- Oligonukleotid SBDW2 (5'-GTGCACGATTAGGATGAGC-3') verwendet. Das Oligonukleotid SB-UP-TDW (5'-CCAACGTTAGTAGAGGTGAACTC-3') wurde für die touchdown PCR beim 5' RACE-Verfahren (RACE cDNA amplification kit) (Clontech) eingesetzt.

Bei *emsmadC* wurden in der 3' RACE der spezifische Primer SC-DW1 (5'-TCTGTCTCGGCCTCCTCAG-3') und das nested- Oligonukleotide SCDW2 (5'-CGGTCTGTAAAATTCCACCAG-3') genommen. Das Oligonukleotid SC-UP-TDW (5'-GTAGAGAGCAACACCGTGG-3') wurde für die touchdown PCR beim 5' RACE- Verfahren (RACE cDNA amplification kit) (Clontech) verwendet.

4.1.2 EmSmadB: cDNA und Aminosäuresequenz

Die cDNA von *emsmadB* hat vom Beginn der Sequenz bis zum Anfang des poly-A- Schwanzes eine Länge von 1.551 bp und enthält ein Leseraster von 437 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 48 kDa.

4. Ergebnisse

Anders als *emsmadA* (Kroner, 2002) wird *emsmadB* nicht über Trans-Splicing prozessiert, denn die *emsmadB* cDNA enthält keinen Spliced-Leader, was in der Abbildung 13 veranschaulicht wird.

In der Sequenzanalyse von EmSmadB zeigen sich deutlich die konservierte MH1 Domäne (Glu₃₀-Val₁₃₉) und die MH2 Domäne (Lis₂₄₁-Asn₄₁₃). Wie es typisch für die Smad Familie ist, sind beide Domänen durch eine variable Prolin-reiche Region, die so genannte „Linker“-Region, verbunden. Hier sind verschiedene putative Serin- und Threonin-Phosphorylierungstellen lokalisiert. Außerdem wurden zwei SP Motive (S₂₈₈P und S₂₂₁P) und ein PXS/TP Motiv (P₂₁₂ATP) identifiziert, die möglichen Phosphorylierungstellen für MAP Kinasen sind (Kretzschmar et al., 1997, 1999). Hingegen konnten PPXY-Motive, die Ubiquitinierungsstellen von Smad1 und Smad5 sind und die Degradation dieser Proteine über die WW-Domäne von Faktor Smurf1 ermöglichen (Zhu et al., 1999), in EmSmadB nicht identifiziert werden.

```
. . . . .
GCTATGTCAACTCCAATTTCTAGTCTAAATAGCCTTTTTCTCTTACTTCTCCTGCAGTTAAAAGGCTGCTCGGTTGGAAGCAAGGTGAC 0090
  M S T P I S S L N S L F S F T S P A V K R L L G W K Q G D 0029
. . . . .
GAGGAGGAAAAGTGGGCTGAAAAGGCTGTAGATTCTCTTGTGAAAAAGCTGAAAAGAAGAAAGGTGCTCTTGAGTCCCTGGAAAAGCT 0180
  E E E K W A E K A V D S L V K K L K K K K G A L E S L E K A 0059
. . . . .
CTGAGTAATCCAGGTGAACCAAGTGAATGCGTTACGATACCAAGATCTTTGGATGGCAGACTGCAGGTTTCACACCGCAAAGGTCTGCCG 0270
  L S N P G E P S E C V T I P R S L D G R L Q V S H R K G L P 0089
. . . . .
CATGTTATATACTGTCGTGTTGGCGTTGGCCTGATCTGCAGAGTCATCAGAGCTCAAGCCCTAGACATTTGTCGCTTTCCTTTTTCT 0360
  H V I Y C R V W R W P D L Q S H H E L K P L D I C R F P F S 0119
. . . . .
GCTAAGGAGAACGAAGTGTGCATAAACCCGTATCACTACAAGCGTGTGAAAGTCCAGTTTTGCCGCCGTTTTGGTTCCAAGGCATAGC 0450
  A K E N E V C I N P Y H Y K R V E S P V L P P V L V P R H S 0149
. . . . .
GAGTACCCTTGTATGGGGTCCGGTATCCGCTGGACCTCCAGCGGACTCAACAAGAATAAGCATAATGCCACTCCAGGCTGCTCCACTCTTG 0540
  E Y P C M G S V S A G P P A D S T R I S I M P L Q A A P L L 0179
. . . . .
GTGGCGTCATCTTATGGTCAGCCGACGTCAGGCGGACCTTCAATGCCTTACAACGTCACCTATCCCCAAGGTTTCACTCAGACCTCGCCT 0630
  V A S S Y G Q P T S G G P S M P Y N V T Y P Q G F T Q T S P 0209
. . . . .
CTCCCCCTGCTACTCCCATTAGCAGTGGTGCCTCCCCCTCTACCTCCCTTCTCCGCCCTCAGACACTCATCCAATAAACTACCAAGAA 0720
  L P P A T P I S S G A S P S T S L P P P S D T H P I N Y Q E 0239
. . . . .
CCAAAGTACTGGTGTGCTGATAGTCTACTACGAACATAAACACCCGTTGGAGAAGCCTTTTTTGCCTCTCAGCCAAGCATCGTGATCGAC 0810
  P K Y W C S I V Y Y E L N T R V G E A F F A S Q P S I V I D 0269
. . . . .
GGTTTCACAGACCCTTCAAACAACCTCGGACCGCTTCTGTCTCGGTCTCCTCTCCAATGTAAACCGCAATTCTACCATTGAAAACACTCGT 0900
  G F T D P S N N S D R F C L G L L S N V N R N S T I E N T R 0299
. . . . .
CGACACATTGGCAAGGGAGTTCACCTCTACTACGTTGGAGGAGAGGTGTTTGGGAATGCCTCTCAGACAGCAGCATCTTTGTGCAGTCG 0990
  R H I G K G V H L Y Y V G G E V F A E C L S D S S I F V Q S 0329
```

4. Ergebnisse

CGCAATTGCAACCACCGGCACAATTTTAATTTGACTACTGTATGCAAAATTCGCCAGGCTGTTTCGCTGAAGATTTTCTCAAACCAGGAG	1080
R N C N H R H N F N L T T V C K I P P G C S L K I F S N Q E	0359
TTTGCTCAGCTGCTGCGTCGTACAGTGAGCCACGGCTTCGAGGCAGTTTACGAGCTACCAAAATGTGCACGATTAGGATGAGCTTCGTG	1170
F A Q L L R R T V S H G F E A V Y E L T K M C T I R M S F V	0389
AAGGGTTGGGGTGCCGAATACCACCGCCAGGATGTACCTCGACACCCTGCTGGGTTGAGATCCACCTAAACGGCCCCCTCCAGTGGCTG	1260
K G W G A E Y H R Q D V T S T P C W V E I H L N G P L Q W L	0419
GACCGGTTCTCACTCAAATGGGCACTCCACGCAATCCCATCTCTTCTGTTTCCTGATTTCGTTTCTTTTCACCTCTTCCACTCTCCTCG	1350
D R V L T Q M G T P R N P I <u>S S V S</u> *	0437
ACTTTCTTCATTCTTTGCTTCCTCGTGTAAGTGCATTTATTAGGTGCTTGCCAAGCACCAGGGACAATCATGATGCGCCATCCAGACTTC	1440
ATTCTTCGCCCCCTCCCTTTTGACCCCGTGGATATCATTCCTGCCTTTTTAATCATTTCAAATGTAACGGTTCTTAATTATGTATGTAATG	1530
TAAGTCGCCTTACTACACAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGAA	1573

Abbildung 13 Nukleinsäuresequenz der *emsmadB* cDNA (oben) und abgeleitete Aminosäuresequenz (fett, unten). Die einzelnen Abschnitte sind wie folgt gekennzeichnet: EmSmadB MH2-Domäne: schwarzen Buchstaben vor grauem Hintergrund, MH1-Domäne: fette Umrahmung, Reste im Loop L3, die die Signalübertragungsspezifität determinieren: weiße Buchstaben vor schwarzem Hintergrund, konservierten Reste des nukleären Exportsignals: weiße Boxen, nukleäres Lokalisierungssignal in der MH1 Domäne: weißen Buchstaben vor grauem Hintergrund. S- und T-Reste, die als Phosphorylierungssubstrat dienen: schwarzes Boxen, SP- Motive, PxS/TP Motiv und C-terminales SSVS Motiv für Rezeptorphosphorylierung: unterstrichen, Stopcodon: *, putative Polyadenylierungsstelle: unterstrichen.

4.1.3 EmSmadC: cDNA- und Aminosäuresequenz

Analog zu *emsmadB* wurde nun *emsmadC* charakterisiert. Die *emsmadC* cDNA enthält ebensowenig wie die von *emsmadB* einen Spliced-Leader (Abbildung 14). Sie misst von ihrem Beginn bis zum Anfang des PolyA Schwanz 1606 bp. Das offene Leseraster von *emsmadC* endet an der Nukleotidposition 1185-1187 mit einem TAG Stopcodon. 419 nicht-kodierende Nukleotide, die eine Polyadenylierungsstelle enthalten, finden sich bis zum Poly-A Schwanz. *emsmadC* umfasst 350 Codons, die für ein 37 kDa Protein, EmSmadC, kodieren.

Das Startcodon liegt 135 Nukleotide vom cDNA 5'-Ende entfernt, 111 Basenpaare stromaufwärts findet sich ein „in-frame“ TAG Stopcodon. Dies deutet darauf hin, dass das komplette Leseraster charakterisiert wurde.

4. Ergebnisse

ACGGGCTATTGTTAACCCAGGATAGTTTAACTCGCTGTGTTACCATCCCTCGACCCTTGATGAAAACGCAGACCACGAAGTCCTTGGTGGT	0090
*	
ACACCCACAGTGGTCTTTTCCACTCCTCTAGTGTCCCTCTGGAATGGGTCCCTCCTATCGCTCATCTGGTGTGACTCGACTACTCAAAGC	0180
M G P S Y R S S G D D S T T Q S	0016
AGCAGTCCGCACACTGGCTCCATGCTCAGTACCTGTACATGGCCTGAAAAACAGCATGGCAATAAAACCGTCTCCGCCATCAACCTCG	0270
S <u>S P</u> H T G S M L S Y L S H G L K N S M A I K P <u>S P</u> P S T S	0046
TCGCCGACGCTAACAAAGCTCGGCAAACCTGCTCGAAAAACGACGGGAGCGGGAACGGGGAAGTTGGATGAGGGTGGGGAGTCCCGCCAGGC	0360
<u>S P</u> T L T S S A N C S K T T G A G T G K L D E G G E S S A G	0076
CCTGCTGGAACGACGGACGCTCTGAGTGCACGGCACC GGGTAGCAGCAGCAGTGGCGGGGTAGTGGGGATGCCACCTCCACCGCGGT	0450
P A G T T D A L S C T A P G S S S S G G G S G D A T S T G G	0106
CTTGACTCCCGTTCCTCCGGCGCTCTCTCAAGGGATGAGAACTGCCTCAGTGGATAATGACACTATGGACACTGGTCTAGACACTG	0540
L D S R <u>S P</u> G A L S R D E N C L S E D N D T M D T G L D T L	0136
AACGACATAACAATCGGTGACTCGGCGCACACCTCAGTGGCCTACCAAGAGCCAGACTGCTGGTGTCTCAGTGTACTACTACGAGACGAAT	0630
N D I T I G D S A H T S V A Y Q E P D C W C S V Y Y Y E T N	0166
ACGCGAGTCGGGACACCTTCTACTGTGCTTCTCCCTGTCTCACCGTTGACGGCTTTACCGACCCTCTCGCGAGAACCGCTTCTGTCTC	0720
T R V G D T F Y C A S P C L T V D G F T D P S R E N R F C L	0196
GGCCTCCTCAGTAACGTTAATCGGGCCACCAGATGAACTCACTCGCCGGCACATTGGCCACGGTGTGGTCTCTACTACATTGGAGGC	0810
G L L S N V N R G H Q I E L T R R H I G H G V A L Y Y I G G	0226
GAGGTTTTTGCCGAGTGCCTGAGTGACAGCGCAATCTTCGTCCAGTCGCCTAACTGTAACCACATGTACAACCTGGCATCCGGCTACGGTC	0900
E V F A E C L S D S A I F V Q S P N C N H M Y N W H P A T V	0256
TGTAATAATCCACCAGGTTGCAATTTGAAAATCTTCAATAACCAACACTTTGCGGCACCTGCTGAAAGAGAGTGTCAACAATGGCTTCGAG	0990
C K I P P G C N L K I F N N Q H F A A L L K E S V N N G F E	0286
GCGGTCTACGCGCTTACTAACATGTGCACATCCGAATCAGCTTTGTCAAGGGCTGGGGCGCCGAATACAGGCGTCAAACAGTGACAAGC	1080
A V Y A L T N M C T I R I S F V K G W G A E Y R R Q T V T S	0316
ACGCCCTGCTGGATAGAGCTTCAATTTGAACGGTCCCTTCAATGGTTGGACCGTGTCTTAGTCAAATGGGCTCTCCTAACCATCCATGC	1170
T P C W I E L H L N G P L Q W L D R V L S Q M G S P N H P C	0346
ACGTACGTAAGTAGACCAAATCAAATTCACCCCGAACCCAGCCGCAAAGAAGGCTTATTGCTTCCACCACATACTCCCCCTTCTCCCG	1260
<u>T S V S</u> *	0350
CCCCCTCGCGCCATTCAATGTCTGACTGCACCCTGTTTTTCCCAACTCTTGTGCGCAATGCATTTCGCTTTTTTCTCGACTGCTTCTTT	1350
TTACCCAACCGCCGAAACTGCTTCCACATATCTCCCTCCGCCCTCACTTGGCAACTGTGCTTATAACATGTACGTACGTGTGCGTGTTC	1440
GAATGTGGGCCTGACTCCTCCACTCGCGTAGGACTTTGTTTCACTTCCGTTTTCTGCACGCTTCTGTATGACTCAACTTCTCTCCCT	1530
CTCTGTCATACACATACTCCCTCTCTTTTATGTATTCTTTAATGATTAATAAAGACGGATAATATGCTGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1620

Abbildung 14 - Nukleinsäuresequenz der *emsmadC* cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (Fett, unten) der cDNA von *emsmadC* sind dargestellt. Die EmSmadC MH2-Domäne ist durch schwarze Buchstaben vor grauem Hintergrund gekennzeichnet. Reste in dem Loop L3, die die Signalübertragungsspezifität determinieren, sind in weißen Buchstaben vor schwarzem Hintergrund dargestellt; die konservierten Reste des nukleären Exportsignals sind mit weißen Boxen markiert. Die SP-Motive sind unterstrichen. Ebenso ist das C-terminale TSVS Motiv für die Rezeptorphosphorylierung unterstrichen. Die Sternchen (*) markieren Stopcodons. Die putative Polyadenylierungsstelle in der Nukleotidsequenz ist unterstrichen.

4.1.4 Strukturelle Charakterisierung von EmSmadB und EmSmadC

4.1.4.1 EmSmadB - Homologien

Vergleicht man in der Datenbank die Aminosäuresequenz von EmSmadB mit den bislang bekannten Smads anderer Species, so findet sich die höchste Homologie mit SmSmad1 aus *S. mansoni* (80 % identisch, 84% ähnlich). Wie erwartet, war die Homologie im Bereich der MH1 Domäne (97% Identität) und der MH2 Domäne (94% Identität) am höchsten und sehr viel niedriger in der Prolin-reichen Linker-Region (34% Identität). Abbildung 15 führt die Aminosäuresequenzen der Smad-Proteine vergleichend auf.

EmSmadB	MSTPISSLN S LFSEFTSPAVKRLLGWKGDE---E E KWAEKAVDSL V VKLLKKKKGALE S LEKALS N PG E PS E	68
SmSmad1	MSTPISSLN S LFSEFTSPAVKRLLGWKGDE---E E KWAEKAVDSL V VKLLKKKKGALE A LE R ALS N PG E PS E	68
SmSmad2	MS-----L F TSP P P V VKRL I SYIK-EGSDKEEKW K EKAV K SLV K R L K N GT- O L D E L E R A L V S O D P S T R	61
HsSmad1	MN-----V T S L F S E F T S P A V K R L L G W K G D E---E E KWAEKAVD A L V V K L L K K K G A M E E L E K A L S C P G O P S N	63
HsSmad3	MS-----S I L P F T P P I V K R L L G W K K G E O N G O E E K W C E K A V K S L V K L K K T- G O L D E L E K A I T T O N V N T K	61

EmSmadB	C V T I P R S L D G R L O V S H R K G L P H V I Y C R V R W P D L Q S H H E L K P L D I C R F P F S A K E N E V C I N P Y H Y K R V E S P V	139
SmSmad1	C V T I P R S L D G R L O V S H R K G L P H V I Y C R V R W P D L Q S H H E L K P L D F C R F P F S A K E N E V C I N P Y H Y O R V E S P V	139
SmSmad2	C V T I P R S L D G R L O V A O K K G L P H V F Y C O L W R W P D L H T O H E L R P L A T C E Y S F O S K R D E V C I N P Y H Y R R I E N P V	132
HsSmad1	C V T I P R S L D G R L O V S H R K G L P H V I Y C R V R W P D L Q S H H E L K P L E C E F F F G S K O K E V C I N P Y H Y K R V E S P V	134
HsSmad3	C I T I P R S L D G R L O V S H R K G L P H V I Y C R L W R W P D L H S H E L R A M E L C E F F A F N M K D E V C V N P Y H Y O R V E T P V	132

Abbildung 15 – Aminosäuresequenz-Alignment der MH1 Domänen von Smad-Faktoren. Gezeigt wird ein Vergleich der MH1 Domäne von EmSmadB mit der von SmSmad1 und SmSmad2 aus *S. mansoni* (Beall et al., 2000; Osman et al., 2001) und mit dem humanen Smad1 (HsSmad1) und Smad3 (HsSmad3) (Riggins et al., 1996). Reste, die mindestens in drei Sequenzen konserviert sind, sind in weiß auf schwarzem Hintergrund geschrieben. Die Sternchen markieren die Stelle, wo sich das nukleäre Lokalisierungssignal befindet.

Im Vergleich mit den Smads von Säugetieren zeigt EmSmadB die höchste Homologie zum humanen Smad1 (62% Identität, 67% Ähnlichkeit), einem Protein der BR-Smad-Gruppe.

4.1.4.2 EmSmadC - Homologien

EmSmadC zeigt die höchste Homologie zu AR-Smads der TGF β /Activin-Untergruppe, nämlich zu SmSmad2 von *S. mansoni* (82% Identität), zu Smad3 von *Danio rerio* (71% Identität) und zu XSmad3 von *Xenopus laevis* (70% Identität). Diese Homologien liegen hauptsächlich im Bereich

der MH2 Domäne. Zu dem N-terminalen Ende von EmSmadC fanden sich keine homologen Proteine in der Datenbank. Ähnlich wie EmSmadA besitzt EmSmadC keine konservierte MH1 Domäne.

```

EmSmadC      DCWCSTVYYEINRVRGDTFYCASPCLTVDGFDPSPREN-RFCLGLLSNVNRGHQIELTRRHIGHGVALYY 223
SmSmad1      KYWCSIVYYEINRVRGEAFNASQLSIIIDGFTDPSNNSDRFCLGLLSNVNRNSTIENTRRHIGKGVHLYY 328
SmSmad2      EYWCSIVYYEINRVRGDTFYCASPCLTVDGFDPSPREN-RFCLGLLSNVNRGHQIELTRRHIGKGVHLYY 522
HsSmad1      KHWCSTVYYEINRVRGEAFHASSTSVLVDGFTDPSNKNRFCLGLLSNVNRNSTIENTRRHIGKGVHLYY 338
HsSmad2      AFWCSIVYYEINRVRGDTFYCASPCLTVDGFDPSPNSE-RFCLGLLSNVNRNATVEMTRRHIGRGRVLYY 340
HsSmad3      AFWCSIVYYEINRVRGDTFYCASPCLTVDGFDPSPNSE-RFCLGLLSNVNRNAAVELTRRHIGRGRVLYY 298
    
```

```

EmSmadC      IGGEVFAECLSDSAIFVQSPNCNHYWHPATVCKIPPGCNLKIFNNQHFALLKESVNNGFEEAVYALTN 293
SmSmad1      VGGEVFAECLSDSSIFVQSPNCNYHHNHPATVCKIPPGCNLKIFNNQEFALLSRTVHHGFEEAVYELTK 398
SmSmad2      IGGEVFAECLSDSAIFVQSPNCNYMYKWHHPATVCKIPPGCNLKIFNNQEFANLLTENVTKGFEEAVYSLTN 592
HsSmad1      VGGEVFAECLSDSSIFVQSPNCNYHHGFHPATVCKIPSGCSLKIFNNQEFALLAQSVDHGFEEAVYELTK 408
HsSmad2      IGGEVFAECLSDSAIFVQSPNCNQRVWHPATVCKIPPGCNLKIFNNQEFALLAQSVDHGFEEAVYQLTR 410
HsSmad3      IGGEVFAECLSDSAIFVQSPNCNQRVWHPATVCKIPPGCNLKIFNNQEFALLAQSVDHGFEEAVYQLTR 368
    
```

```

EmSmadC      MCTIRISFVKGWGAEYRRQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLDRLVLSQMGSPNHPCTSVS 350
SmSmad1      MCTIRISFVKGWGAEYRRQTVTSTPCWVETHLNGPLQWLDRLVTQMGTPRNPITSSVS 455
SmSmad2      MCTIRISFVKGWGAEYRRQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLDRLVLSQMGSPDHPCTSVS 649
HsSmad1      MCTIRISFVKGWGAEYRRQTVTSTPCWIELHLHGPLQWLDKVLVTQMGSPHNPITSSVS 465
HsSmad2      MCTIRISFVKGWGAEYRRQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLDKVLVTQMGSPSVRCSSMS 467
HsSmad3      MCTIRISFVKGWGAEYRRQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLDKVLVTQMGSPSIRCSSVS 425
    
```

Abbildung 16 – Aminosäuresequenz-Alignment der MH2 Domänen von Smad-Faktoren. Vergleichend sind die Sequenzen der MH2 Domäne der verschiedenen Species dargestellt: Neben der Aminosäuresequenz von EmSmadC finden sich die Sequenzen von SmSmad1 und SmSmad2 aus *S. mansoni* (Beall et al., 2000; Osman et al., 2001) und von den humanen HsSmad1-3 (Riggins et al., 1996). Reste, die mit der Sequenz von EmSmadC übereinstimmen, sind in weiß auf schwarzem Hintergrund geschrieben.

4.1.5 Strukturelle Charakterisierung von EmSmadB und EmSmadC

4.1.5.1 Die Phosphorylierungsstelle

An dem C-terminalen Ende von EmSmadB wurde ein typisches R-Smad SSVS-Motiv identifiziert, welches als Phosphorylierungsstelle der TGFβ-Rezeptoren vom Typ I dient. Diese Phosphorylierungsstelle findet sich nur bei den R-Smads, nicht aber bei den Co-Smads oder inhibitorischen Smads.

EmSmadC enthält auch eine solche Phosphorylierungsstelle. Diese zeigt aber nicht das typische SSVS-Motiv sondern ein TSVS Motiv, was bislang nur bei SmSmad2 von *S. mansoni* beschrieben wurde (Beall et al., 2000; Osman et al., 2001). Durch den Besitz solcher Phosphorylierungsstellen können EmSmadB und EmSmadC zusammen mit EmSmadA in die Subfamilie der R-Smads

eingruppiert werden. Somit ist eine direkte Interaktion dieser EmSmads mit TGFβ-Rezeptoren wahrscheinlich.

4.1.5.2 Der L3-Loop

Für die spezifische Interaktion zwischen den R-Smads und den Typ I-Rezeptoren konnten zwei Aminosäurenreste im Bereich des L3 loop der MH2 Domäne bei den Säuger-Smads als entscheidend identifiziert werden (Chen et al., 1998; Lo et al., 1998). So findet sich bei den zur Untergruppe der BR-Smads (welche direkt mit dem BMP Typ I Rezeptor interagieren) gehörenden Smads1, 5 und 8 die kanonische Region YHRQDV.

Dagegen zeigen die zur Untergruppe der AR-Smads gehörenden Säuger-Smads2 und 3 (welche direkt von TGFβ- und Activin Typ I-Rezeptoren phosphoryliert werden) die konservierte Region YRRQTV (Chen et al., 1998; Lo et al., 1998). Die entscheidenden Aminosäuren sind jeweils durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben. Wie es in Abbildung 17 gezeigt wurde, ist die Region des L3 Loop in EmSmadB mit den Aminosäuren Histidin (H) und Aspartat (D) identisch mit der der BR-Smad-Untergruppe bei Säugern, was die Vermutung nahe legt, dass EmSmadB an der Signaltransduktion von BMP Liganden beteiligt ist.

Die L3 Loop Region in EmSmadC weist genau wie die humanen R-Smads, welche an der TGFβ/Activin Signal-Kaskade teilnehmen (AR-Smads), die entscheidenden Aminosäurereste Arg₂₇₈ (R) und Thr₂₈₁ (T) auf (Abbildung 17, *). Das lässt vermuten, dass EmSmadC ähnlich wie EmSmadA (Zavala-Góngora et al, 2003) an einer TGFβ/Activin Signal-Kaskade beteiligt ist.

			*	*							
Smad2	FVKGWGA	EY	R	RQ	T	VTSTPCWIELHLNGPLQWLDKVL	TQMGSP	SVRC	SSMS	} AR-Smads	} R-Smad
Smad3	FVKGWGA	EY	R	RQ	T	VTSTPCWIELHLNGPLQWLDKVL	TQMGSP	SIRC	SSVS		
Mad	FVKGWGA	EY	H	RQ	D	VTSTPCWIEIHLNGPLQWLDKVL	TQMGSP	HNAI	SSVS	} BR-Smads	
Smad1	FVKGWGA	EY	H	RQ	D	VTSTPCWIEIHLNGPLQWLDKVL	TQMGSP	HNPI	SSVS		
Smad5	FVKGWGA	EY	H	RQ	D	VTSTPCWIEIHLNGPLQWLDKVL	TQMGSP	LNPI	SSVS		
Smad4	FVKGWGP	PDY	P	RQ	S	IKETPCWIEIHLHRAQLLDEV	LHTMPI	ADPQLD		Co-Smad	
Smad6	FAKGGW	PCY	S	RQ	F	ITSCPCWLEILLNNPR				} I-Smads	
Smad7	FVKGGW	QCY	T	RQ	F	ISSCPCWLEVIFNSR					
EmSmadA	FVKGGW	GADY	R	RQ	T	ITSTPCWIELHLNEPLKWLDRVL	QEMGSP	STPCT	SSVS	} AR-Smads	} R-Smads
EmSmadC	FVKGGW	GAEY	R	RQ	T	VTSTPCWIELHLNGPLQWLD	RVLSQMGSP	NHPCT	SSVS		
EmSmadB	FVKGGW	GAEY	H	RQ	D	VTSTPCWVEIHLNGPLQWLD	RVLTQMG	TPRNP	ISSVS	BR-Smad	

Abbildung 17 - Vergleich der L3 Loops und der Phosphorylierungsstellen der EmSmads. Vergleichend wird der L3 Loop aller Untergruppen der Smads verschiedener Species mit dem L3 Loop der EmSmads dargestellt. Die Smads

4. Ergebnisse

1-7 stammen von den Säugern, „Mad“ ist ein BR-Smad von *D. melanogaster*. Die jeweils für die Signalspezifität entscheidenden Aminosäuren sind mit einem Sternchen hervorgehoben. Die Phosphorylierungsstelle ist unterstrichen.

4.1.5.3 Strukturelemente für die Bindung an SARA (Smad Anchoring for Receptor Activation)

Ein wichtiger Interaktionspartner der Säuger-Smads Smad2 und Smad3 (nicht aber von Smad1, 5 oder 8) ist das Protein „Smad Anchoring for Receptor Activation“ (SARA). SARA bindet an die AR-Smads und ermöglicht so die Interaktion mit dem aktivierten Typ I TGF β Rezeptor (Tsukazaki et al., 1998). Als für die Interaktion mit SARA verantwortlich wurden fünf Subtypen-spezifische Aminosäurereste in der MH2 Domäne von Smad2/3 identifiziert (Wu et al., 2000). Alle diese Aminosäuren finden sich auch an der entsprechenden Stelle in der MH2 Domäne von EmSmadC. In der MH2 Domäne von EmSmadB hingegen wurde nur eine dieser Aminosäuren an der entsprechenden Stelle identifiziert (Abbildung 18). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass bislang kein BR-Smad identifiziert werden konnte, welches mit SARA interagiert.

4.1.5.4 Das nukleäre Export- (NES) und Lokalisierungssignal (NLS)

Zwei weitere Motive sind wichtig für die Funktion der R-Smads: eines davon ist das nukleäre Exportsignal (NES), das in der MH2 Domäne lokalisiert ist und aus mehreren nicht-polaren Aminosäuren in charakteristischer Anordnung besteht. Das andere Motiv ist ein basisches nukleäres Lokalisierungssignal (NLS), das sich in der MH1 Domäne befindet (Xiao et al., 2001). Eine NES-Sequenz konnte in der MH2 Domäne sowohl von EmSmadB als auch von EmSmadC identifiziert werden. Ein NLS-Motiv hingegen konnte nur in der MH1 Domäne des EmSmadB gefunden werden (da EmSmadC keine MH1 Domäne besitzt) (Abbildung 18).

```
EmSmadA      KNWCSVFFYYELN*NRVGDV*FHASKPK*FTVDGFTAPSLGTERFSLGGLSHVNRPPQVDM*TRRHIGRGLN*L*LY
EmSmadB      KYWCSIVYYELN*TRVGEAF*FASQPS*IVIDGFTDPSNN*SDRFCLGLLSNVNRNSTIENT*TRRHIGKGVHLYY
EmSmadC      DCWCSV*YYE*LN*TRVGD*TFYCAS*PCL*IVDGF*TDPSN*REN*-R*FCLGLLSNVNR*GHQ*IE*TRRHIG*HGV*ALYY
SmSmad1      KYWCSIVYYELN*NRVGEAF*NASQ*LS*IIIDGFTDPSNN*SDRFCLGLLSNVNRNSTIENT*TRRHIGKGVHLYY
SmSmad2      EYWCSL*YYE*M*NRVGD*TFH*CSSE*CL*IVDGF*TDPNRHN*-R*FCLGLLSNVNR*GHQ*IE*TRRHIGKGV*KLYY
HsSmad1      KHWCSIVYYELN*NRVGEAF*HAS*ST*SVI*VDGFTDPSNN*KNRFCLGLLSNVNRNSTIENT*TRRHIGKGVHLYY
HsSmad3      AFWCSIS*YYELN*Q*RVGE*TFH*ASQ*PS*MT*VDGFTDPSN*SE*-R*FCLGLLSNVNR*AAVE*TRRHIG*RGV*LYY
```

4. Ergebnisse



Abbildung 18 – Aminosäuren-Sequenzvergleich der MH2 Domänen verschiedener Smad Proteine. Vergleich der MH2 Domänen von EmSmadA, EmSmadB und EmSmadC (*E. multilocularis*) mit SmSmad1 und SmSmad2 (*S. mansoni*) und HsSmad1 und HsSmad3 (*H. sapiens*). Reste, die mindestens in 3 Sequenzen konserviert sind, sind in weiß auf schwarzem Hintergrund geschrieben. Die hydrophoben Aminosäuren der NES sind durch Punkte, die für die Interaktion zwischen AR-Smads mit SARA wichtigen konservierten Aminosäuren durch Sternchen hervorgehoben.

4.1.6 Charakterisierung der chromosomalen Loci von *emsmadB* und *emsmadC*

Unter Verwendung spezifischer Primer gegen *emsmadB* bzw. *emsmadC* konnte durch Amplifizierung mehrerer überlappender Fragmente der gesamte chromosomale Locus beider Faktoren charakterisiert werden.

Der chromosomale Locus von *emsmadB* umfasst insgesamt 2910 Basenpaaren und setzt sich aus 4 Exons (mit einer Länge zwischen 222 bis 415 bp) und 3 Introns (mit einer Länge zwischen 156 bis 892 bp) zusammen. Der chromosomale Locus von *emsmadC* besteht aus 4816 bp, welche sich in 6 Exons (mit einer Länge zwischen 77 bis 323 bp) und 5 Introns (mit einer Länge zwischen 209 bis 1175 bp) aufteilen. Eine Übersicht der chromosomalen Loci bietet Tabelle 9.

emsmadB erweist sich mit seinen drei Introns als weniger komplex in der Genstruktur als die Säuger Smads, welche normalerweise mindestens 6 Introns besitzen (Huang et al., 2000). Ein Intron von *emsmadB* (Intron 2) liegt in der am wenigsten konservierten Linker Region und kann deshalb nicht mit einem Intron entsprechender Lage der Säuger-Smad-Gene verglichen werden. Die Lage der Introns 1 und 3 von *emsmadB* hingegen entspricht genau der Lage der Introns der Säuger-Smad1-Gene (Huang et al., 2000).

4. Ergebnisse

emsmadC weist mit fünf Introns die komplexeste Genstruktur der bislang drei identifizierten *Echinococcus*-Smad-Gene auf. Im Vergleich zu den Säuger-Genen *smad2* und *smad3*, welche 10 bzw. 8 Introns beinhalten, zeigt sich hier jedoch eine geringere strukturelle Komplexität.

Die Introns 5, 4 und 3 in *emsmadC* entsprechen in ihrer Lokalisation im Gen jeweils genau den Introns 10, 9 und 8 im Säuger-Smad2-Gen. Das Intron 2 in *emsmadC* ist nur 2 Codons downstream von der Lage des Introns 6 vom Säuger-Smad2 entfernt. Das Intron 1 von *emsmadC* liegt in der am wenigsten konservierten N-terminalen Region und lässt sich deshalb keinem entsprechenden Intron in Smad2 zuordnen.

Alle Introns der *Echinococcus* Smads zeigen die kanonischen 5'-GT-AG-3' Dinukleotide in der 5' Spleiß-Donor Sequenz bzw. der 3' Spleiß-Akzeptor Sequenz.

Zusammengenommen legt die oben erläuterte Konservierung von Spleißstellen nahe, dass *emsmadB* und *emsmadC* einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung mit den Säuger-Genen für Smad1 und Smad2 teilen.

emsmadB

Exon Nr.	Stelle	Länge (bp)	5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	Intron-länge (bp)	Unterbrochene Aminosäure
1	1-415	415	CCA G gta atc	ttt tag TT TTG	156	V (139)
2	572-847	276	TCA G gta tga	ctc cag AC ACT	311	D (231)
3	1159-1380	222	AAG G gtg agt	ttt aag GA GTT	892	G (305)
4	2273-2670	398				

emsmadC

Exon Nr.	Stelle	Länge (bp)	5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	Intron-länge (bp)	Unterbrochene Aminosäure
1	1-77	77	CTC AG gtt ggt	tgg tag C TAC	822	S (26)
2	900-1222	323	CTA G gtg agt	att tag AC ACA	1175	D (134)
3	2398-2643	246	ATT G gtt agc	ttt tag GC CAC	502	G (216)
4	3146-3283	138	CCA G gtt agc	ttt tag GT TGC	502	G (262)
5	3786-3930	145	TAC AG gtg agt	ttt cag G CGT	209	R (310)
6	4140-4260	121				

Tabelle 9 – Die Exon-Intron-Organisation in *emsmadB* und *emsmadC*. Die obere Tabelle bezieht sich auf *emsmadB*, die untere auf *emsmadC*. Dargestellt werden die Stellen im Gen, wo die Introns die mRNA unterbrechen. Die Codons

4. Ergebnisse

des Leserasters in der Exon-Intron-Übergangsregion sind aufgeführt. Dabei sind die Sequenzen der Exons in Großbuchstaben und die der Introns in Kleinbuchstaben geschrieben. Die Länge der jeweiligen Exons bzw. Introns wird in bp angegeben.

4.1.7 Nachweis der Parasiten-Spezifität der identifizierten Smad-Faktoren

Zur Bestätigung, dass die bisher identifizierten Smad-Faktoren *E. multilocularis* zuzuschreiben sind und nicht einer Kontamination der ursprünglichen cDNA mit Wirts-RNA entspringen, wurden verschiedene PCR-Experimente aus isolierter chromosomaler DNA von Wirt- und Parasitenmaterial durchgeführt. Hierfür wurde chromosomale DNA zum einen aus *in vitro* kultivierten Metacestoden, zum anderen aus der Leber nicht infizierter *Meriones* isoliert. Dann wurden Gen-spezifische PCRs für *emsmadB* (SBDw1 5'-TGTCTCGGTCTCCTCTCC-3' und SBUp1 5'-GTGGCTCACTGTACGACGC-3'), *emsmadC* (SCDw1 5'-ATGGGTCCTCCTATCGCTC-3' und SCUp4 5'-CAGTTTGCCGAGCTTGTTAG-3') und für ein zuvor identifiziertes β -Tubulin-Gen aus *Meriones* (Brehm et al., 2000b) durchgeführt. Fragmente des β -Tubulin-Gens konnten nur im PCR-Ansatz mit der *Meriones*-DNA amplifiziert werden, nicht aber im Ansatz mit der Parasiten-DNA. *emsmadB* und *emsmadC* wiederum ließen sich nur aus dem Parasitenmaterial, nicht aber aus dem Wirtsmaterial amplifizieren (EmSmadB ca. 1150 bp und EmSmadC ca. 980 bp). Diese Resultate bestätigten, dass die identifizierten Faktoren EmSmadB und EmSmadC parasitären Ursprungs sind und keiner Kontamination entstammen.

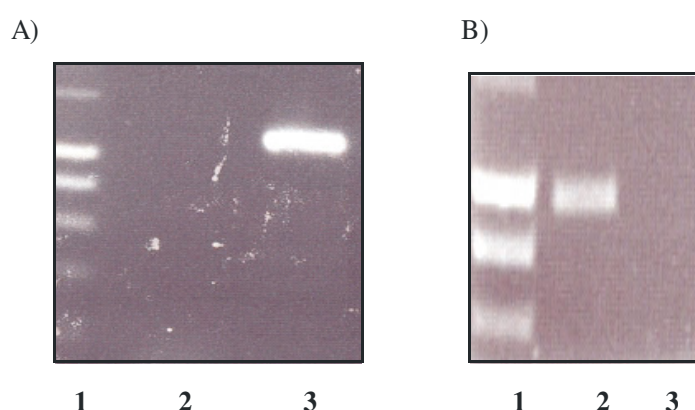


Abbildung 19- Amplifizierung der EmSmad-Faktoren aus chromosomaler *Echinococcus*-DNA. A) *emsmadB*: Marker (Spur 1); β -Tubulin-Gen-Fragmente (Spur 2); *emsmadB* (Spur 3); B) *emsmadC*: Marker (1); *emsmadC* (Spur 2); β -Tubulin-Gen-Fragmente (Spur 3). Die Amplifizierung von *emsmadB* (ca. 1150bp) und *emsmadC* ca. 980 bp) aber nicht von *Meriones* β -Tubulin-Gen-Fragmente aus chromosomaler *Echinococcus*-DNA bestätigt, dass *emsmadB* und *emsmadC* *E. multilocularis*-Gene sind.

4.1.8 Analyse der Expression von *emsmadB* und *emsmadC* in verschiedenen Isolaten von *E. multilocularis*

Die Expression der identifizierten EmSmad-Faktoren wurde in Larvenmaterial von drei unterschiedlichen Isolaten von *E. multilocularis* untersucht. Hierfür wurden cDNA-Präparate aus H95 (natürliches Isolat aus Süd-Deutschland), K188 (natürliches Isolat aus Süd-Österreich) und MP1 (klinisches Isolat aus Süd-Deutschland) verwendet. RT-PCR Experimente mit spezifischen Primern gegen *emsmadB* (SBdw3 5'-AAAAGGCTGCTCGGTTGGA-3' und SBtup1 5'-AGTGTCTGAGGGCGGAGGAA-3') und *emsmadC* (SCexdw1 5'-CTACCTGTCACATGGCCTG-3' und SCup5 5'-GTCGGTAAAGCCGTCAAC-3') zeigten in allen 3 Isolaten klare Banden der erwarteten Länge (ca. 650 bp B.w. ca.480 bp) für beide *E. multilocularis*-Gene. Somit konnte kein Unterschied in der Expression der EmSmads in den 3 verschiedenen *E. multilocularis* Isolaten gesehen werden. Aber es konnte gezeigt werden, dass die EmSmads in allen drei Isolaten exprimiert werden.

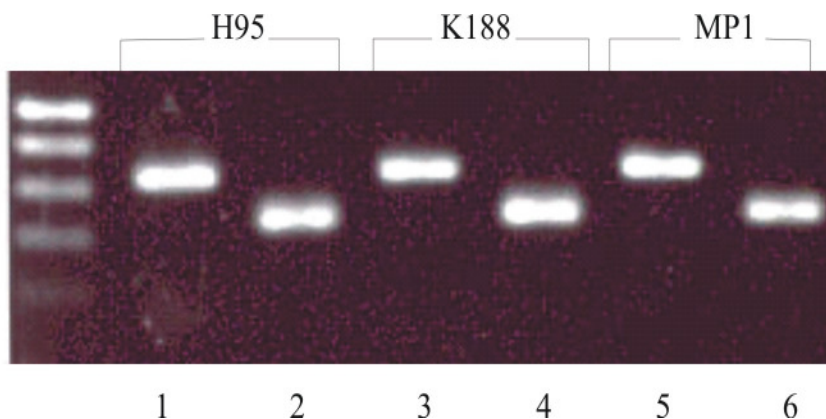


Abbildung 20 - Expression von *emsmadB* und *emsmadC* in verschiedenen *Echinococcus*-Isolaten. Die Expression der *Echinococcus* Smad-Gene wurde in cDNA drei verschiedener *Echinococcus* Isolate (H95, K188, MP1) untersucht. Spur 1, 3 und 5: Expression von *emsmadB*; Spur 2, 4, und 6: Expression von *emsmadC*. Expression von *emsmadB* und *emsmadC* in H95 cDNA: Spur 1 und 2; in K188: Spur 3 und 4; in MP1: Spur 5 und 6. Ganz links: Marker.

4.1.9 Analyse der Expression der *emsmad*-Gene in zwei verschiedenen *E. multilocularis* Larvenstadien.

Die Funktion der Smad-Faktoren aus Säugern ist häufig abhängig vom determinierten zellulären Status der Säugerzellen. Um herauszufinden, ob auch in *E. multilocularis* eine stadiumspezifische

Expression der EmSmads stattfindet, wurden zwei verschiedenen *E. multilocularis* Larvenstadien, dem Metacestoden und dem Protoskolex, untersucht. Dazu wurde zuerst die Gesamt-RNA aus *in vitro* kultivierten Metacestoden-Vesikeln und Protoskolices gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Mit der gleichen Menge an cDNA von den beiden Larvenstadien wurden dann jeweils genspezifische PCRs mit den Primern gegen *emsmadB* (SBdw3 5'-AAAAGGCTGCTCGGTTGGA-3' und SBtup1 5'-AGTGTCTGAGGGCGGAGGAA-3') und *emsmadC* (SCexdw1 5'-CTACCTGTCACATGGCCTG-3' und SCup5 5'-GTCGGTAAAGCCGTCAAC-3') gefahren, die klare Banden einer erwarteten Länge von ca. 650 Basenpaaren bzw. ca. 480 Basenpaaren ergaben. Somit findet sich in *E. multilocularis* keine larvenstadien-spezifische Expression der beiden identifizierten EmSmads Faktoren.

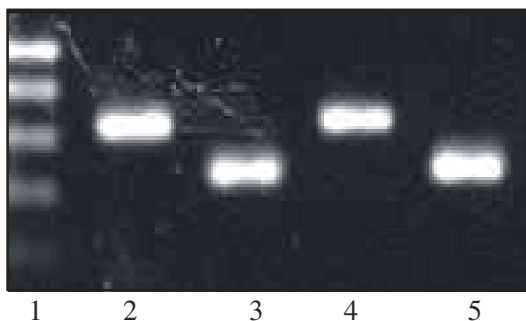


Abbildung 21- Expression der *emsmad*-Gene im Metacestoden und Protoskolex. Die Expression der *Echinococcus*-Smad-Gene wurde im Metacestoden und Protoscolex geprüft. Marker (1); Expression im Metacestoden von *emsmadB* (2) und *emsmadC* (3), sowie im Protoscolex von *emsmadB* (4) und *emsmadC* (5)

4.1.10 Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen der *Echinococcus*-Smad-Faktoren

Protein-Protein-Interaktionen sind wichtig für die Funktion von Smads als Mediatoren der TGF β -Signale. Nachdem die R-Smads durch den aktivierten Typ I Rezeptor an ihren konservierten C-terminalen Serin-Resten phosphoryliert wurden, assoziieren sie mit Co-Smads. Dieser Komplex transloziert zum Zellkern. Nach dem Eintritt in den Zellkern kann der R-Smad/Co-Smad-Komplex mit verschiedenen Partnerproteinen (Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren) interagieren um, abhängig vom jeweiligen Zelltyp, bestimmte Gene an- oder auszuschalten (Moustakas et al. 2001; Attisano & Wrana 2002). Biochemische Daten zeigen, dass Smad2, -3 und -4 Proteine in monomeren und verschiedenen oligomeren Zuständen vorliegen können. So findet sich im Grundzustand Smad2 hauptsächlich als Monomer, während Smad3 in multiplen oligomeren

Formen vorkommt. Smad4 wiederum liegt hauptsächlich als Homooligomer, wahrscheinlicher jedoch als Trimer vor (Jayaraman & Massagué 2000).

Two Hybrid Assays können genutzt werden, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, eine vermutliche Interaktion zu bestätigen oder um Interaktionsdomänen zu definieren. Die Kapazität der Säuger-Smad-Faktoren, homomere und heteromere Komplexe zu bilden, konnte erfolgreich über die Yeast Two Hybrid Technik untersucht werden (Abdollah et al., 1997; Hata et al., 1997; Wu et al., 1997). Mittels der Yeast Two Hybrid-Methode wurde daher auch in dieser Arbeit die Kapazität der EmSmad-Faktoren zur Komplexbildung untersucht.

4.1.10.1 Herstellung der EmSmad-Konstrukte in den pGBKT7 und pGADT7 Vektoren und Durchführung der Yeast Two Hybrid-Experimente

Das MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 (Clontech) ist ein Gal4-basiertes Two-Hybrid System, das mittels eines Transkriptions-Assays Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* in Hefe-Zellen detektiert. Wenn beide zu untersuchenden Proteine in der Hefezelle miteinander interagieren, werden vier Reportergene (HIS3, ADE2, lacZ, MEL1) angeschaltet. Falls die beiden verwendeten Proteine nicht miteinander interagieren, wird die Transkription der Reportergene nicht aktiviert.

Für die EmSmad Interaktionsuntersuchungen mussten alle *Echinococcus* Smads in beide Yeast Two Hybrid Expressionsvektoren pGADT7 (AD) und pGBKT7 (BD) kloniert werden. Dafür wurden zunächst die kompletten Leseraster-Sequenzen der beiden identifizierten EmSmads (EmSmadB und EmSmadC) sowie des schon bekannten EmSmadA (Kroner 2002) mittels spezifischer Primer aus *Echinococcus* cDNA vollständig amplifiziert. Durch spezifische Schnittstellen konnten die DNA-Fragmente in frame dann mit der GAL4 Aktivierungsdomäne des pGADT7-Vektors bzw. mit der GAL4 Bindungsdomäne des pGBKT7 kloniert werden. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzanalysen überprüft und als EmSmadA-BD, EmSmadB-BD, EmSmadC-BD (im pGBKT7-Vektor) bzw. EmSmadA-AD, EmSmadB-AD, EmSmadC-AD (im pGADT7 Vektor) bezeichnet. Für die Herstellung der verschiedenen Konstrukte kamen folgende Primer zum Einsatz:

Für EmSmadA-AD:

- SAAD-DW (5'- AGTTAATCGATTAATGTCCAATATTGCTCT-3') mit einer Schnittstelle für *ClaI*

4. Ergebnisse

- SAAD-UP (5'- ATGTAGGATCCTTTAGCTGACAGAGGTGCA-3') mit einer Schnittstelle für *Bam*HI

Für EmSmadA-BD:

- SABD-DW (5'- AGTTACCATGGTAATGTCCAATATTGCTCT-3') mit einer Schnittstelle für *Nco*I
- SAAD-UP (s. o)

Für EmSmadB-AD/BD:

- SBAD-DW (5'- GAATTCAGGCTGCTCGGTTGGAAGCAAGGTGAC-3') mit einer Schnittstelle für *Eco*RI
- SBAD-UP (5'- AAAGAGGATCCTCAGGAAACAGAAGAGATGGG-3') mit einer Schnittstelle für *Bam*HI

Für EmSmadC-AD/BD:

- SCAD-DW (5'- GAATTCATGGGTCCTCCTATCGC -3') mit einer Schnittstelle für *Eco*RI
- SCAD-UP (5'- GGATCCGTCTAGCTTACTGACGTGCATG -3') mit einer Schnittstelle für *Bam*HI

Zur Untersuchung, ob und wie die EmSmad-Proteine untereinander interagieren, wurde jeweils ein EmSmad-Protein entweder mit dem selben Protein oder mit einem der beiden anderen EmSmads als Bindungs- bzw. Aktivierungskonstrukt in AH109 Hefezellen co-transfiziert und auf SD/-Leu/-Trp-Agarplatten plattiert. Da die AH109 Hefezellen für Leucin und Tryptophan auxotroph sind, und die beiden für die Klonierung benutzten Vektoren jeweils nur für die Synthese einer Aminosäure das entsprechende Gen tragen, konnten auf den SD/-Leu/-Trp-Agarplatten nur diejenigen Hefezellen wachsen, die beide Vektoren aufweisen. Von diesen Doppeltransformanten wurde nun auf SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade-Mangelagarplatten überführt und dort über 4 bis 6 Tage bei 30°C unter hoher Stringenz kultiviert. Da die Hefezellen auch für Histidin und Adenin auxotroph sind und die Synthese dieser Aminosäuren nur initiiert werden kann, wenn die beide in die Vektorkonstrukte einklonierten Smad-Proteine interagieren, können unter diesen Bedingungen nur diejenigen Hefezellen wachsen.

4.1.10.2 Die verschiedenen Oligomierzustände der EmSmads

Autointeraktion des wildtypischen EmSmadA

Bei der Untersuchung des wildtypischen EmSmadA zeigte sich nur Wachstum im Aminosäurenmangelmedium, wenn EmSmadA-AD mit EmSmadA-BD kotransfiziert wurde. Bei einer Kotransfektion mit den anderen beiden EmSmad-Proteinen kam es zu keinem Wachstum. Somit interagiert EmSmadA mit sich selbst, es bildet Homodimere (Siehe Tabelle 10).

EmSmadB findet sich im Grundzustand als Monomer

Für die Proteine EmSmadB (Wildtyp) und EmSmadC (Wildtyp) konnte weder eine Autointeraktion noch eine Interaktion mit einem der anderen beiden Proteine nachgewiesen werden (Siehe Tabelle 10).

EmSmadC als Transkriptionsaktivator

Bei EmSmadC zeigte sich, dass bei einer Kotransfektion von EmSmadC-BD mit einem leeren AD-Vektor es dennoch zu einem Wachstum im SD/LT⁺AH⁻ - Mangelmedium kam. Dies läßt auf eine per se Transkriptionsaktivierung von EmSmadC bei Expression im BD-Vektor schließen. Durch diese Eigenschaft lassen sich jedoch mittels der Yeast Two Hybrid-Methode nur beschränkt Aussagen über Interaktionen von EmSmadC machen.

	Wt EmSmadA-AD	Wt EmSmadB-AD	Wt EmSmadC-AD
Wt EmSmadA-BD	+++	-	-
Wt EmSmadB-BD	-	-	-
Wt EmSmadC-BD	n. d.	n. d.	n. d.

Tabelle 10 - Interaktionsfähigkeit von EmSmadA, EmSmadB und EmSmadC. Wildtypische Versionen der *Echinococcus* Smads wurden in Frame mit der Gal4 Aktivierungs-Domäne oder mit der Gal4 DNA Bindungs-Domäne fusioniert. Es wurde das Wachstum der Hefe AH109-Doppeltransformanten nach drei Tagen Inkubationszeit beurteilt. (-) bedeutet kein Wachstum, Wachstum bei niedrigen, mittleren und hohen Stringenz-Bedingungen sind durch +, ++ bzw. +++ gekennzeichnet; n. d. bedeutet, dass die Interaktion aufgrund der Eigenschaft zur Reporter-Gen-Aktivierung nicht bestimmt werden konnte (s.o.).

4.1.10.3 Interaktionsfähigkeit der MH2 Domänen der EmSmad-Faktoren

Die hauptsächliche Funktion der Smad MH2-Domäne ist es, Protein-Protein Interaktionen zu ermöglichen. Die MH2 Domäne ist verantwortlich für die Homo- aber auch für die Heteromerisierung der Smad-Faktoren. Diese Funktion wird, wie es in Säuger Smads schon gezeigt werden konnte, durch eine Bindung der MH1 Domäne des gleichen Proteins an die MH2-Domäne inhibiert (Itoh et al., 2000; Lutz & Knaus, 2002).

Die Beobachtung, dass für das wildtypische EmSmadB keine Interaktionsfähigkeit nachgewiesen werden konnte, könnte auf das Vorhandensein beider MH-Domänen in diesem Protein beruhen. In monomeren Grundzustand könnte die MH2-Domäne durch intramolekulare Interaktion mit der MH1-Domäne maskiert werden, wie es schon vorher für Säuger-Smads beschrieben worden war (Itoh et al., 2000; Lutz & Knaus, 2002). Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Analyse der MH2 Domänen der EmSmads mittels Yeast Two Hybrid durchgeführt. Zunächst mussten hierfür die Sequenzen, welche für die MH2-Domäne der jeweiligen EmSmads kodieren, mit spezifischen Primer amplifiziert und in die Yeast Two Hybrid-Vektoren mittels einer entsprechenden Schnittstelle kloniert werden:

Für SAMH2 AD/BD:

Dw (5'-GGCCATGGAGGCCTGGTGCTCTGTCTTCTACTACG-3')

Up (5'-ATGTAGGATCCTTTAGCTGACAGAGGTGCA-3')

Für SBMH2 AD/BD:

Dw (5'-GGCCATGGAGGCCTACCAAGAACCAAAGTACTGG-3')

Up (5'-AAAGAGGATCCTCAGGAAACAGAAGAGATGGG-3')

Für SCMH2 AD/BD:

Dw (5'-GGCCATGGAGGCCTACCAAGAGCCAGACTGCTGGTGC-3')

Up (5'-GGATCCGTCTAGCTTACTGACGTGCATG-3').

Unter hohen Stringenz-Bedingungen konnten die MH2 Domänen aller drei *Echinococcus* Smads sowohl homodimerisieren als auch heterodimerisieren, was in Tabelle 11 veranschaulicht wird. Dabei zeigte sich, dass die Autointeraktionsfähigkeit jeder MH2 Domäne am stärksten ausgeprägt war. Eine mittelstarke Interaktion war außerdem zwischen der MH2 Domäne von EmSmadC und

4. Ergebnisse

der von EmSmadA sowie zwischen der MH2 Domäne von EmSmadB und der von EmSmadC nachzuweisen.

	EmSmadA MH2-AD	EmSmadB MH2-AD	EmSmadC MH2-AD
EmSmadA MH2-BD	+++	n. d.	++
EmSmadB MH2-BD	n. d.	+++	++
EmSmadC MH2-BD	n. d.	n. d.	+++

Tabelle 11 - Homo- und Heterodimer-Bildung der MH2 Domänen von EmSmadA, EmSmadB und EmSmadC. Die einzelnen MH2 Domänen der *Echinococcus* Smads wurden in frame mit der Gal4 Aktivierungs-Domäne oder mit der Gal4 DNA Bindungs-Domäne fusioniert. Es wurde das Wachstum der Hefe AH109-Doppeltransformanten nach drei Tagen Inkubationszeit beurteilt. n. d. bedeutet, dass diese Konstellation nicht untersucht wurde. Wachstum bei niedrigen, mittleren und hohen Stringenz-Bedingungen sind durch +, ++ bzw. +++ gekennzeichnet.

Die Interaktionsexperimente der MH2-Domänen der EmSmad-Faktoren zeigen, dass die schon bei den Säuger-Smads beobachtete Funktion der MH2-Domäne zur Protein-Protein- Interaktion auch in *Echinococcus* Smads konserviert ist.

4.1.10.4 Die aktivierungsabhängige Interaktion der EmSmads

Funaba und Mathews (2000) beschrieben, dass die Rezeptor-abhängige Phosphorylierung, also die Aktivierung der R-Smads, über spezifische Mutationen an den C-terminalen Serinen nachgeahmt werden kann. Bei den Smads ist hierfür eine Austauschmutation der letzten zwei bzw. drei Serine im SSXS-Motiv gegen Glutamat zur Überführung in den aktivierten Zustand nötig. Analog wurden dazu in der vorliegenden Arbeit für die EmSmads folgende Mutanten hergestellt: EmSmadA* (TEVE anstatt TSVS), EmSmadB* (EEVE anstatt SSVS) und EmSmadC* (TEVE anstatt TSVS). Dabei wurden folgende upstream-Primer für die Herstellung der Konstrukte eingesetzt:

- SA-MUP (5'-CTCGATGGATCCTTTACTCGACCTCGGTGCACGGAGTCGAGGG-3')
- SB-MUP (5'-GGATCCATCACTCAACCTCCTCGATGGGATTGCGTGGAGTGCCC-3')
- SC-MUP (5'-GGATCCGTCTACTCTACTTCCGTGCATGGATGGTTAGGAGAG-3')

Die downstream-Primer entsprechen den in Kapitel 4.1.10.1.2 angegebenen Primern.

4. Ergebnisse

Die mutierten Smad-Formen wurden wie vorher beschrieben mit der Gal4 Aktivierungs- und der DNA-Bindung Domäne für Yeast Two Hybrid-Assays fusioniert. Es stellte sich die Frage, ob EmSmadB, welches als in wildtypischer Form keinerlei Interaktionsfähigkeit gezeigt hatte, durch eine solche Mutation in den konstitutiv aktivierten Zustand überführt werden könnte und so eine Interaktion mit sich und/oder den anderen Smads ermöglicht werden könnte. Unter hoch stringenten Bedingungen zeigte EmSmadB* eine starke Homodimer-Bildung; Die Heterodimerbildung mit EmSmadA* war unter mittleren Stringenzbedingungen nachweisbar.

Auch mit dem wildtypischen EmSmadB kam es zur einer Interaktion, die aber ebenfalls schwächer als die schon beschriebenen Homodimerbildungen bei EmSmadA war. Mit den anderen beiden wildtypischen EmSmads konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (

Tabelle 12).

	EmSmadB*-AD	EmSmadCwt -AD
EmSmad A wt - BD	-	n. d.
EmSmad A* - BD	++	n. d.
EmSmad B wt - BD	++	n. d.
EmSmad B* - BD	+++	-

Tabelle 12 - Homo- und Heterodimer-Bildung von EmSmadA* und EmSmadB*, den konstitutiv aktivierten Formen der *Echinococcus* Smads . Die konstitutiv aktivierten Formen von EmSmadA und EmSmadB wurden in frame mit der Gal4 Aktivierungs-Domäne oder mit der Gal4 DNA Bindungs-Domäne fusioniert. Es wurde das Wachstum der Hefe (AH109)-Doppeltransformanten nach drei Tagen Inkubationszeit beurteilt. (-) bedeutet kein Wachstum, Wachstum bei niedrigen, mittleren und hohen Stringenz-Bedingungen sind durch +, ++ bzw. +++ gekennzeichnet; n. d. bedeutet, dass diese Versuchskonstellation nicht durchgeführt wurde.

4.1.11 Phosphorylierung von *Echinococcus* EmSmadA und EmSmadB durch Säuger-TGF β - und BMP-Rezeptoren

Um herauszufinden, ob die EmSmads als Substrat von Mitgliedern der TGF β Rezeptor Typ I Familien dienen, wurde die komplette Sequenz der wildtypischen Versionen von EmSmadA und EmSmadB jeweils allein oder in Kombination mit BMP- und TGF β - Typ I Rezeptoren in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-T) exprimiert. Um aktive Formen des BMP Typ I Rezeptor (BRIa) zu erhalten, wurde der BMP Typ II-Rezeptor (BRII) mit BRIa co-exprimiert und mit 20 nMol exogenem humanen bone morphogenetic protein 2 (BMP2) 30 Min stimuliert. Im Fall des TGF β Typ I Rezeptor (TRI) wurde, wie zuvor von Nakao et al. beschrieben, die konstitutiv aktive Mutante (TRI-ka) eingesetzt (Nakao et al., 1997).

Wie Abbildung 22 zeigt, konnten sowohl EmSmadA als auch EmSmadB erfolgreich in HEK293-T Zellen exprimiert werden.

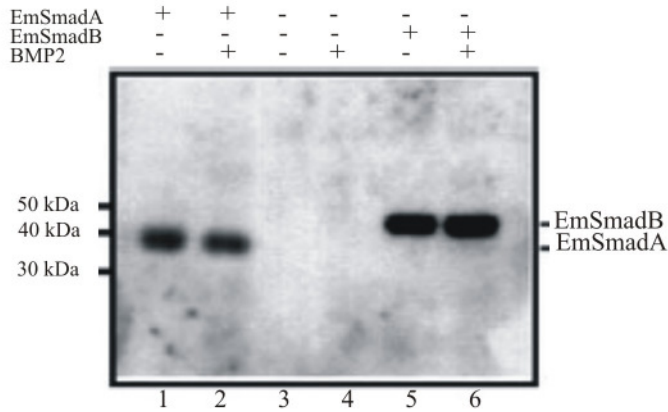
Die Zugabe von exogenem BMP2 hatte dabei keinen Einfluss auf die Expression der beiden *Echinococcus*-Faktoren. Um zu untersuchen, ob die EmSmad-Faktoren durch humane Rezeptoren phosphoryliert werden können, wurde ein zuvor beschriebener Anti-Phospho-Smad-Antikörper eingesetzt (Perrson et al., 1998). Dieser Antikörper richtet sich gegen die phosphorylierte Form von Smad1. Phosphoryliert sind hier die beiden C-terminalen Serine im SSXS-Motiv. Wenn EmSmadA und EmSmadB in HEK Zellen ohne aktivierte Formen von BRIa- oder TRI-Rezeptoren exprimiert wurden, konnte selbst bei Anwesenheit von exogenem BMP2 keine Phosphorylierung der *Echinococcus* Smads nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Menge der endogenen TGF β -Rezeptoren in den HEK293-T Zellen nicht ausreichte, um die *Echinococcus* Faktoren zu phosphorylieren. Nach der Co-Expression von EmSmadA oder EmSmadB mit BRII- und BRIa- Rezeptoren hingegen zeigte sich eine starke Phosphorylierung beider EmSmads. Diese Phosphorylierung konnte nicht durch die exogene Zugabe von BMP2 beeinflusst werden. Wurden die *Echinococcus* Smads nur mit jeweils einem Rezeptor exprimiert, kam es zu keiner Phosphorylierung. Auch die Zugabe von BMP2 hatte darauf keinen Einfluss (Abbildung 22).

Diese Resultate zeigen deutlich, dass die beide *Echinococcus* Smads mit dem humanen BMP Rezeptor-System interagieren können. In Anbetracht der schon bekannten Signal-Transduktions-Wege der TGF β Rezeptoren kann man schlussfolgern, dass der humane BRIa Rezeptor die EmSmads direkt phosphoryliert. Dabei war offensichtlich die basale Aktivierung des Plasmid-kodierten BRIa durch BMPRII genügend, um die *Echinococcus* Smads vollständig zu phosphorylieren, so dass die Zugabe von BMP2 keinen weiteren Effekt hatte.

4. Ergebnisse

Die Co-Expression von EmSmadA zusammen mit dem humanen konstitutiv aktiven TRI-ka resultierte ebenfalls in einer Phosphorylierung dieses Proteins. Doch war diese schwächer ausgeprägt als die Phosphorylierung durch BRIa. EmSmadB hingegen wurde nicht durch den aktivierten TRI-ka phosphoryliert (Abbildung 22).

A)



B)

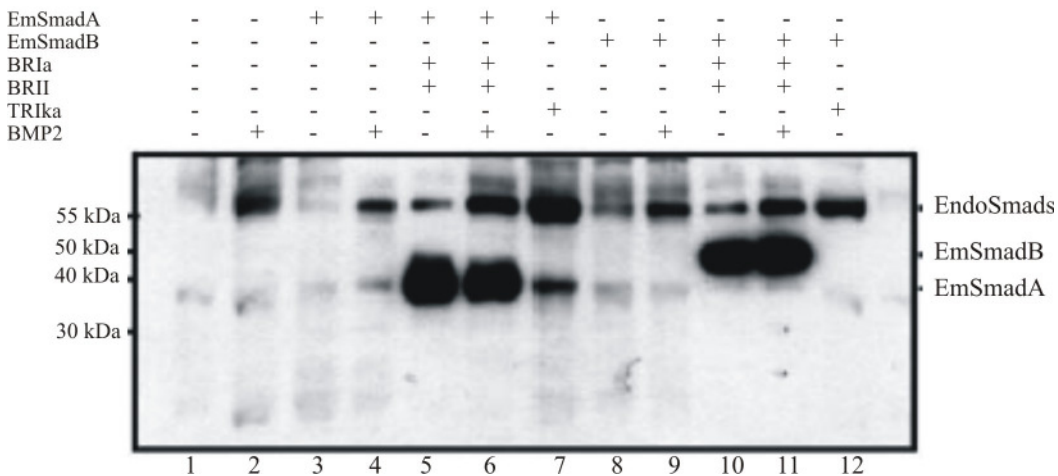


Abbildung 22 – Expression der *Echinococcus* Smads in HEK293 Zellen (A) und ihre Interaktion mit humanen Rezeptoren der TGF β -Superfamilie (B). (A) EmSmadA (Spur 1, 2; Molekulargewicht des Exprimierten Proteins: 38 kDa) und EmSmadB (Spur 5, 6; 50 kDa) wurden in HEK 293 Zellen ohne (Spur 1, 5) oder mit (Spur 2, 6) exogen hinzugefügtem BMP2 exprimiert. Als Kontrolle wurden HEK 293 Zellen mit den pCMV-HA Plasmid transfiziert (Spur 3 ohne, Spur 4 mit hinzugefügtem BMP2). Der zelluläre Extrakt wurde in einem 12.5% Akrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und mit einem Anti-HA Tag Antikörper immunchemisch gefärbt. (B) EmSmadA, EmSmadB, die humanen Typ I- und Typ II-BMP Rezeptoren (BRI und BRII) und die konstitutiv aktive Form des humanen TGF β Typ I Rezeptors (TRI-ka) wurden in HEK 293 Zellen in verschiedenen Kombinationen exprimiert. Humanes BMP2 wurde zugegeben (+) oder nicht (-). Der zelluläre Extrakt wurde in einem 12.5% Akrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und mit einem Anti-Phospho-Smad1-Antikörper (Perrson et al., 1998) immunchemisch gefärbt. Die humanen (hu.) Smads und *Echinococcus* Smads sind rechts angezeigt, die Markergröße links.

Bei der Aktivierung von EmSmadB durch die BMP-Rezeptoren entsprechen die Ergebnisse den Erwartungen. Es zeigt sich, dass EmSmadB nicht nur von seiner Struktur her der Gruppe der BR-Smads zugeordnet werden kann, sondern auch funktionell dieser Gruppe angehört, da von den BMP-Rezeptoren ausgehende Signale weitergeleitet werden können. Zum anderen lässt sich aus der Beobachtung der Funktionalität von EmSmadB in einem heterologen, humanen Expressionssystem ableiten, dass *E. multilocularis* sehr wahrscheinlich ein BMP-ähnliches Signalübertragungssystem exprimiert.

Interessant war bei diesen Experimenten die Beobachtung, dass EmSmadA nicht nur über TGF β -Signale aktiviert wurde, sondern auch durch BMP Signale. Nach der strukturellen Analyse wird EmSmadA aufgrund seines spezifischen Interaktions-Motivs (Loop L3) der Gruppe der AR-Smads zugeordnet, welche üblicherweise durch TGF β -Rezeptoren und nicht, wie in diesem Experiment, durch BMP-Rezeptoren phosphoryliert werden.

4.1.12 Phosphorylierung von *Echinococcus multilocularis* EmSmadC

Die Funktionsanalyse von EmSmadC gestaltete sich schwieriger. Eine Reihe von Experimenten mit humanen Rezeptoren in verschiedenen Kombinationen war hierzu nötig. Dafür wurden die humanen BMP- und TGF β -Typ I Rezeptoren alleine oder in Kombination mit den Typ II-Rezeptoren (BR II oder TR II) eingesetzt.

EmSmadC-Expression in Säugerzellen

EmSmadC wurde samt pCMV-Myc Vektor in HEK 293 Zellen exprimiert. Zur Bestätigung der Expression wurden Zellextrakte über ein 12,5% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf einen Nitrozellulose-Membran transferiert und schließlich mit Anti-Myc-Antikörpern markiert. Eine klare Bande von ca. 50 kDa Größe (Abbildung 23) zeigte die Expression des *Echinococcus* Proteins in den HEK 293-Zellen. Die Größe des Proteins war ungefähr 10 kDa größer als das theoretisch erwartete Molekulargewicht (ca. 40 kDa), was möglicherweise durch posttranskriptionale Modifikationen hervorgerufen wurde. Eine exogene Zugabe von TGF β 1 führte zu keiner Veränderung (Abbildung 23, Spur 6). EmSmadA, welches eine Größe von etwa 40 kDa aufweist, wurde als Kontrolle ohne (Abbildung 23, Spur 3) oder mit TGF β 1 (Abbildung 23, Spur 4) exprimiert.

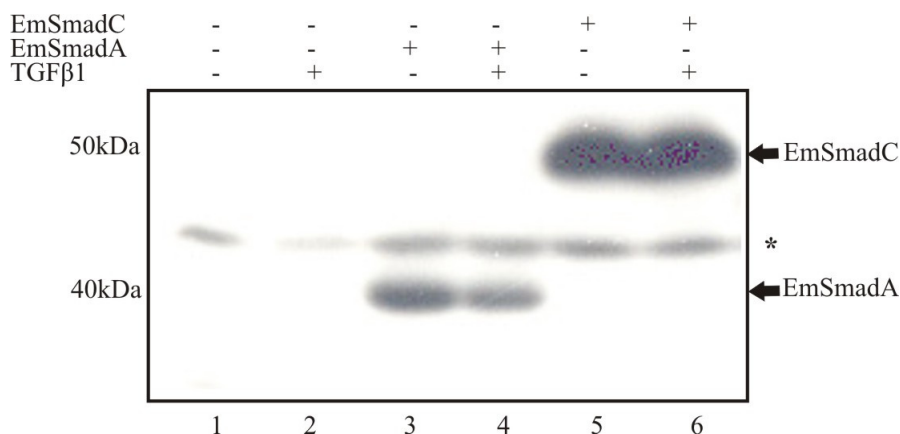


Abbildung 23 - EmSmadC Expressionskontrolle. Die Expression von EmSmadC in HEK293 Zellen wurde mit einem Myc-Antikörper, der das Myc-EmSmadC Fusionsprotein erkennt, bestätigt. Als Expressionskontrolle wurde Myc-EmSmadA exprimiert, welches ein ähnliches theoretisches Molekulargewicht wie EmSmadC hat. Als Negativkontrolle wurden die HEK293-Zellen mit pCMV-Myc transfiziert. Spur 1, 3 und 5: ohne Zugabe von TGFβ1; Spuren 2, 4, und 6: mit Zugabe von TGFβ1; Spuren 1 und 2: pCMV-Myc Vektor; Spur 3 und 4: EmSmadA; Spur 5 und 6: EmSmadC. * Unspezifische Bande.

EmSmadC ist an einem TGFβ-Signal-Übertragungssystem beteiligt.

Es wurde beschrieben, dass jeder TGFβ Typ I Rezeptor in seiner konstitutiv aktiven Form unabhängig von der Zugabe eines Liganden oder der Co-Stimulation durch einen Typ II-Rezeptor eine Phosphorylierung der Smads herbeiführen kann (Wieser et al., 1995). Die oben beschriebene Beobachtung, dass EmSmadA durch die konstitutiv aktive Form des TRI ohne Beiwirken des Typ-II-Rezeptors phosphoryliert wird, steht im Einklang dazu.

Bei EmSmadC jedoch führte die Co-Expression mit dem humanen konstitutiv aktivierten TGFβ Typ I Rezeptor (TRI-ka) in HEK293-T Zellen zu keiner Phosphorylierung (Siehe Abbildung 24, Spur 2). Auch die Expression des TRII Rezeptors zusammen mit dem humanen wild Typ TRI Rezeptor (Spur 4) oder alleine (Spur 5) konnte keine Phosphorylierung herbeiführen. Eine starke Phosphorylierung von EmSmadC resultierte jedoch nach der Co-Expression des TRI-ka Rezeptors zusammen mit dem TRII Rezeptor (Abbildung 24, Spur 3).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EmSmadC nur durch einen Komplex des TRI-ka-Rezeptors mit dem TRII Rezeptor phosphoryliert werden kann und die Phosphorylierung der Kinase-Aktivität des TRI-ka Rezeptors zugeschrieben werden muss, da der TRII Rezeptor allein keine Phosphorylierung bewirken konnte. Dies macht klar, dass es trotz der großen strukturellen

Homologie zwischen EmSmadA und EmSmadC einen deutlichen funktionellen Unterschied zwischen den beiden *Echinococcus* AR-Smads gibt.

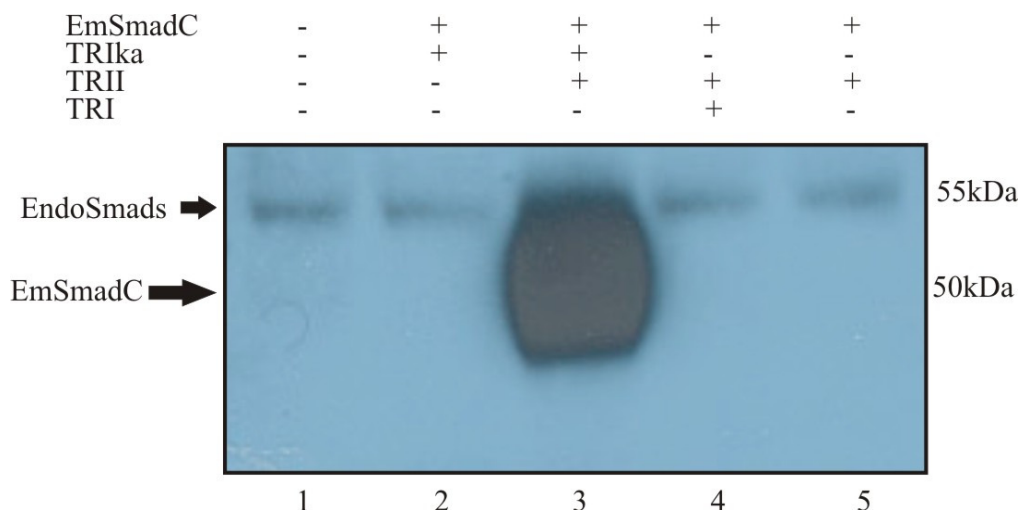


Abbildung 24 - Phosphorylierung von EmSmadC durch humanen TRI. In HEK293-T Zellen wurde EmSmad C zusammen mit TRIka bzw. TRI mit oder ohne TRII exprimiert. Durch Verwendung des Anti-Phosph-Smad2-Antikörpers (siehe Kapitel 3.1.6) konnte eine Phosphorylierung von EmSmadC nachgewiesen werden. (1)Mock; (2)EmSmadC/TRI-ka; (3)EmSmadC/TRI-ka/TRII; (4) EmSmadC/TRI/TRII und (5) EmSmadC/TRII. Die endogenen Smads werden hier mit „EndoSmads“ bezeichnet.

4.1.12.1 Der Activin Typ IIb Rezeptor (ActRIIb) interagiert mit der konstitutiv aktivierten Form des TGF β Typ I-Rezeptors (TRI-ka) zur Bildung eines aktiven Komplexes

Bei *H. sapiens* nutzen TGF β - und Activin-Liganden dieselben AR-Smads (Smad2 und Smad3) zur Weiterleitung der Signale zum Zellkern. Da EmSmadC zur Gruppe der AR-Smads gehört und durch einen TRI-ka/TRII Komplex phosphoryliert werden konnte, war es interessant zu wissen, ob die Phosphorylierung von EmSmadC spezifisch dem TRI/TRII-Komplex zugeschrieben werden konnte oder ob sie auch durch einen funktionellen Komplex zwischen einem TRI Rezeptor mit einem Typ II Activin Rezeptor ermöglicht werden könnte. So wurde EmSmadC zusammen mit dem Activin Typ IIb Rezeptor in HEK293-T Zellen sowohl in Abwesenheit eines Typ I-Rezeptors, als auch in Anwesenheit eines wildtypischen TRI-Rezeptors bzw. konstitutiv aktivierten Rezeptors TRI-ka exprimiert.

4. Ergebnisse

Entsprechend den zuvor gemachten Beobachtungen fand sich weder bei der alleinigen Co-Expression mit AcRIIb (Abbildung 25, Spur 4) noch bei der Co-Expression mit AcRIIb und dem wildtypischen TRI (Abbildung 25, Spur 3) eine Phosphorylierung. Die Co-Expression von AcRIIb mit der konstitutiv aktiven Form des TRI Rezeptors führte jedoch zu einer starken Phosphorylierung von EmSmadC (Abbildung 25, Spur 2). Es ist also festzuhalten, dass genau wie

TRII auch AcRIIb einen funktionellen Komplex mit TRI-ka bilden kann, der eine Phosphorylierung von EmSmadC bewirkt.

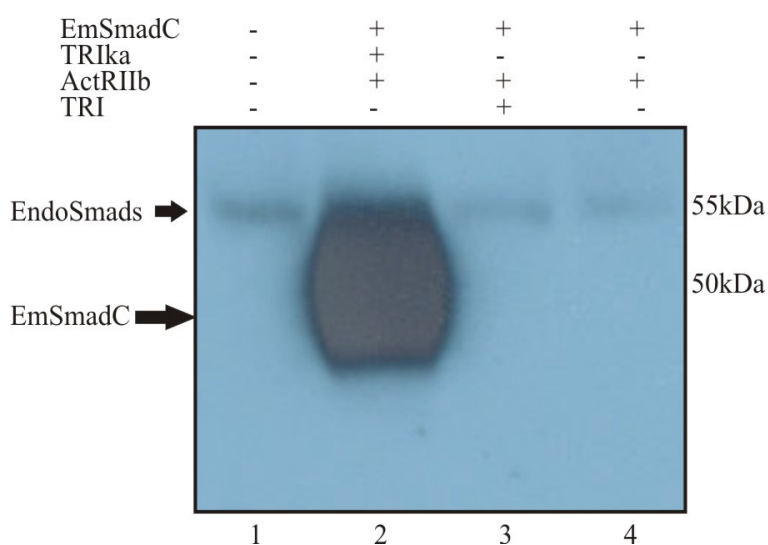


Abbildung 25 – Ein funktioneller TRI-ka/AcRIIb Komplex phosphoryliert EmSmadC. (1) Mock; (2) Versuchsansatz mit EmSmadC und einem Rezeptorenkomplex von der konstitutiv aktivierten Form des TGF β Typ I Rezeptors (TRI-ka) mit dem Activin Typ IIb Rezeptor (ActRIIb); (3) Versuchsansatz mit EmSmadC und einem Rezeptorkomplex aus der wildtypischen Form des TGF β Typ I Rezeptors (TRI) mit ActRIIb. Verwendeter Antikörper: Anti-p-Smad2 (s.o.). Die endogenen Smads werden hier mit „EndoSmads“ bezeichnet.

4.1.12.2 Der Activin Typ IIb Rezeptor (ActRIIb) interagiert mit der konstitutiv aktivierten Form des BMP Typ I-Rezeptors (BRIa-ka) zur Bildung eines aktiven Komplexes

Wie auch bei den anderen Mitgliedern der TGF β Familie gibt es für die BMP- und Activin-Faktoren zwei verschiedene Serin/Threonin Kinase Rezeptoren (Typ I und Typ II Rezeptoren), die an der Signaltransduktion beteiligt sind. In dieser Arbeit sollte nun auch die Fähigkeit des Activin

Typ IIb-Rezeptors, einen funktionellen Komplex mit dem humanen BRIa zu bilden, untersucht werden. Bei Funktionalität des Komplexes würde es zu einer Phosphorylierung der Smad-Proteine kommen.

BRIa-ka wurde zusammen mit ActRIIb in HEK293-T Zellen exprimiert. Zur Untersuchung der Funktionalität wurde die zuvor beschriebene Eigenart der zur BMP-Signaltransduktionskaskade gehörenden EmSmads genutzt, nur durch einen Komplex von einem aktivierten Typ I-Rezeptor mit einem Typ II-Rezeptor phosphoryliert werden zu können. Wie oben beschrieben, können EmSmadA und EmSmadB durch einen BRIa/BRII- Komplex phosphoryliert werden. EmSmadC wurde durch die Komplexe TRI-ka/TRII oder TRI-ka/ActRIIb phosphoryliert.

Die Expression des BRIa-ka Rezeptors zusammen mit dem ActRIIb Rezeptor führte zu einer Phosphorylierung von EmSmadA (Abbildung 26 a, Spur 2) und EmSmadB (Abbildung 26 b, Spur 1), was bedeutet, dass nicht nur TRI-ka (s.o.) sondern auch BRIa-ka mit dem ActRIIb funktionell interagieren kann. Überraschend war, dass BRIa-ka im Komplex mit ActRIIb auch EmSmadC phosphorylierte. (Abbildung 26 a, Spur 3). Im Komplex mit BRII hingegen konnte BRIa-ka keine Phosphorylierung von EmSmadC bewirken (Abbildung 26 a, Spur 5). Als Positiv-Kontrolle wurde TRI-ka/TRII/Smad2 eingesetzt (Abbildung 26 a, Spur 4).

Dieses Ergebnis ist bislang einzigartig, da in bisherigen Untersuchungen am humanen System die beiden Signaltransduktionssysteme (TGF β /Activin und BMP) streng getrennt waren, d.h. dass R-Smads der BMP-Gruppe nur durch BMP-Typ I Rezeptoren phosphoryliert werden konnten und entsprechend R-Smads der TGF β -Gruppe nur durch TGF β -Rezeptoren, nie aber ein Rezeptor der einen Gruppe ein Smad der anderen Gruppe phosphorylierte.

4. Ergebnisse

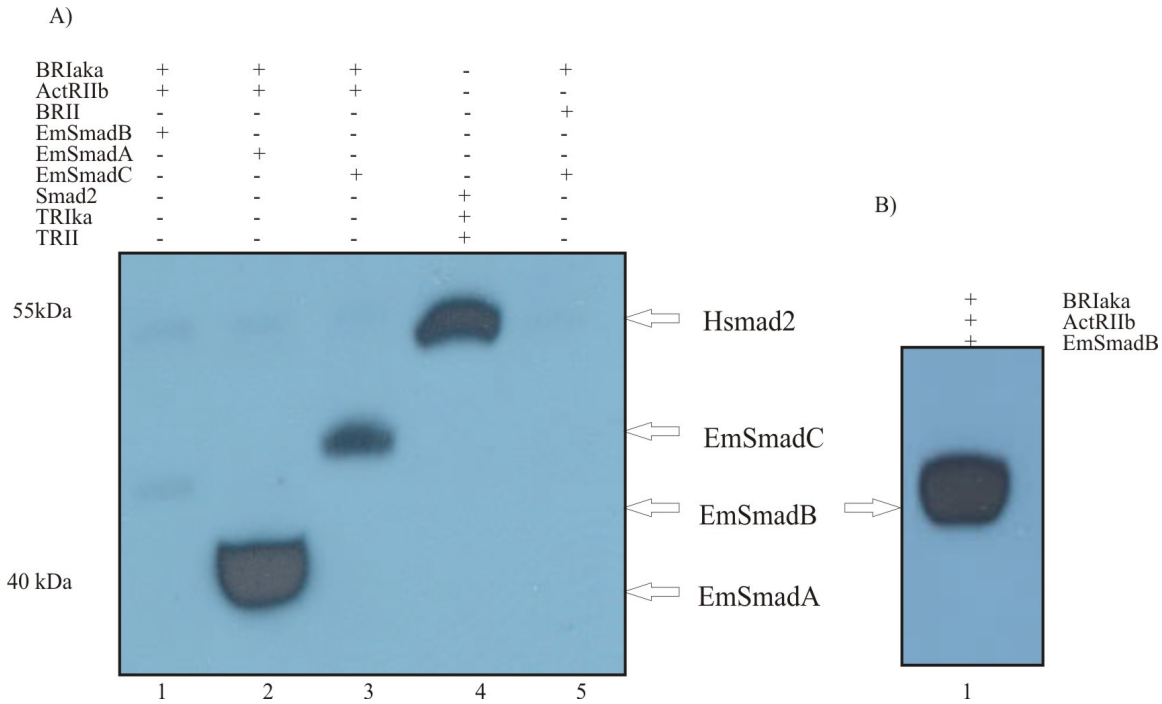


Abbildung 26 - Phosphorylierungsaktivität des BRIa-ka/ActRIIb Komplexes Eine Co-Expression von EmSmadA, EmSmadB oder EmSmadC mit einem Rezeptor-Komplex aus Activin Typ IIb Rezeptor (ActRIIb) mit der konstitutiv aktivierten Form des BMP Typ I Rezeptors (BRIa-ka) wurde in HEK 293 Zellen durchgeführt. A) Im Westernblot mit dem Anti-pSmad2 Antikörper (s.o.) zeigen sich folgende Ergebnisse: EmSmadA (Spur 2) und EmSmadC (Spur 3) werden durch den BRIa-ka/ActRIIb-Komplex phosphoryliert. Als positive Phosphorylierungskontrolle wurde eine Co-Expression von humanem Smad2 mit dem Rezeptorkomplex aus der aktivierten Form des TGF β Typ I Rezeptors (TRII-ka) mit dem TGF β Typ II Rezeptor (TRII) durchgeführt (Spur 4). Auch hier zeigt sich eine Phosphorylierung von Smad2. EmSmadC konnte nicht durch den BRIa-ka/BRII-Komplex phosphoryliert werden (Spur 5), phosphoryliertes EmSmadB wurde nicht durch den anti-pSmad2 Antikörper erkannt (Spur 1), deshalb wurde die Bestätigung der EmSmadB-Phosphorylierung im Westernblot mit dem anti-pSmad1 Antikörper (s.o.) durchgeführt. B) Im Versuchansatz der Co-Expression von EmSmadB mit dem Rezeptorkomplex BRIa-ka/ActRIIb zeigt sich im Westernblot mit dem anti-pSmad1 Antikörper (s.o.) eine Phosphorylierung von EmSmadB (Spur 1).

4.2 Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von Rezeptoren der TGF β - Superfamilie aus *E. multilocularis*.

Zytokine der TGF β Superfamilie übertragen ihre Signale mittels zwei verschiedenen Transmembran Ser/Thr- Kinase-Rezeptoren, dem Typ I-Rezeptor und dem Typ II-Rezeptor.

Nach Bindung des Liganden bildet sich ein funktioneller heterooligomerer TGF β Rezeptor-Komplex, der aus jeweils zwei Typ I-Rezeptoren und zwei Typ II-Rezeptoren besteht (Yamashita et al., 1994; Kirsch et al., 2000; Qin et al., 2002).

Bisher wurden beim Menschen 5 verschiedene Typ II-Rezeptoren identifiziert: TRII, ActRIIa, ActRIIb, BRIIa und BRIIb. Vom Typ I wurden 7 verschiedene Rezeptoren gefunden, die als Alk Rezeptoren (Activin like kinase) bezeichnet und von 1 bis 7 durchnummeriert werden (Manning et al., 2002). Während die Typ II-Rezeptoren eine konstitutive Kinase-Aktivität besitzen, weisen die Typ I-Rezeptoren eine induzierbare Kinase-Aktivität auf. Beide Rezeptortypen zeigen als Strukturmerkmal eine extrazelluläre, Cystein-reiche Region, eine Transmembranregion und eine intrazelluläre Kinase-Domäne. Typ I-Rezeptoren besitzen zusätzlich eine sogenannte GS Box, einen Glycin-Serin-reichen Abschnitt an der Juxtamembran-Region (Wrana et al., 1994).

Die Typ I-Rezeptoren (oder Alk-Rezeptoren) lassen sich anhand zweier wichtiger Kriterien noch weiter klassifizieren. Es handelt sich dabei zum einen darum, welche Art von Liganden vom Rezeptor gebunden werden können. Das andere Einteilungskriterium ist, welche R-Smads (TGF β /Activin-Smads oder BMP-Smads) durch die Rezeptoren aktiviert werden. So gibt es für jeden Liganden spezifische Rezeptoren: TGF β kann von den Rezeptoren Alk5 und TBRII gebunden werden, Activine von Alk4 und ActRIIa/b, BMP von Alk3/Alk6 und BRIIa/b (Chang et al 2002).

Zur Signalweiterleitung nutzen die Rezeptoren der TGF β Superfamilie zwei definierte Smad-Wege: während die TGF β und Activin Rezeptoren die AR-Smads (Smad2 und 3) benutzen, leiten die BMP-Rezeptoren das Signal durch BR-Smads (Smad1, 5 und 8) weiter (Derynck, R. & Feng XH. 1997; Massagué 1998). Zwei Motive sind wichtig für die Interaktionsspezifität zwischen Rezeptoren und R-Smads: der Loop L45 im jeweiligen Typ I-Rezeptor und der Loop L3 in der MH2 Domäne der R-Smads. Der Loop L45 liegt in der Kinase-Domäne aller Typ I-Rezeptoren. Die sieben bekannten Alk-Rezeptoren können aufgrund ihres Sequenzmusters in diesem Loop L45 in drei Unterklassen eingeteilt werden: die erste Gruppe enthält Alk1 und Alk2, die zweite Gruppe enthält Alk3, Alk6 und die dritte Gruppe enthält Alk4, Alk5 und Alk7. Die Sequenz im Loop L3 in der MH2 Domäne der R-Smads bestimmt wiederum, ob die jeweiligen R-Smads am TGF β /Activin- oder BMP-Signalling teilnehmen.

Rezeptoren der TGF β Superfamilie wurden schon in zahlreichen Species von Cnidariern (Samuel et al., 2001), Schwämmen (Suga et al., 1999), *C. elegans* (Georgi et al., 1990) und *D. melanogaster* (Penton et al., 1994) bis zu den Säugern identifiziert. In *E. multilocularis* wurde bislang nur die cDNA eines einzigen Rezeptors (EmRSK1), einem Typ I-Rezeptor mit putativer Ser/Thr-Kinase-Aktivität, identifiziert (Kroner, 2002). Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften würde man diesen Rezeptor eher den BMP-Rezeptoren zuordnen.

In Anbetracht der Tatsache, dass die beiden *Echinococcus* Smads EmSmadA und EmSmadC eine hohe Homologie zu den AR-Smads aufweisen, ist zu vermuten, dass es auch in *E. multilocularis* einen TGF β - und/oder einen Activin-Rezeptor gibt. Mit dem Ziel einer Charakterisierung aller möglichen TGF β Signal-Wege in *E. multilocularis*, wurde in dieser Arbeit nach weiteren TGF β Rezeptoren in *E. multilocularis* gesucht.

4.2.1 Identifizierung von TGF β Rezeptoren mittels degenerativer PCR

Die hoch konservierte Kinase-Domäne im intrazellulären Teil aller TGF β -Rezeptoren ist ein guter Ansatzpunkt für das Design degenerativer Primer, mit denen man aus *Echinococcus* cDNA mögliche Rezeptoren amplifizieren könnte. Zur Synthese dieser Primer wurden Aminosäure-Sequenzen aus Datenbanken von verschiedenen TGF β -Rezeptoren miteinander verglichen. Die hergestellten Primer hatten eine Größe von ca. 20 Nukleotiden und richteten sich gegen die hoch konservierten Motive NILGFIA (5' AAC ATC CTC GGX TTY ATH GC-3' sowie MAPEVLD 5'-TCT AGT ACY TCX GGX GCC AT-3'). Über degenerative PCR konnte bei niedrigen Stringenzbedingungen (Annealingtemperatur ca. 50°C) eine klare Bande von ca. 300 bp amplifiziert werden, die zur Sequenzierung, mit einem TOPO-TA kloning kit kloniert wurde. Die Sequenzanalyse von über 30 Klonen zeigte zwei verschiedene Sequenzen, deren zugehörige Gene mit *emrsk2* und *emrsk3* bezeichnet wurden. Die komplette Sequenz beider cDNAs konnte über PCR und nested-PCR aus einer *E. multilocularis* cDNA Bibliothek, die für das Metazestoden-Stadium hergestellt worden war, charakterisiert werden (Hubert et al., 2004).

Die Amplifizierung des *emrsk2* 5' Endes wurde durch eine PCR mit dem Vektor-Primer PJG4-5PR (5'-GATGCCTCCTACCCTTATGATG-3') und dem *emrsk2* spezifischen Primer RSK2-UP (5'-GGGATTTGAGGTCACGATG-3') durchgeführt. Für die Amplifizierung des *emrsk2* 3' Endes wurde der *emrsk2*-Primer RSK2-DW1 (5'-GTAAACCACCAATAGCTCA-3') und der Vektor-Primer PJG4-5-3 (5'-TTGGAGACTTGACCAAACCT-3') eingesetzt. Für eine nested-PCR wurde

der *emrsk2*-Primer RSK2-DW2 (5'-CGACAGTCTCACTGGCCG-3') und der Vektor-Primer PJG4-5-3Nest (5'-CCTCTGGCGAAGAAGTCC-3') verwendet.

Die Amplifizierung des *emrsk3* 5' Endes wurde durch eine PCR mit dem Vektor-Primer PJG4-5PR (5'-GATGCCTCCTACCCTTATGATG-3') und dem *emrsk3* spezifischen Primer RSK3-UP (5'-GAAAAGTTGCTCCAGTTGCAG-3') vorgenommen. Für die Amplifizierung des *emrsk3* 3' Endes wurde der *emrsk3*-Primer RSK3-DW1 (5'-GGAGATCTGGGACTAGCTG-3') und der Vektor-Primer PJG4-5-3 (5'-TTGGAGACTTGACCAAACCT-3') eingesetzt. Für eine nested-PCR wurde der *emrsk3*-Primer RSK3-DW2 (5'-GCACCTGGTTCGACGGAAA-3') und der Vektor-Primer PJG4-5-3Nest (5'-CCTCTGGCGAAGAAGTCC-3') verwendet.

Der Sequenzvergleich (BLAST, FASTA) der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigte, dass *emrsk2* und *emrsk3* für zwei verschiedene Ser/Thr Kinase Rezeptoren kodieren und dass sie zur Gruppe der Typ I-Rezeptoren gehören.

4.2.2 Charakterisierung des EmRSK2 Rezeptors der TGF β Superfamilie aus *E. multilocularis*.

Die cDNA von *emrsk2* misst von ihrem Beginn bis zum PolyA Schwanz 2823 Nukleotide. Das offene Leseraster (ORF) umfasst 772 Codons, die für ein Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 83 kDa kodieren. Es konnte kein Spliced Leader am cDNA 5'-Ende identifiziert werden. Die Sequenz der ersten 15 Aminosäuren wurde über das SMART Computerprogramm (<http://smart.embl-heidelberg.de>) als Signalsequenz ausgewiesen. Das offene Leseraster des *emrsk2* endete an der Nukleotidposition 2434-2436 mit einem TGA Stopcodon, welches 387 nicht- kodierende Nukleotide entfernt vom Anfang des PolyA Schwanzes liegt. Das wahrscheinlichste Startcodon befindet sich 117 Nukleotide vom cDNA 5'Ende entfernt, 87 Basenpaare stromaufwärts des ATG findet sich *in frame* ein TAA Stopcodon. Das bestätigt, dass die komplette Sequenz von *emrsk2* charakterisiert werden konnte. Die Sequenz um das Startcodon (AACAU \overline{G} T) entspricht nur ansatzweise dem Kozak-Konsensus für eine erfolgreiche Translationsinitiation (RccAUGR) (Kozak, 1991).

4. Ergebnisse

GCTTTGGCAAATTCATCTCCTCAATTTCTTTAAGAAGAACCCCCAGATTCACTATATGGCGTATACCTCCCCGATCTTCTAACACCCTC	0090
*	
GAAACCAAAGACTCGAAAATTCCTCAACATGTTTGCCTCTCGCTACTCCTTTTTTCTGCCGCTAAGCCGTCCATAGCAAATCGGAAAGAA	0180
M F A L S L L L F S A A K P S I A N R K E	0021
TGTCTGAAACTCCTCTGCAATCTGATGAAAGCGACTGCCATCCCTGTGCAGGCATGTCCGTGGACGAACTCGGCACATGGCGACGCTAC	0270
Ⓢ L K L L Ⓢ N P D E S D Ⓢ H P Ⓢ A G M S V D E L G T W R R Y	0051
ATTGACGCTCTGCTACAGAATTTCAATGACGAGGAGAGCAATAATGCTTACTACCGCAGATTTGGGAGGAGCCCTTTTGTGCACAATT	0360
I D A L L Q N F N D E E S N N A Y Y R Q I W E E P F Ⓢ Ⓢ T I	0081
TCACCTGGAGAGCGTTGCAATATCAAGCTGATTAATGAACCAAATGTGCCGCTCACAGGCTCTATGAAATGGGATGTTTGCGCCAAAAG	0450
S P G E R Ⓢ I I K L I N E P N V P P H R L Y E M G Ⓢ L R Q K	0111
GATTTCTGGAAGCCCTTCAGCTGTGAGTCGGCGAACATGCGCTGTGTAACCTCATCCTTCTGTAATCTGCCTCTGAAGGAGGAATTGTCC	0540
D F W K P F S Ⓢ E S A N M R Ⓢ Ⓢ N S S F Ⓢ N L P L K E E L S	0141
AAGTTGATTGTGAGGTGCCCAAAGACAACACCCTAATGTGATTTGTCCATCTTTCTGTCCCTT GCTGTCCCTAATGCTTGTGTCCGGC	0630
K L I V E V P K D N T L I V I L S I F L V L A V L M L V A G	0171
TGGTGCTTCTGGCGGTGTCGAGATAAAGCTGACTGGAGAAATCTCCCAAGCACCCGTTTCCATGATTGGTGTGGGTGTATCGGCGAT	0720
W C F W R C R D K A D W R K S S Q A P V S M I G A G C I G D	0201
GCCACAGGTCACACATCTCCAAGCGACACGCCCTTGGCACATGGCGAATGCGGTGCCAGCGCGCCTCCATGGTAAGCGCTATACCG	0810
A T G H T S P S D T H P W H M A E C G A S G A S M V S A I P	0231
ACCGCTACCACCACCGTAATGCCAGCGCCGTCGCTGTCAACGGAGGCGTTCTTAACGCCACCGCTGCGAATAGTGGGGTCAGTGTGCA	0900
T A T T T A N A S A V A V N G G V L N A T A A N S G V S V A	0261
ACCACTCTCATGACTCAGTCCCTCTCCATCCCTCTCGCACGCCCTTTCTGATGGCTAGTTCCTCCATTTCTCTGTGATTGCTGTACGA	0990
T T L I D S V P L H P S R T P F L M A S S S I S S V I A V R	0291
CCTCCTCGGGGCTTGGAGCAATTCACAGGTGTTTCGTCCTACCACAACCTCCATCGGTGGTTCACGGTCGTCGGGGCTCGGAGGTT	1080
P P R G L G A I P T G V S S Y H N S I G G S T V V R A S E V	0321
GTTGGCCTTGGTGGTGGCGCGCTTCTATACAGCTGCTAGTGGGGTGCTTCTATGCTCCACCTCGTGTCTGCTCCGCTGGGGCT	1170
V G L G G G A S Y T A A S G G A S M L P T S C S A P P G A	0351
GGTGGCACTCTGAAATCACTCTATCGGAAGTGGTCTGGTGCGGGTACGCCACTGCTAGTGAACGCACAGTTGCGCGTCAGGTCCT	1260
G G T L E I T L Ⓢ Ⓢ Ⓢ Ⓢ Ⓢ A G Q P L L V E R T V A R Q V T	0381
TTGAGTGCACGTATTGGCGAAGGGCGATATGGCGAGGTCTGGCTCGGCCACTGCATGGTGATCAGTGGCTGTGAAGATATCTCCAGT	1350
L S A R I G E G R Y G E V W L G R L H G D Q V A V K I F S S	0411
CGGAACGAGAACTCGTGGATTAGAGAGAAGGAGATCTACGAGACGCTACTCTGCGTCATAGCAACATCCCTGGGATTCATCGCTGCGG AC	1440
R N E N S W I R E K E I Y E T A T L R H S N I L G F I A A D	0441
AACAAGGACAACGGAATCTCAACGGAGCTCTGGCTAATCGCTAGTATCATCGTCTGGGTC GCTCTACGAGTTTCTCAATCGCACGCC	1530
N K D N G I S T E L W Ⓢ I A E Y H R Ⓢ G S L Y E F Ⓢ Q S H A	0471
TTCCTCTTCCCGCCCTCATCAAAATGGCCTCATCCATTGCCAACGGACTGGCGCATCTCCACATGGCCATTGTTGGCACCTCGGGTAAA	1620
F T Ⓢ P A L I K M A S S I A N G L A H L H M A I V G T S G K	0501
CCACCAATAGCTCATCGTACCTCAAAATCCCGAAATATTCTGGTAAAAGCGGACGGTGAATGCTGTATCGGGGATTTGGGCTTGGCCGTG	1710
P P I A H R D L K S R N I L V K A D G E C C I G D L G F A V	0531
AAGTACGACAGTCTCACTGGCCGCTAGATATCGGTCCACAACACGGAACGCATTGGCACAAAAGCGGTATATGGCACCGGAGGTACTAGAT	1800
K Y D S L T G R V D I G H N T E R I G T K R Y M A P E V L D	0561

4. Ergebnisse

AACACCCCTCTATGCCATTCTTTTCGATGCGCTACATGCAAGCGGATATCTACTCGTGGGTCTGGTCTTTTGGGAGATGACTCGACGTGTC	1890
N . T . L . Y . A . H . S . F . D . A . Y . M . Q . A . D . I . Y . S . L . G . L . V . F . W . E . M . T . R . R . V	0591
↓	
TATGTTGCCAATCTCTACGGTCCCTGAGGAATATCAGCTTCCCTATCAGGATAACGTAGGCCCTGATCCCTTGATCGAAGAGATGAAGTCC	1980
Y . V . A . N . L . Y . G . P . E . E . Y . Q . L . P . Y . Q . D . N . V . G . P . D . P . L . I . E . E . M . K . S	0621
GTGGTGTGTGAACTGGGCATACGTCCCCATCTGCCATTGGTATGGCAGACGGATGCAAGTCTGCGGCTGCTTTACCACATCATGACGGAG	2070
V . V . C . E . L . G . I . R . P . H . L . P . L . V . W . Q . T . D . A . S . L . R . L . L . Y . H . I . M . T . E	0651
TGTTGGTTTGCCAACCCTTCCCACCGTCTTTTCAGCAATGCGAATCAAAAAGGACCTTGCGAATCAGCGTCAACAACCTCGGCTCGCCAAGG	2160
C . W . F . A . N . P . S . H . R . L . S . A . M . R . I . K . K . D . L . A . N . Q . R . Q . Q . L . G . S . P . R	0681
CAACCGGGTGAGACTCCACTGCCTCCACATATTCTTCGCCAACAGCCCTCCAGTCTAGATGCCTACCGCCCGGTGTATTGTCTATCGA	2250
Q . P . G . E . T . P . L . P . P . H . I . L . R . Q . Q . P . S . S . L . D . A . L . P . P . G . V . F . V . Y . R	0711
TCGGTGGAGGCCGCCAGCGCCGAAGTAACGCCAACACCTCAACGTTAGAGACAAATCAGGTGGGGGAGGCGGAGGCGGAGGCA GAAGAG	2340
S . V . E . A . A . S . A . A . S . N . A . N . T . S . T . L . E . T . N . Q . V . G . E . A . E . A . E . A . E . E	0741
GCACTCCTTGCCCTCCGGTGGACCCACTATTCAACCGCCAAATGTGGTTGCCACGGCAG CGGTGTCGGGGGAAGAGGAAATCTCGGATAT	2430
A . L . L . A . S . G . G . P . T . I . Q . P . P . N . V . V . A . T . A . A . V . S . G . G . R . G . N . L . G . Y	0771
TGTTGACTGAGAAATAATTGTAGGACATCCACCCCACACTATCTACCCTGCATTTGTCTTTTTTCTCCCCATTATGTACACACGCG	2520
C . *	0772
TGCGCGCTGTACAATGTGTATTTTATCACTCCTTCTACTCCCGATAGTCCTTAGTCATGTCTGCGTGTGTCGTTGTTGGG TGTTGAAGGT	2610
CACCAGCAGCATCAGTAAAGGTGGCCTAACGCCGACAGCATGTGTTGAATGAGTTGTCTGCGCTCTCCCGACCCCTCCACAAAGCCACA	2700
CGTTATTATGCCCTTGAAACCTTGCAAGTCTCTGCTCCTACCTCCCGTCTCTGCTCTCCCTTCCCTCCTTCTCTCCGCCAT	2790
GCATCCATCAATGACGATCGCTAATACTCCTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2841

Abbildung 27 – Sequenz der *emrsk2* cDNA mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) der cDNA von *emrsk2* sind gezeigt. Das Signal-Peptid ist unterstrichen. Die extrazellulären Cysteine sind durch schwarze Kreise hervorgehoben. Die Transmembran-Region ist durch kursiv geschriebene Aminosäuren, die dick umrahmt sind, markiert. Die putative zweite Transmembran-Region ist dünn umrahmt. Die GS-Region ist durch eine dicke Umrahmung mit unterbrochener Linienführung hervorgehoben, hier ist die GS-Box durch umkringelte Aminosäuren nochmals gekennzeichnet. Die Kinase-Domäne ist gepunktelt unterstrichen. In ihrem Bereich liegt auch die ATP/Mg²⁺-Bindungsstelle, die durch einen schwarzen Hintergrund mit weißen Buchstaben gekennzeichnet ist. Ebenfalls findet sich hier der Loop L45, dessen zugehörige Aminosäuren auf grauem Hintergrund dargestellt sind. Die katalytisch wichtigen Reste sind durch übergeschriebene Pluszeichen (+) hervorgehoben. Die Leucinreste des putativen Leucin-Zippers sind durch graue Kreise markiert. Sterne symbolisieren das Stop-Codon des Leserasters und ein stromaufwärts gelegenes in frame-Stopcodon. Der Konsensus für die Ser/Thr Kinasen wird doppelt unterstrichen dargestellt. Die Pfeile zeigen an, wo sich die Introns befänden.

4.2.3 Charakterisierung vom EmRSK3 Rezeptor der TGF β Superfamilie aus *E. multilocularis*.

Die cDNA von *emrsk3* enthält ein Leseraster von 721 Codons, welche für ein Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 80 kDa kodieren. 18 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons des ORF findet sich *in frame* ein TGA Stopcodon. Das wahrscheinlichste Startcodon befindet sich 32 Nukleotide vom cDNA 5' Ende entfernt, die Sequenz (RccAUGR) um dieses Startcodon entspricht nur teilweise einem Kozak-Konsensus (TTCAUGA) für gute Translations-Initiation.

```

      .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
TGCCCTCCTACCCTTATGATGTGCCAGATTATGCCTCTCCCGAATTCGGCACGAGGCTACTTGAGGGTTTTTAAAATTCATGAGACACAAA 0090
                                                                                   *                               M R H K 0004
      .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
ATAATTAAGTCTTTTGTATCCCTTTGAACGGTGTGATTCTTCTGGACCCAGTAATAGCACTTGTGTTACCACTACTGGGTGTTTTTACC 0180
I I N C F C Y P F E R C D S S G P S N S T C V T T T G C F T 0034
-----
      .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
GCGCGGAATATTATTAATGGCACCGAATATATCACTTCTGGATGCTTTTTCAAATGATATTTTTCAAATGCAAATAACTTGTGGTGTCTTG 0270
A R N I I N G T E Y I T S G C F S N D I F Q M Q I T C G V L 0064
-----
      .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
TCAAATAAAAATTCGTCAATATATTGCTGCAGTAACGGTAATTTCTGCAACTGGGGCAACTTTTCGGATCTATTTTTGCCTTTTCTATCA 0360
S N K N S S I Y C C S N G N F C N W G N F S D L F L P F L S 0094
-----
      .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
AAATCGCAATATTCGGTCTCTTCTTATGCCTCACTTTCCCGAAACATCCGCACAGCAATGTATGATTGGTCAAGTGAAGCTATACTGATA 0450
K S Q Y S V S S Y A S L S R N I R T A M Y D W S S E A I L I 0124
      .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
TCACTTATCTCGAGTGTATCGTGTTTTTCTGCATTCTTGCTTTTTTCTCTTTTTTATTGTTTCTCTCGCAAGGGTTTGGTTACACGT 0540
S L I S S V I V F F C I L A F F L F F I C F S R K G L V T R 0154
-----
      .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
CCATGTCGTTGTAAGCAATTGCCCTACACCGGTGCTGTTTCATTGCTCTGATCGCAATCGTAACGTTGGCAAATTCCTAACGAAGCCATT 0630
P C R C K Q L P Y T G A V H C S D R N R N V G K F L T K P F 0184
      .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
TTTATGAAACATGACCTTAATATTTGTTTCATCTATGCATTGTCCTTACTCTTTAATGTGTTGCAGTAAAATATGCATTAACACTTCGTTA 0720
F M K H D L N I C S S M H C P Y S L M C C S K I C I N T S L 0214
      .       .       .       .       .       .       .       .       .       .
AATTTGACGCAAACAAATCTTTTGAAGAACAATCCCTTCAGCAATCATGTATTGCAATTGACCAATCAAGTAGTTTTCTCAAAGTCA 0810
N L T Q T N L L K N N P F S N H V L Q L T N S S S F P Q K S 0244

```

4. Ergebnisse

TTGGAATCTGCAGCAGCTTTACCGTCTGAAACCCAGCCCTCGGGCACAATGTCAAGTGGAAAGCGGTAGCGGAGTACCATTCTCGTGCAA 0900
L E S A A A L P **S E T O P S G T M S (S) (G) (S) (G) (S) (G) V P F L V Q** 0274

GCTACAATTGCTCGACAGATTTTCGCTGCAGGAGTGTATCGGAAAGGGTCCGATGGAGAGGTGTGGCGTGGTATTTATCGGGGCGAAAAC 0990
A T I A R O I S L Q E C I **G K G R Y G E V** W R G I Y R G E N 0304

GTAGCAGTGAATAATTTTCCAGTCGCGACGAGGCCAGCTGGGCTAGAGAAACACACATCTATAGTAGCGTTCTTCTCAGACACGAAAAT 1080
V ⁺A V ⁺K I F S S R D E A S W A R E T H I Y S S V L L R H E N 0334

ATTCTCAGCTACTATGCCAGCGATATAACTTCTCGATACGGCTGTACGCAGCTGTGGATTATATCCCCTACCATCCCTACGGTTCGCTG 1170
I L S Y Y A **S D I T S R Y G C T Q L W** I I S H Y H P Y G S L 0364

TACGACTTTCTGCAAGCACAGTGGTGGACACAATCGCGGCCTTCGATTGGCCAAAACAGCCGCATCCGGTCTCTGCTACCTCCACTCC 1260
Y D F L Q A H V V D T I A A L R L A K T A A S G L C Y L H S 0394

TACATTCTGGGACTACAAGGAAAACCAGCAATCGTCCACAGAGACATCAAGTCAAAAAACATTTTGGTTCAGGCAAACGGTACTTGCAGT 1350
Y I L G L Q G K P A I V H R ⁺D I K S K ⁺N I L V Q A N G T C S 0424

ATTGGAGATCCGGGACTAGTGTGATGCAAGCACCTGGTTCGACGGAAATGGATGTTGGTCAACCTAATCACATGGTGGTACGAAAAGA 1440
I G ⁺D ⁺P ⁺G L A V M Q A P G S T E M D V G Q P N H M V G T K R 0454

TACATGGCGCCTGAAATACTGGCTGATGACGGTCTTGAAGAATGCCCTGAATCTGGTGAAGGATTCTGCCACACGATTTTGAATTTCA 1530
Y M ⁺A ⁺P ⁺E I L A D D G L E E C P E S G E G F L P H D F E I S 0484

GCTTATCTTCAGAGCAAAAATCGAATTAATGATACGTCACCGGTGCTTAATACGCTCGGATTCAGCTTTGAGGAATAAAAGCTGCTGAT 1620
A Y L Q S K N R I N D T S P V L N T L G F S F E E L K A A D 0514

GTCTACGCATTTGGATTGGTCTTTGGGAAATTTTTCGTCGATGCCTAACTGAACGTGGTGAAGTTCATCTCCCATGTGCCATACTGG 1710
V Y A F G L V L W E I F R R C L T E R G E V H P P H V P Y W 0544

GATAAAGTGTCTGCTGATCCGAGCTTTGCAGAAATGCGTCGAGTGGTGCATGTCGAGGGTGAACGCCCGCTATCTCCGAACGCTGGCAG 1800
D K V S A D P S F A E M R R V V H V E G E R P P I S E R W Q 0574

AGCTCAAAGGTGCTCATCCGCTGTGCCAGTCTGATGCAAGAATGCTGGCAGCGAAACCCGATGTCGGTTTCCCATATTAAGAATAAAA 1890
S S K V L I R C A S L M Q E C W H A K P D V ⁺R L P I L R I K 0604

AAGACTCTCGATGAGACATTTTCGGAGCGGTGAAGGAAATGGCGAAAGTGTAGTTCAGATCAAGTTATGTTATATCAGACCCGCGA 1980
K T L D E T F S E A V K E I G E S V V P D Q V I V I S D P R 0634

ACGCAAGCAGACAGCGGGATTAACAGTCGCAGCCATGGCAGCACTTTCCAATGTACCTCAGTCACGCCCTACTACCAGACAGTCGTC AAC 2070
T Q A D S G I N S R S H G S T F Q C T S V T P Y Y Q T V V N 0664

GGCAGTATCCGACGCCCCAGGGAGGTGCTCGCCTTAGGGCGCATTATGCGATGTCCTTCGAAAATTTCTATTACGCAAGGAGTCTCCACT 2160
G S I R S P R E V L A L G R I M R C P S K I L F S K E S S T 0694

ACGAAAAACTGAAAGAAGGGGAGAAGTATGTTGCGGAAACTGCATCCAATTTGCTCCGTCAGGAGGAAGCCAGCTCCTGTAGTAGAGG 2250
T K K L K E G E K Y V A E T A S N L L R Q E G S Q L L * 0721

4. Ergebnisse

```
. . . . .
GATCAGTTTTACGAAAGTTTCTCAGTTTTGTTCTCCGTCAAAGTTTAAACATTTAGTCATGAAGTTTGACAAATTGACTGGAGGACATTA 2340
. . . . .
AAGAAATTCATCATAACACAAATATTTGGCAGGCTGTTACCTTGGGCATGGACTACGTTTGATATGCAGCGACGCAATTCAAAGTGAAA 2430
. . . . .
TCTCAGAAGCACAAATCCATCCGGTTTTTGAATATTTTTGTACTCTTCTGTAAATAAATTTTTGTTTTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2520
.
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2539
```

Abbildung 28 – Die komplette Sequenz der *emrsk3* cDNA und der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Die Nukleotidsequenz (oben) und die Aminosäuresequenz (Fett, unten) der cDNA von *emrsk3* sind gezeigt. Die für die Activin-Rezeptoren charakteristische Bindungsdomäne ist fett unterstrichen. Die Transmembran-Region ist durch kursiv geschriebene Aminosäuren, die umrahmt sind, markiert. Die GS-Region ist durch eine dicke Umrahmung mit unterbrochener Linienführung hervorgehoben, hier ist die GS-Box durch umkringelte Aminosäuren nochmals gekennzeichnet. Die Kinase-Domäne ist gepunktet unterstrichen. In ihrem Bereich liegt auch die ATP/Mg²⁺-Bindungsstelle, die durch einen schwarzen Hintergrund mit weißen Buchstaben gekennzeichnet ist. Ebenfalls findet sich hier der Loop L45, dessen zugehörige Aminosäuren auf grauem Hintergrund dargestellt sind. Die katalytisch wichtigen Reste sind durch überschriebene Pluszeichen (+) hervorgehoben. Sterne symbolisieren das Stop-Codon des Leserasters und ein stromaufwärts gelegenes in-frame-Stopcodon. Der Konsensus für die Ser/Thr Kinasen wird doppelt unterstrichen dargestellt. Die Pfeile zeigen an, wo sich die Introns befänden.

4.2.4 EmRSK2 und EmRSK3 zeigen hohe Homologien zu TGFβ- und Activin- Rezeptoren aus Säugern

Ein Sequenzvergleich der Aminosäuren in Datenbanken zeigte die höchste Homologie (67 % identisch) von EmRSK2 mit dem TGFβ Rezeptor SmRK1 aus *S. mansoni* (AF031557). Hoch war auch die Homologie zu den TGFβ Rezeptoren aus *Gallus gallus* (58 % identisch, Q06900) und *Mus musculus* (57 % identisch, Q9D5H8).

EmRSK3 zeigte die höchsten Homologien zu dem Activin like Kinase-Rezeptor (ALR1, Q8WPC9) aus *Crassostrea gigas* (53 % identisch), einem humanen Alk2-Rezeptor (52 % identisch, Q04771) und zu Sax (Q6DD64), ein TGFβ Rezeptor von *X. laevis* (51 % identisch).

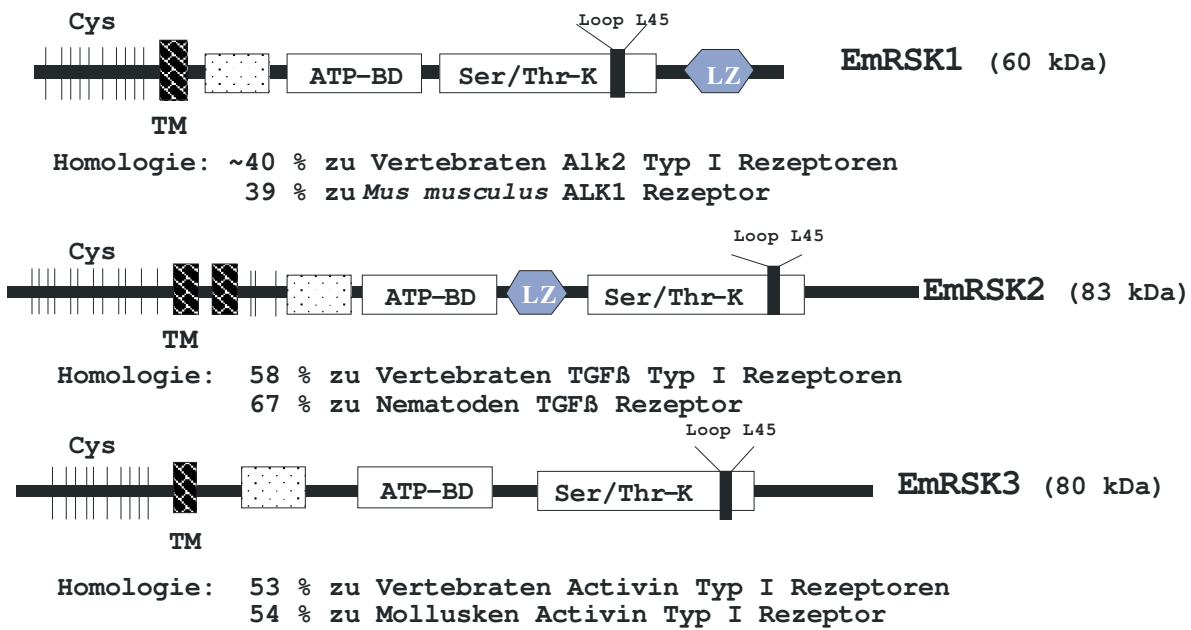


Abbildung 29 – Struktureller Vergleich TGFβ-Rezeptoren aus *E. multilocularis*. Cys: Cysteine in der extrazellulären Region; TM: Transmembranregion; GS: Glycin/Serin Box; ATP-BD: ATP-Bindungsdomäne; Ser/Thr-K: Serin/Threonin Kinase-Domäne (Loop L45 ist markiert); LZ: putative Leucinzipper. Das theoretische Molekulargewicht ist in Klammern am rechten Rand aufgeführt. Unten werden jeweils die Rezeptoren mit höchster Homologie genannt.

4.2.5 Strukturelle Merkmale von EmRSK2 und EmRSK3

TGFβ-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären, Cystein-reichen Domäne, die wichtig für die Bindung des Liganden ist, einer Transmembrandomäne (TMD) und einem intrazellulären Teil, der eine Ser/Thr-Kinase-Aktivität besitzt.

4.2.5.1 Analyse des extrazellulären Abschnittes

Die extrazelluläre Region ist der am wenigsten konservierte Teil bei den TGFβ-Rezeptoren. Gemeinsam sind den unterschiedlichen Mitgliedern der TGFβ-Rezeptor-Familie hier jedoch Cystein-reiche Regionen, eine Cystein-Box (CC_{X4-5}CN) und N-Glykosylierungsstellen, die eine

wichtige strukturelle Funktion haben. Während die Säuger Typ II-Rezeptoren eine variable Zahl von Cysteinen (5-12) in der extrazellulären Region vor der Cystein-Box besitzen, zeigen die Säuger

Typ I- Rezeptoren hier eine charakteristische Zahl von 7 Cysteinen. Diese Cysteine zeigen eine typische Anordnung CxC_{X3-5}C_{X4-25}C_{X4-5}C_{X13-16}GC_{X7-19}C_{X11-13}, auf die die Cystein-Box folgt (Wrana et al. 1994a; Kingsley, 1994).

EmRSK2 zeigt ein 15 Aminosäuren langes Signalpeptid, dessen putative Schnittstelle zwischen den Aminosäuren A₁₇ und N₁₈ identifiziert wurde (SMART). Nach Ablösen des Signalpeptides müsste ein reifes Peptid von 755 Aminosäuren resultieren. Der extrazelluläre Teil des EmRSK2 enthält neben der Cystein-Box eine ungewöhnlich hohe Anzahl von 9 Cysteinen in der Anordnung C_{X4}C_{X6}C_{X2}C_{X40}CC_{X7}C_{X18}GC_{X11}C_{X6}CC_{X4}CN und eine potentielle Glykosilierungsstelle (NXS/T) an Aminosäure 128, welche sich in der Mitte der Cystein-Box befindet. Eine Zahl von 9 Cysteinen in der extrazelluläre Region wurde bereits in SmRK1, einem TGFβ homologen Typ I-Rezeptor in *Schistosoma mansoni* identifiziert (AFO31557) und auch in einem Typ I-BMP homologen Rezeptor aus *Anopheles gambiae* (AAT07316).

Für EmRSK3 wird im Gegensatz zu EmRSK2 mit der Computeranalyse (SMART) kein Signalpeptid angegeben. Eine ähnliche Situation wurde bereits beim EmRSK1-Rezeptor und auch bei einem TGFβ homologen Rezeptor aus *S. mansoni* (SmRK1) beobachtet. Weil aber SmRK1 nachweislich an der Oberfläche des Parasiten exprimiert wird, wurde ein alternativer Exportmechanismus vom Zellinneren zur Membran vorgeschlagen (Davis & Pearce, 1999). Auch im Fall der Rezeptoren EmRSK1 und EmRSK3 muss angesichts fehlender Signalpeptide solch ein alternativer Exportmechanismus in *E. multilocularis* angenommen werden. EmRSK3 zeigt in seiner extrazellulären Region neben der Cystein-Box 7 Cysteine in der typischen Anordnung CxC_{X5}C_{X9}C_{X5}C_{X15}GC_{X11}C_{X11}CC_{X5}CN. Deutlich stellt sich im Bereich der 87 N-terminalen Aminosäuren die Activin-Rezeptor-Domäne (SMART-Computeranalyse) dar. Diese Rezeptor-Domäne ist eine für die Activin-Rezeptoren typische und hoch konservierte Struktur, deren Funktion in der Ligandenbindung besteht. Potentielle Glykosylierungsstellen finden sich vier in der extrazellulären Domäne von EmRSK3, wobei die erste in der Aminosäure 23 zwischen dem dritten und vierten Cystein, die zweite in der Aminosäure 40 zwischen dem fünften und sechsten Cystein, die dritte in der Aminosäure 68 zwischen dem siebten und achte Cystein und die vierte in der Aminosäure 84 am Ende der Activin-Rezeptor-Domäne und kurz nach dem Cystein-Box liegt. Abbildung 30 veranschaulicht die Struktur der *Echinococcus*-Rezeptoren.

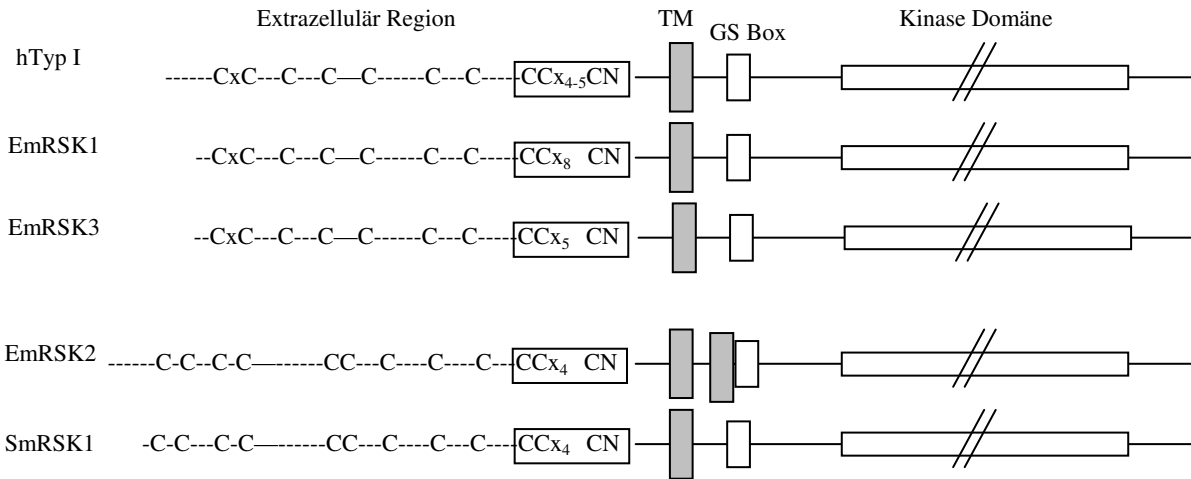


Abbildung 30 – Cystein-Anordnung in der extrazellulären Domäne der *E. multilocularis* TGFβ-Rezeptoren. C: Cysteine in der extrazellulären Region. Die Cystein Box durch Umrahmung hervorgehoben. TM: Transmembranregion; GS Box: Glycin/Serin Box; die unterbrechenden Schrägstriche im Bereich der Kinase-Domänen soll zeigen, dass die einzelnen Kinase Domänen unterschiedlicher Länge sind. hTyp I (human) EmRSK (*E. multilocularis*); SmRSK1 (*S. mansoni*).

4.2.5.2 Analyse der Transmembrandomäne von EmRSK2 und EmRSK3

Die Sequenzanalyse von EmRSK2 (SMART) ergab zwei putative Transmembrandomänen, was ungewöhnlich für einen Typ I-Rezeptor ist. Diese liegen zwischen den Aminosäuren L₁₅₃-W₁₇₅ und V₂₄₂-L₂₆₄. Jede Region umfasst 23 Aminosäuren.

EmRSK3 enthält nur eine potentielle Transmembrandomäne, welche ebenfalls 23 Aminosäuren lang ist. Sie liegt zwischen den Aminosäuren I₁₂₂-I₁₄₄.

4.2.5.3 Analyse der intrazellulären Domäne von EmRSK2 und EmRSK3

Der zytoplasmatische Teil von **EmRSK2** und **EmRSK3** zeigt zwei konservierte Domänen: die GS-Domäne und die Ser/Thr- Kinase-Domäne.

4.2.5.3.1 Die GS-Domäne und die GS-Box

Die GS-Domäne ist eine konservierte Region von ca. 30 Aminosäuren Länge. Sie liegt direkt upstream der Ser/Thr-Kinase-Domäne. In der GS-Domäne ist ein Abschnitt von 3 aufeinanderfolgenden Serin/Glycin-Aminosäuren (SGSGSG) auffällig, welcher als GS-Box bezeichnet wird. Die GS-Box gilt als Charakteristikum der Superfamilie der TGF β Typ I-Rezeptoren. Die GS-Domäne dient als Phosphorylierungsstelle zur Aktivierung der Säugerrezeptoren (Wrana et al., 1994a, b; Ventura et al., 1994). Eine Mutation von zwei oder mehr Serin- oder Threonin-Reste im TGF β Typ I-Rezeptor-Motiv TTSGSGSG stört die Phosphorylierung und behindert somit die Signalweiterleitung (Wieser et al., 1995).

Beide Echinokokken-Rezeptoren EmRSK2 und EmRSK3 weisen eine typische GS-Domäne mit GS-Box auf, womit sie der Gruppe der Typ I-Rezeptoren der TGF β -Superfamilie zugeordnet werden können. Bei EmRSK2 liegt die GS-Domäne im Bereich von den Aminosäuren G₃₅₃ bis V₃₈₀ (Abbildung 27), bei EmRSK3 liegt sie im Bereich von S₂₅₃ bis I₂₈₁ (Abbildung 28).

Bei EmRSK2 findet sich in der GS-Box eine Insertion von zwei Aminosäuren (GA), so dass folgendes Motiv resultiert: SGSGS **GA** G (Abbildung 27, Tabelle 13).

Eine Insertion von zwei Aminosäuren findet sich auch bei einem TGF β -homologen Typ I-Rezeptor von *Ancylostoma caninum*, wo man das Motiv SGSGS **GS** G findet. Eine Insertion von einer Aminosäure findet sich in Atr-I, einem Activin Typ I-Rezeptor von *D. melanogaster*: SGSGS **A** G (Tabelle 13).

4.2.5.3.2 Das Leucin/Prolin (LP)-Motiv: Bindungsstelle für das Immunophilin FKBP12

Der GS-Box folgt bei allen Säuger-Typ I-Rezeptoren der TGF β Superfamilien ein Leucin-Prolin Motiv, welches Bindungsstelle für das Immunophilin FKBP12 ist und als negatives Regulator-System dient (Chen et al., 1997). Auch in Typ I-Rezeptoren von Arthropoden (*D. melanogaster* und *Anopheles gambiae*) und in einem Activin-ähnlichen Rezeptor im Mollusken *Crasostrea gigas* findet sich das konservierte LP-Motiv.

Bei EmRSK2 aber fehlt dieses Leucin-Prolin-Motiv. Nach der GS-Box findet sich folgendes Motiv: SGSGSGAG **QP**. Statt Leucin (L) findet sich hier also ein Glutamin (Q). Bei den anderen beiden identifizierten EmRSK-Rezeptoren (EmRSK3 und EmRSK1) findet man auch kein Leucin-Prolin-Motiv. Auch in den bisher identifizierten Typ I-Rezeptoren der Nematoden und Trematoden konnte

4. Ergebnisse

kein LP-Motiv gefunden werden. Tabelle 13 soll den hier durchgeführten Vergleich der GS-Boxen und LP-Motive bei den unterschiedlichen Species veranschaulichen.

GS-Motiv	Rezeptor Typ I	Organismus	Genbank-Code
SGSGS G LP LL	Alk3	<i>H. sapiens</i>	NP_004320
SGSGS G LP LL	Alk5	<i>H. sapiens</i>	NP_004603
SGSGS G LP LF	Alk4	<i>H. sapiens</i>	ACVR1B
SGSGS G LP FL	Alk1/Alk2	<i>H. sapiens</i>	P37023/AAH33867
SGSGS G LP LL	thickveins	<i>A. gambiae</i>	AAT07316
SGSGS G LP LL	Sax	<i>D. melanogaster</i>	I45712
SGSGS-AG LP LL	Atr-1	<i>D. melanogaster</i>	A55921
SGSGS G LP FL	cg-ALR1	<i>C. gigas</i>	CAC85263
SGCGS G PP TL	BMP Typ Ib	<i>C. gigas</i>	CAE11917
SGSGSGSG NA TM	TGH-1	<i>A. caninum</i>	AY942845
SGSGS G FA SL	Bp-TGH-1	<i>B. Pahangi</i>	AAC47801
SGSGM G PT TL	Daf-1	<i>C. elegans</i>	NP_499868
SGSGS G QA AL	Sma-6	<i>C. elegans</i>	AAD12261
SGSGS G KP LL	SmRK1	<i>S. mansoni</i>	AF031557
SGSGS G KP FL	EmRSK1	<i>E. multilocularis</i>	CAH56493
SGSGSGAG QP LL	EmRSK2	<i>E. multilocularis</i>	*
SGSGS G VP FL	EmRSK3	<i>E. multilocularis</i>	*

Tabelle 13 – GS-Box und LP Motiv-Vergleich. Die GS-Box inklusive LP Motiv aus mehreren Typ I-Rezeptoren anderer Species wird im Vergleich zu homologen Stellen der *E. multilocularis* TGF β -Rezeptoren-Sequenzen dargestellt. Alk5 (TGF β)/ Alk3 (BMP), Alk4, Alk1/2 aus *Homo sapiens*; *A. gambiae*, *Anopheles gambiae*; Sax, Atr-1 aus *Drosophila melanogaster*; *C. gigas*, *Crasostrea gigas*; *A. caninum*, *Ancylostoma caninum*; *B. pahangi*, *Brugia pahangi*; Daf-I, Sma-6 aus *Caenorhabditis elegans*; *S. mansoni*, *Schistosoma mansoni*; EmRSK1 EmRSK2 EmRSK3 aus *Echinococcus multilocularis*. * : Diese Arbeit.

4.2.5.3.3 Die Serin/Threonin -Kinase-Domäne

Die Ser/Thr Kinase Domäne umfasst nahezu den gesamten intrazellulären Teil der *E. multilocularis* TGF β -Rezeptoren. Bei EmRSK2 reicht sie von der Aminosäure T₃₈₁ bis zu L₆₇₀. Zwischen den Aminosäuren 387 bis 394 liegt hier eine ATP/Mg²⁺-Bindungsstelle (GEGRYGEV) (Hanks et al, 1988; Van der Geeret al., 1994; Ting et al., 1994), bei der das Valin für die Positionierung zuständig ist. EmRSK3 hat seine Ser/Thr Kinase-Domäne im Bereich der Aminosäure I₂₈₁ bis L₆₀₇ lokalisiert. Die ATP/Mg²⁺-Bindungsstelle (GKGRYGEV) findet man bei Aminosäure 288 (Hanks et al, 1988; Van der Geer et al., 1994; Ting et al., 1994).

4.2.5.3.4 Der Ser/Thr-Kinase Konsensus

Der Konsensus für die Ser/Thr Kinasen GT/SxxY/FxAPE (Hanks et al., 1988) ist in EmRSK2 und EmRSK3 als **GTKRYMAPE** Motiv voll konserviert.

Dabei haben die letzten drei Aminosäuren des Konsensus, das Ala-Pro-Glu-Motiv, eine besondere Bedeutung für die katalytische Funktion des Rezeptors (Hunter & Cooper, 1986). Diese drei Aminosäuren finden sich in EmRSK2 an der Aminosäureposition 556-558, bei EmRSK3 an der Aminosäureposition 457-459.

4.2.5.3.5 Der Loop L45 bestimmt die Spezifität der Smad-Interaktion

Die Faktoren der TGF β Superfamilie benutzen verschiedene Sets von Rezeptoren und verschiedene Smads als Downstreamfaktoren, um das Signal bis zum Zellkern weiterzuleiten. Rezeptoren, die über TGF β oder Activine aktiviert werden (z.B. Alk5 und Alk4), verwenden die AR-Smads (z.B. Smad2 und 3) für die Signalweiterleitung, während die von BMP-Liganden aktivierte Rezeptoren (z.B. Alk2, Alk3 und Alk6) BR-Smads (Smad1, 5 und 8) benutzen (Lo et al., 1998).

Für die Interaktion zwischen den Typ I-Rezeptoren mit den R-Smads als wichtig wurden zwei Regionen identifiziert. Dabei wird die Spezifität der Interaktion dem L45 Loop bei den TGF β -Rezeptoren (Feng & Derynck, 1997) bzw. dem korrespondierenden L3 Loop bei den R-Smads (Lo et al., 1998) zugeschrieben. Aufgrund ihres Sequenzmusters im Loop L45 (A₄₄₀-S₄₄₈) kann EmRSK2 zusammen mit den Rezeptoren Alk4 und Alk5, die mit den AR-Smads interagieren, eingruppiert werden.

Der Loop L45 von EmRSK3 (S₃₄₁-C₃₄₉) zeigt auf der anderen Seite höhere Homologie zu den Loop L45 von Alk1 und Alk2, zwei Rezeptoren die die BR-Smads verwenden (

Tabelle 14).

Rezeptoren	Loop L45
Alk1/2	SDMTS R N/H S S/C
EmRSK1	SDMIS R G G C
EmRSK3	SDITS R Y G C
Alk3 (BMP Typ)	ADIKG T/N G S W
Alk5 (TGF β Typ)	ADNKD N G T W
EmRSK2	ADNKD N G I S

Tabelle 14 - Sequenzvergleich der L45 Loops verschiedener TGF β -Rezeptoren. Der L45 Loop der *Echinococcus*-Rezeptoren wird mit dem L45 Loop von humanen Rezeptoren verschiedener TGF β -Rezeptoruntergruppen verglichen.

4.2.6 Funktionsanalyse des in *Echinococcus multilocularis* identifizierten TGF β -Rezeptors EmRSK1

Um EmRSK1 komplett zu charakterisieren, wurden zum einen die Interaktionsfähigkeit mittels „Yeast Two Hybrid“ und zum anderen die Kinase-Aktivität des Rezeptors in Säugerzellen analysiert. Dafür mussten verschiedene Konstrukte hergestellt werden.

4.2.6.1 Klonierung von *emrsk1* zur Erstellung der Konstrukte

Bei der Amplifizierung der kompletten Sequenz vom *emrsk1* aus einer *Echinococcus* cDNA-Bibliothek fanden sich sowohl im Bereich des 5'-Ende (ersten 17 Aminosäuren) als auch des 3'-Ende (letzten 15 Aminosäuren) Unterschiede zur vorher beschriebenen *emrsk1*-Sequenz (Kroner 2002). Durch wiederholte Sequenzanalysen sowohl von *Echinococcus*-cDNA als auch von genomischer DNA konnte die in Abbildung 31 angegebene Sequenz von *emrsk1* bestätigt werden. Die korrekte Sequenz für *emrsk1* zeigt im extrazellulären Bereich 7 Cysteine in der Anordnung CxCx₅Cx₆Cx₅Cx₁₈GCx₁₀Cx₉CCx₈CN, was in Einklang mit den schon gemachten Beobachtungen bei Typ I-Rezeptoren steht.

Die komplette Aminosäure-Sequenz vom EmRSK1, deren cDNA für die Konstruktion der verschiedenen Konstrukte verwandt wurde, ist in Abbildung 31 gezeigt (Gen Bank Acc. No. AJ556224).

```

TGTTGTACAAAACCTCTGTGATTAAATGAAAAACATACCATTTGTGCAAATGTTTCCATCGGAAACTTGTGTGGAAAGATCATCG 0090
      * M K K H T I L C K C F P S E T C V E R S S 0021
GAATGCGCGTCTTTGATTGGATGCTTTTATTCTGTCCAAAAGGACGCCTTAGGATATGTGGTCGACGAGCATTATGGTTGCCTTCTCAAT 0180
E C A S L I G C F Y S V Q K D A L G Y V V D E H Y G C L L N* 0051
AATTCCTTTCCATAATCTCCTGCCTCAATTTCCGTGGTACCAATACAACCTGCTGCTTTTCATCAAACCTCCTCGGACTATTGTAATGCG 0270
N S F S I I S C L N F R G T N* T T C C F S S N* S S D Y C N A 0081
CATCTCCTGTAAACAAACAGAATACCGGTGCCTTGTTTTTTCCACTCACATTTTTTACCGTACTCTGCATTTTGTGTTTGTATTAGCC 0360
H L P V N K Q N T G A [L F F P L T F F T V L C I L L F V L A] 0111
TTTGTGTATATCAAAGGGAACCTCAGCAAACATGAGAAGCCCCTTACAAAGCATTCCCTCCCCTTATTTTCCCGAATTACTGATAGTGGC 0450
[F V Y I] K G N F S K H E K P L T [K H S S P Y F P E F T D S G] 0141
AGCGGGTCGGGAAAGCCGTTCTTAGTTAGTCAACAATTGCTCGTCAACAACCCCTTCTGGTATGTATCGGAAAAGGTCGGTTCGGCGAA 0540
[S G S G] K P F L V S Q T I A R Q T T L L V C I G K G R F G E 0171

```

4. Ergebnisse

GTATGGCGAGCCGCTGCAATGGCGAAGTTGTTGCTGTGAAGATCTTTTCCAGCCGTGATGGCGCCAGTTGGACCCGTGAAACTCAGATA M W R A V C N G E V V A V K I F S S R D G A S W T R E T Q I	0630 0201
TATAACCACTGCTCTCCTTTCTCACCCGAACATTCTCGCCTATTATGCCAGTGATATGATTTACGCGGTGGATGTACTCAACTCTGGCTT Y T T A L L S H P N I L A Y Y A S D M I S R G G C T Q L W L	0720 0231
GTTACCGCCTACCACGCTGCCGGTTCCTGCACGATTTCCTTTCCACGGCAAAGGTGTGACTCCGCAATGTGGACTCAAAC TAGCCCGA V T A Y H A A G S L H D F L S T A K G V T P Q C G L K L A R	0810 0261
TCAATCGCTGCGGGTCTAGCCTTTCTCCACAGCGAAGTAGTTGGATTTCA TGGCAAACCGCGATTGCCCATAGGGATATTAATCTAAG S I A A G L A F L H S E V V G F H G K P P I A H R D I K S K	0900 0291
AATATTCTGGTTATAGCTAAACAATGAGGCCTGTTGGCAGATTTTGGTCTCGCTCTGGTAAAAACTTCCAAAGGAATGAATGGTGGGGG N I L V M A N N E A C L A D F G L A L V K T S K G M N G G G	0990 0321
ACCAGCGATGAGGCAAATGAGAGCGGTGACGCTCTACCTCCCGTAGCCTCTTCG CAGGAACCAAACGGTACATGGCTCCTGAGATATTG T S D E A N E S G D A L P P A S L F A G T K R Y M A P E I L	1080 0351
GCTCTTTATCCCTTGGTGTGGGGTGGCTGGGTGCGTGCGCAGGAGAGGCAGATAGACAAGAAACAGTCTGGGGAGTGTGATGAA A L Y P L V W G G W V R A R T Q E R Q I D K K Q S G E C D E	1170 0381
GACAATTTGTCTATTCCAGGGGAATTGTTAGAGTGCCGACATCCGCTGCTTTCTTTTCGATGTCTATCTATCCACAGATGTCTACGACTG D N L S I P G E (L) L E C R H P (L) L S F D V Y (L) S T D V Y A (L)	1260 0411
GGACTCGTTCTATGGGAGATTTGGAGGCGTTGTACAGGCAAACAATACGAGCTTCCTTATTATGACTCGGTGCCATCGGATCCAAACTTC G L V L W E (L) W R R C T G K Q Y E L P Y Y D S V P S D P N F	1350 0441
TTACAGATGTACAGAGTGGTAGTATGGGGGAACCTATGATTCTCCTTGTAAACACCTGGTAGACCTGCCCTACCAATGCAGGTGTGC L Q M Y R V V V L G E P Y D S P C N T L V D L P L P M Q V C	1440 0471
CACCTATGCAACCACATTCTGGTGGGTGCAATGGTGAACCGTGAAGCTCACCGCCACCGCGACACGGGGGAGCGGGAGCGGCC H L C N H I L V G R I G A T L E A H R H R R H G G S G R R P	1530 0501
TCCCTGACAATGGAGCGGAGGGGAGCAGTGATGAGGAGTGGCTGGTGCAGTGGGCGGACGTCATTGCGGAGTGTGGCACCCCTCGTTAC S L T M E R R G S S D E E W L V R W A D V I A E C W H P R Y	1620 0531
ACACACCGCCTCTCGGCCCTGCGCGTGCACAAACCTCACAGTCATCGAGGCGACTGTGAGCTGAATCGGACGCTGCGTTGGACACTTT T H R L S A L R V R K T L T V I E A T V S *	1710 0552
TTATGCTCAGAACCTTGCAATTAATGTTCTCTCTTTTAAATGAAATTCCTGGTAAAAATATGGTATTAAATGCATACGCACCGACCCAAAAA AAAAAAAAA	1800 1809

Abbildung 31 - Komplette Nukleotide- und Aminosäuresequenz von EmRSK1 (Gen Bank Acc. No. AJ556224).

Die wichtigen Abschnitte sind wie folgt markiert: extrazelluläre Cysteine: weiße C's auf schwarzen Kreisen, putative Glykosilierungsstellen: mit Sternchen versehene N's , Transmembran-Region: kursive, umrahmte Aminosäuren, GS-Region: dicke Umrahmung mit unterbrochener Linienführung, GS-Box: umkringelte Aminosäuren, Kinase-Domäne: fett. In ihrem Bereich liegt auch die ATP/Mg²⁺ -Bindungsstelle, die durch einen schwarzen Hintergrund mit weißen Buchstaben gekennzeichnet ist. Ebenfalls findet sich hier der Loop L45, dessen zugehörige Aminosäuren auf grauem Hintergrund dargestellt sind. Die katalytisch wichtigen Reste sind durch übergeschriebene Pluszeichen (+) hervorgehoben. Die Leucin/Isoleucin Reste des putativen Leucin-Zippers sind durch graue Kreise markiert. Sterne symbolisieren das Stop-Codon des Leserasters und ein stromaufwärts gelegenes in-frame-Stopcodon. Der Pfeil zeigt an, wo sich das Intron befände.

4.2.6.2 EmRSK1-EmSmad-Interaktionsstudien mittels Yeast Two Hybrid

Für Untersuchungen zur EmRSK1 Kinase-Aktivität war es zuerst notwendig zu wissen, welcher *Echinococcus* Smad als Downstreamfaktor des EmRSK1 Rezeptors dient. Um die Interaktion zwischen dem intrazellulären Teil vom EmRSK1 (EmRSK1i) und den EmSmads zu untersuchen, wurde das Yeast Two Hybrid System eingesetzt. Dabei wurden sowohl verschiedene Mutantenkonstrukte für EmRSK1i und EmSmads als auch die wildtypische Form eingesetzt. Da EmSmadC, wie oben beschrieben, als Fusionsprotein im BD-Vektor das Reportergen für die Transkription in AH109 Hefezellen aktiviert, so dass immer ein Hefezellen-Wachstum im Mangelmedium resultiert, wurden alle EmSmads sowohl als wildtypische als auch in mutierter Form im AD-Vektor kloniert. EmRSK1i in allen Versionen wurde in den BD-Vektor kloniert.

Nach ihrer Phosphorylierung durch die Ser/Thr-Kinase-Aktivität des Typ I-Rezeptors trennen sich die Smad-Proteine vom Rezeptor, was die Yeast Two Hybrid Untersuchungen erschwert. Durch eine Extension von 3 Aminosäuren am C-terminalen Ende der Smads wird die Phosphorylierungsstelle SSxS der Smads beeinträchtigt, was eine Loslösung der Smads vom Rezeptor verhindert. Daraus resultiert ein stabiler Smad-Rezeptor-Komplex (Nakao et al., 1997; Osman et al., 2001). Um diesen Effekt zu erreichen, wurden die *emsmad*-Leseraster so amplifiziert, dass das Stopcodon entfernt wurde und 3 Aminosäuren als Extension am C-terminalen eingefügt wurden. Die so mutierten EmSmads wurden mit EmSmadA-3; EmSmadB-3 und EmSmadC-3 bezeichnet.

In den kodierenden Bereich für EmRSK1i wurden zwei Mutationen eingeführt, wobei die Mutationen jeweils im Bereich der GS-Domäne lokalisiert sind. Die erste Mutante EmRSK1i-ka hat eine Punktmutation im Bereich der Aminosäure 157: Q wurde durch D ausgetauscht, was laut Untersuchungen am humanen Rezeptor (Wieser et al., 1995) zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen sollte; die andere Mutante EmRSK1i-dm hat neben der schon beschriebenen Q₁₅₇-D Mutation eine Austauschmutation der Aminosäure 153 (T wird durch D ersetzt), was zu einer Inaktivierung der Rezeptor-Kinase führen sollte (Wieser et al., 1995).

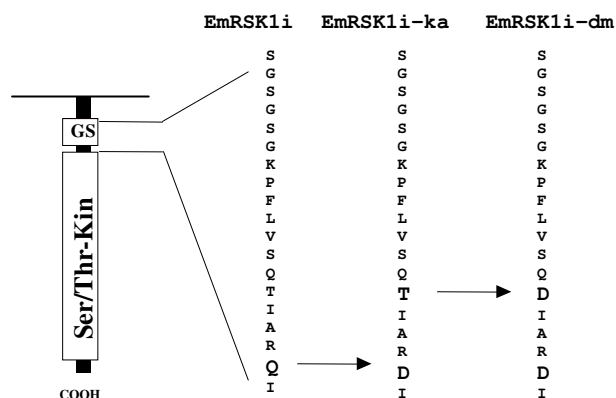


Abbildung 32 - Schematische Darstellung der in den intrazellulären Teil von EmRSK1 eingeführten Mutationen.

Die Mutationen sind in der GS-Box lokalisiert. EmRSK1i (wild Typ); EmRSK1i-ka (enthält die Q₁₅₇-D Mutation, die zur einer konstitutiv aktiven Form führen sollte (Wieser et al., 1995); EmRSK1i-dm (enthält die Q₁₅₇-D Mutation und zusätzlich die T₁₅₃-D Mutation, die zur einer Inaktivierung der Kinase-Domäne führen sollte). Die Mutationen sind durch Pfeile und Fettdruck gekennzeichnet.

Bei der Interaktionsanalyse mittels YTH konnte keine Interaktion, weder von dem Wildtyp-EmRSK1 noch von seinen Mutanten mit den mutierten und nicht mutierten EmSmads gefunden werden. Darum wurde im nächsten Schritt eine Funktionsanalyse in Säugerzellen durchgeführt.

4.2.6.3 Funktionsanalyse von EmRSK1 in Säugerzellen

EmRSK1 zeigte die höchste Homologie zu der Alk1/2 Gruppe der TGF β -Rezeptor-Superfamilie. Die Alk1- und Alk2-Rezeptoren aktivieren als downstream-Effektoren BR-Smads (Macias-Silva et al., 1998; Chen & Massague 1999). Aus diesem Grund könnte man eine Interaktion zwischen dem EmRSK1-Rezeptor und EmSmadB vermuten, welches wie in Kapitel 4.1.4 und 4.1.11 gezeigt zur BR-Smad-Gruppe gehört.

Im Grundzustand sind die Typ I-Rezeptoren typischerweise inaktiv, haben aber eine aktivierbare Kinaseaktivität. Die Aktivierung findet, wie oben beschrieben, durch eine Phosphorylierung der Serin- und Threonin-Reste im Bereich der GS-Domäne des Typ I-Rezeptors statt. Die Phosphorylierung geschieht durch einen Typ II-Rezeptor, nachdem an diesen ein Ligand gebunden hat (Lutz & Knaus, 2002; Shi & Massague, 2003; Nohe et al., 2004; de Caestecker, 2004).

Bisher konnten weder Liganden noch einen Typ II-Rezeptor für EmRSK1 identifiziert werden. Aus diesem Grund und angesichts des hoch konservierten Signalübertragungsmechanismus der TGF β Superfamilie wurde eine Funktionsanalyse von EmRSK1 mit Hilfe eines heterologen Säuger-Systems durchgeführt.

Als Indikator einer Kinase-Aktivität von EmRSK1 dient die Phosphorylierung der Echinokken-Smads, so dass es Ziel war, über eine Phosphorylierung der EmSmads im heterologen Säuger-System eine Aktivierung der Kinasefunktion des EmRSK1 nachzuweisen. Für dieses Experiment wurde zunächst die komplette Sequenz des *emrsk1*-Leserasters aus einer *Echinococcus* cDNA-Bibliothek (Hubert et al., 2004) amplifiziert und in den Säuger-Expressions-Vektor (pSecTag2/Hygro) kloniert. Proteine, die durch diesen Vektor exprimiert werden, werden am N-terminalen Ende mit der Signalsequenz der Mäuse-Ig-kappa-Kette fusioniert, was eine Proteinsekretion bewirkt. Da EmRSK1 selbst keine Signalsequenz aufweist, könnte durch Klonierung in den pSecTag2/Hygro-Vektor sichergestellt werden, dass EmRSK1 den sekretorischen Weg einschlägt. Für die Klonierung waren durch spezifische Primer (Siehe Kapitel 3.1.3) bei der PCR-Amplifizierung die Schnittstelle HindIII am 5'-Ende und die Schnittstelle XhoI am 3'-Ende des *emrsk1*-Leserasters eingefügt worden. Zusammen mit EmRSK1 wurden jeweils EmSmadA, EmSmadB oder EmSmadC in HEK 293-T Zellen exprimiert. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine über ein 12.5 %-iges Polyacrylamidgel und deren Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde eine immunchemische Färbung mit Anti-p-Smad1 und anti-p-Smad2-Antikörpern (Persson et al., 1998), die nur an die phosphorylierte Form des BR-Smad1 bzw. AR-Smads binden, durchgeführt. Auf diese Weise konnte der Aktivitätsstatus des EmRSK1 beurteilt werden.

Wurde die komplette Sequenz des EmRSK1 in seiner wild-Typischen Form mit EmSmadA, EmSmadB oder EmSmadC ohne Zugabe eines Liganden oder eines Typ II-Rezeptors co-exprimiert, konnte keine Phosphorylierung der EmSmads nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich ableiten, dass EmRSK1 in seiner wild-Typischen Form inaktiv ist, und dass eine Überexpression von EmRSK1 in HEK293-T Zellen nicht in einer unspezifischen Aktivierung des Rezeptors resultiert. So ist sichergestellt, dass Phosphorylierungen der EmSmads nach Zugabe von exogenen Liganden und/oder Typ II-Rezeptoren als spezifisch betrachtet werden könnten.

4.2.6.3.1 EmRSK1 benötigt zur Aktivierung einen Typ II-Rezeptor der TGF β /BMP-Familie

Die Liganden der TGF β Superfamilie rufen durch ihre Bindung die Bildung eines Rezeptorkomplexes aus Typ I- und Typ II-Rezeptoren hervor. Dadurch wird eine Aktivierung des Typ I -Rezeptoren hervorgerufen. Aus diesem Grunde sollten im nächsten Schritt die zuvor mit *emrsk1*, *emsmadA*, *emsmadB* oder *emsmadC* transfizierte HEK293-T Zellen mit humanem TGF β 1 oder mit humanen BMP2 stimuliert werden.

Die Stimulierung mit TGF β 1 oder BMP2 bewirkte jedoch auch keine Phosphorylierung der *Echinococcus* Smads. Die Kinaseaktivität des in den HEK293-T exprimierten EmRSK1-Rezeptors konnte also trotz Zugabe von TGF β 1 oder BMP2 nicht stimuliert werden. Dieses Resultat suggeriert, dass ein zusätzlicher Typ II-Rezeptor für die Aktivierung des EmRSK1 Kinase notwendig sein könnte und dass die in den HEK293-T Zellen vorhandenen, endogenen Typ II-Rezeptoren nicht in der Lage sind, um bei Anwesenheit des Liganden EmRSK1 zu aktivieren.

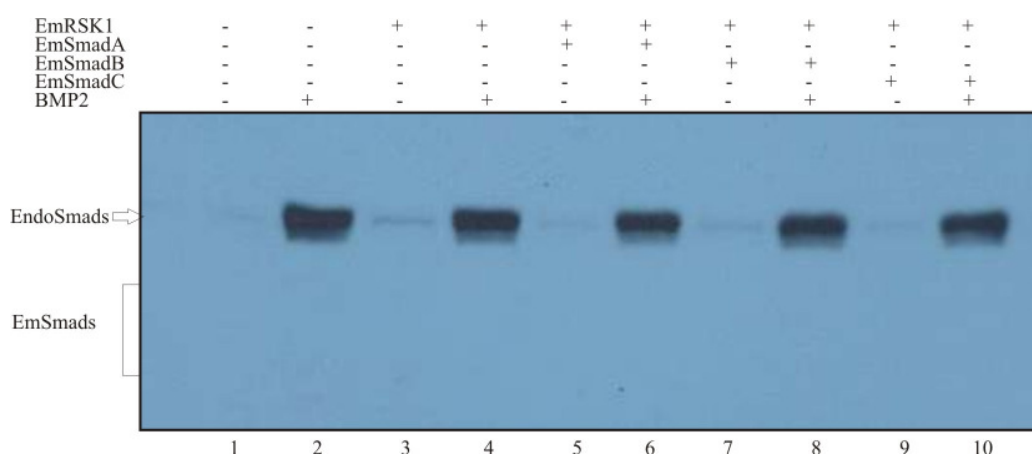


Abbildung 33 - BMP2 Stimulierung der mit *Echinococcus* Faktoren transfizierten HEK293-T Zellen. Spur 1, 2: Mock = nicht transfizierte Zellen als Negativ-Kontrolle; Spur 3, 4 EmRSK1 ohne Smad; Spur 5, 6 EmRSK1 mit EmSmadA, Spur 7, 8 EmRSK1 mit EmSmadB, Spur 9, 10 EmRSK1 mit EmSmadC. Ungerade Spuren: ohne Zugabe von BMP2, gerade Spuren: mit Zugabe von BMP2. Es wurde keine Phosphorylierung der EmSmads beobachtet. Die Phosphorylierung der endogenen Smads kann als Kontrolle für die erfolgte BMP-Aktivierung betrachtet werden. Verwendeter Antikörper: antiphospho-Smad1 (s.o.).

4.2.6.3.2 Humanes BMP2 aktiviert EmRSK1 in Anwesenheit von BRII

Um zu untersuchen ob EmRSK1 einen Typ II-Rezeptor für seine Aktivierung braucht und ob dies durch Verwendung von Säugerrezeptoren nachgestellt werden kann, wurde EmRSK1 zusammen mit dem humanen BMP Typ II-Rezeptor in HEK293-T Zellen exprimiert. Nach der Co-Expression beider Rezeptoren wurde eine Phosphorylierung von EmSmadB beobachtet. Die Phosphorylierung fand jedoch nur nach der Zugabe von BMP2 statt und war spezifisch für EmSmadB, denn weder EmSmadA noch EmSmadC konnten unter den gleichen Bedingungen phosphoryliert werden. Die Zugabe von TGF β 1 führte zu keiner Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von EmSmadB durch

EmRSK1 im Komplex mit dem BRII-Rezeptor war im Vergleich zu der Phosphorylierung von EmSmadB durch BRIIa im Komplex mit dem BRII-Rezeptor schwächer.

Um zu untersuchen, ob der humane TGF β Typ II-Rezeptor den EmRSK1 besser als der BRII-Rezeptor aktivieren könnte und folglich daraus eine stärkere Phosphorylierung von EmSmadB resultiert, wurde EmRSK1 zusammen mit dem humanen TRII in HEK293-T Zellen exprimiert. Aus dieser Co-Expression resultierte kein aktiver Komplex, es wurde keine Phosphorylierung der *Echinococcus*-Smads gesehen. Auch nach Zugabe von TGF β 1 konnte unter diesen Bedingungen keine Aktivierung des EmRSK1 beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte trotz der nur relativ schwachen Phosphorylierung von EmSmadB eine Aktivierung des EmRSK1 in einem heterologen Expressionssystem gezeigt werden, was die Konservierung beider Systeme widerspiegelt. Es konnte auch die Spezifität von EmRSK1 für die Teilnahme am BMP-Signaltransduktionssystem gezeigt werden, denn eine Stimulierung durch den TRII-Rezeptor war auch nach Zugabe des TGF β -Liganden nicht möglich. In Abbildung 34 sind die hier geschilderten Ergebnisse veranschaulicht.

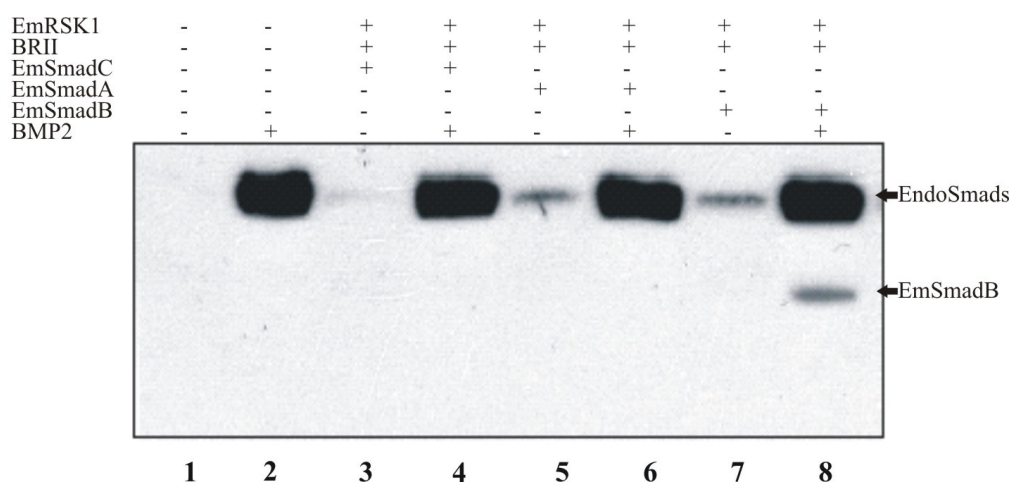


Abbildung 34 - Aktivierung von EmRSK1 durch BMP2 und BRII. Mock (1, 2); EmRSK1/BRII/EmSmadC (3, 4); EmRSK1/BRII/EmSmadA (5, 6); EmRSK1/BRII/EmSmadB (7, 8). Die Phosphorylierung von EmSmadB fand nur nach Stimulierung durch BMP2 bei Anwesenheit vom BRII-Rezeptor statt. Verwendete Antikörper: Anti-phospho Smad1 (s. o.). Die Aktivität von EmRSK1 war spezifisch für EmSmadB, weil EmSmadA und EmSmadC nicht phosphoryliert wurden. Die HEK293 Zellen wurden 24 h nach der Transfektion 4 h im 0,2 % FCS Medium inkubiert. Die Zellen wurden 30 Min. mit 20 nM BMP2 stimuliert (s. Mat. und Met.).

4.2.6.3.3 Untersuchungen zum Einfluss einer Q-D-Mutation auf EmRSK1

In den EmSmadB-Phosphorylierungs- Experimenten (siehe Kapitel 4.1.11) zeigte sich eine deutlich geringere Phosphorylierung von EmSmadB durch die Kinase von EmRSK1 als durch die Kinase von BRIa. Dies könnte sich durch den unterschiedlichen Ursprung der beiden Rezeptoren erklären. Während gut etabliert ist, dass BRII der Aktivierungspartner des BRIa ist, konnte für EmRSK1 bislang kein Aktivierungspartner gefunden werden. Aufgrund der hohen Konservierung des von *C. elegans* bis zu den Säugern bekannten TGFβ-Übertragungssystem könnte zwar eine Aktivierung von EmRSK1 durch BRII möglich sein, doch kann man vermuten, dass diese Aktivierung von EmRSK1 durch einen heterologen Rezeptor nicht ganz optimal ablaufen kann. Eine andere Möglichkeit dieser unterschiedlichen Phosphorylierungsaktivität könnte auch eine unterschiedliche inhärente Beschaffenheit der Rezeptoren sein.

Zur Beantwortung dieser Frage, wäre die Herstellung einer konstitutiv aktiven Form von EmRSK1, welche nicht mehr abhängig von einem Typ II-Rezeptor wäre, ein hilfreiches Konstrukt.

Sowohl bei den TGFβ- als auch bei den BMP Typ I-Rezeptoren wurde schon eine konstitutiv aktive Form beschrieben. Bei den TGFβ-Rezeptoren wurde diese konstitutiv aktive Form durch eine Austauschmutation des im Bereich der GS-Domäne liegenden konservierten T₂₀₄ Restes (VQRTIART) durch D erreicht (Wieser et al., 1995), bei den BMP Typ I-Rezeptoren führte eine Punktmutation des ebenfalls im Bereich der GS-Domäne liegenden konservierten Q₂₃₃ (VQRTIAKQ) zu D zur konstitutiv aktiven Form. Diese Rezeptoren konnten so unabhängig von Liganden und Typ II-Rezeptoren Smad-Proteine phosphorylieren (Wieser et al., 1995; Attisano et al., 1996).

Mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) wurden entsprechende Mutationen im Bereich der GS-Domäne nun bei EmRSK1 (PrimerDw 5'-GTCAAACAATTGCTCGTGACACAACCCTTCTGGTATGTATCGG-3' und PrimerUp 5'-CCGATACATACCAGAAGGGTTGTGTCACGAGCAATTGTTTGAC-3') und in EmRSK2 (PrimerDw 5'-GGAACGCACAGTTGCGCGTGACGTCACCTTTGAGTGCACG-3' und PrimerUp 5'-CGTGCACTCAAAGTGACGTCACGCGCAACTGTGCGTTCC-3') durchgeführt. Bei EmRSK1 wurde Q₁₅₇ in dem Motiv VSQTIARQ durch ein D ausgetauscht, bei EmRSK2 wurde Q₂₈₀ im Motiv VERTVARQ ebenfalls durch ein D ersetzt. (s. Mat. und Met.). Die mutierten Rezeptoren wurden EmRSK1-ka und EmRSK2-ka genannt.

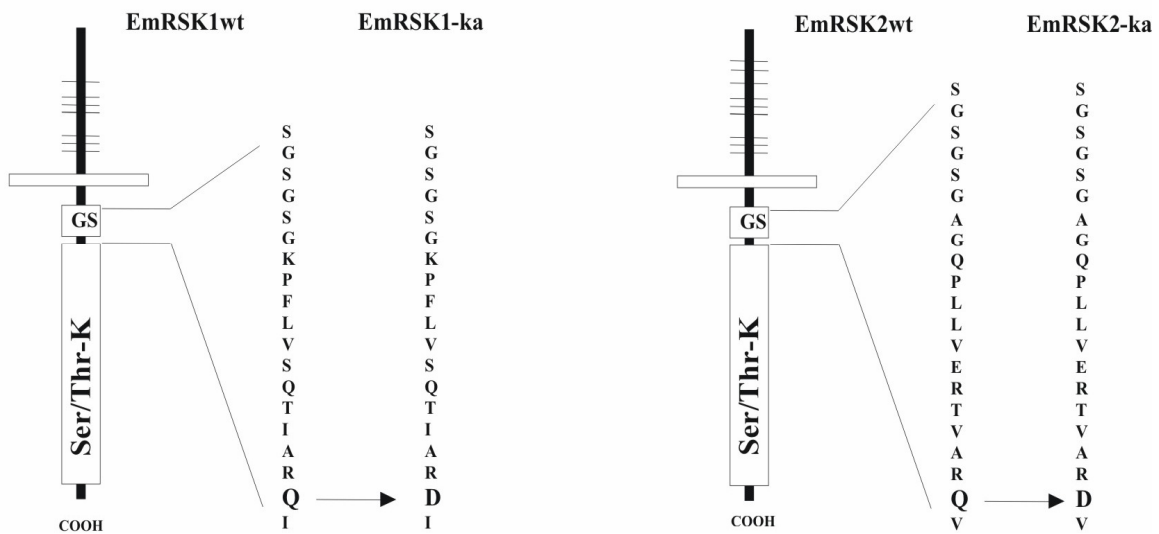


Abbildung 35 - Durchführung der Q-D Mutation im EmRSK1- und EmRSK2-Rezeptoren. Das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) wurde für die Produktion des EmRSK1-ka- B.w. EmRSK2-ka-Konstruktes eingesetzt. Die Aminosäure Q in Position 157 B.w. 280 (im Bereich der GS-Box) wurde gegen D ausgetauscht, um die potentiell konstitutiv aktive Formen zu produzieren.

Interessanterweise konnte nach Co-Expression von EmRSK1-ka zusammen mit EmSmadA, EmSmadB oder EmSmadC in HEK293-T Zellen keine Phosphorylierung der *Echinococcus* Smads beobachtet werden. Auch die zusätzliche Expression von TRII (jeweils mit und ohne Zugabe von humanem TGFβ1 als Liganden) oder von BRII (jeweils mit und ohne Zugabe von humanem BMP2 als Liganden) hatte keinen Einfluss auf die Kinase-Aktivität von EmRSK1-ka.

Dieses Ergebnis war deshalb überraschend, weil die im EmRSK1-Rezeptor durchgeführte Mutation offensichtlich zu keiner Aktivierung der Kinase führte, so wie es bei anderen Rezeptoren berichtet worden war. Die Mutation in EmRSK1-ka führte vielmehr zum gegenteiligen Effekt: während sich bei der Co-Expression von dem wild Typ EmRSK1 mit BRII und Zugabe von BMP2 eine Phosphorylierung von EmSmadB gezeigt hatte, konnte dies nicht bei Einsatz der EmRSK1-ka mutanten Rezeptorform beobachtet werden. Man muss also davon ausgehen, dass die Punktmutation zu einer Inaktivierung des EmRSK1-Rezeptors führt oder die Interaktion mit BRII inhibiert.

Zur Veranschaulichung dieser Ergebnisse dient hier

Abbildung 36.

4. Ergebnisse

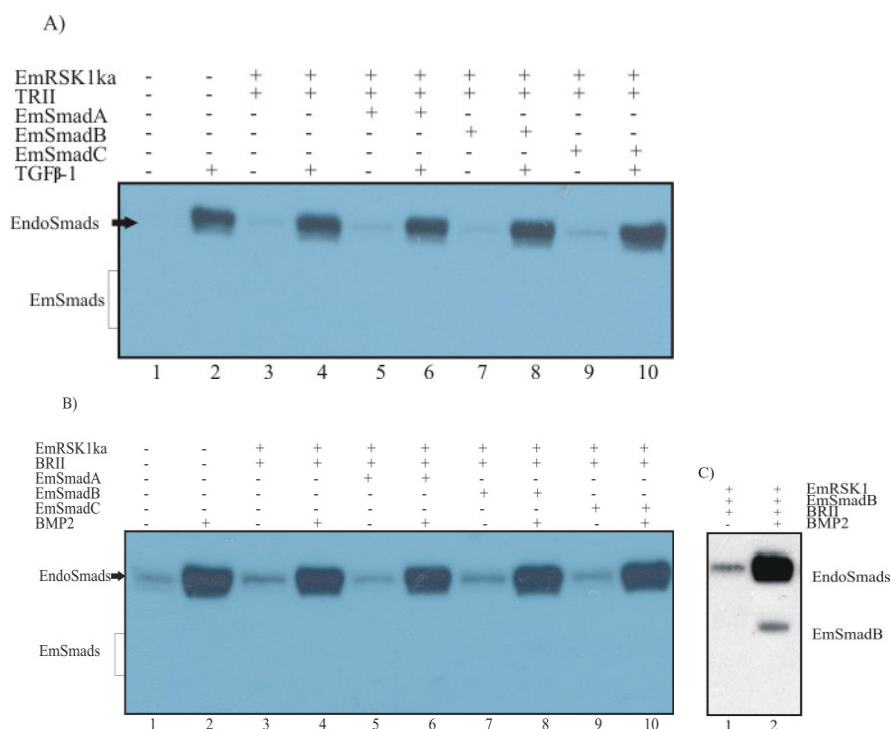


Abbildung 36 - Effekt der Q-D Mutation auf die Kinaseaktivität von EmRSK1. A) Co-Expression von EmRSK1ka mit TRII in An- (3, 5, 7, 9) oder Abwesenheit von TGFβ1 (4, 6, 8, 10); mit EmSmadA (5, 6); EmSmadB (7, 8); mit EmSmadC (9, 10); Mock (1, 2). B) Co-Expression von EmRSK1ka mit BRII in An- (1, 3, 5, 7, 9) oder Abwesenheit von BMP2 (2, 4, 6, 8, 10); mit EmSmadA (5, 6); EmSmadB (7, 8); mit EmSmadC (9, 10); Mock (1, 2). C) Als Positivkontrolle der Kinaseaktivität vom wildtypischen EmRSK1 wurde dieser mit BRII und EmSmadB coexprimiert. Es zeigt sich eine Phosphorylierung von EmSmadB nur nach Zugabe von BMP2.

Nach Einführung der Q-D-Austauschmutation verlor der EmRSK1-Rezeptor die Fähigkeit zur Phosphorylierung. Es stellte sich die Frage, warum die Q-D-Mutation im EmRSK1-Rezeptor nicht den gleichen Effekt (der einen konstitutiven Aktivierung) zeigte wie bei den schon in der Literatur beschriebenen Rezeptor-Mutationen. Auch sollte beantwortet werden, wie die Q-D-Mutation im EmRSK1 zu einer Inaktivierung der Kinase-Aktivität führt. Weil ein direkter Kontakt zwischen den intrazellulären Anteilen vom Typ II-Rezeptor mit dem Typ I-Rezeptor für die Aktivierung des Typ I-Rezeptor notwendig ist, wurde vermutet, dass die besagte Mutation diese Interaktion behindern könnte. Nun galt es genauer herauszufinden, wie diese Interaktionsbehinderung stattfinden könnte. Dazu sollte zuerst herausgefunden werden, welche Region von EmRSK1 an der Interaktion mit dem BRII-Rezeptor teilnimmt.

Die Intrazelluläre Region, die zwischen der Transmembrandomäne und dem Anfang der Kinase-Domäne liegt, umfasst ca. 40 Aminosäuren und wird als „Juxtamembranregion“ bezeichnet. Hier ist die GS-Domäne lokalisiert. Kommt es zu einer Deletion der kompletten Juxtamembranregion, findet sich keine Kinase-Aktivität des TRI Rezeptors mehr (Feng et al., 1995). Die Substitution

einzelner Aminosäuren in der GS-Domäne kann je nach Art der Substitution sowohl zu einem Funktionsverlust der Kinase-Aktivität aber auch zu einer Aktivierung führen (Wieser et al., 1995). Diese Resultate zeigen, dass die konservierte GS Domäne eine wichtige Rolle für die Aktivierung der Typ I-Rezeptor-Kinase spielt (Wieser et al., 1995) und vielleicht bei der Rekrutierung intrazellulärer Signal-Komponenten beteiligt ist (Saitoh et al., 1996).

Während die lange intrazelluläre Kinase-Domäne in den Typ I-Rezeptoren hoch konserviert ist, findet sich bei der intrazellulären Juxtamembranregion nur wenig Konservierung. Diese Sequenzvariabilität der Juxtamembranregion suggeriert eine wichtige Rolle dieser Region für die Signalspezifität der verschiedenen Liganden. Möglicherweise kommt es hier zu einer Interaktion mit verschiedenen intrazellulären Effektorproteinen (Saitoh et al., 1996).

4.2.6.4 Untersuchung der EmRSK1-Kinase-Aktivität mit Hilfe von Rezeptor-Chimären

Die Benutzung von Chimärerezeptoren ist nicht nur für die Untersuchung der Kinaseaktivität von großer Bedeutung, sondern hilft auch zu untersuchen, welche Regionen in einem Rezeptor eine wichtige Rolle für die Aktivierung des Rezeptors spielen können.

Herstellung der Rezeptorchimären aus humanem BRIa und EmRSK1

Weil EmRSK1 nur vom BRII aktiviert werden konnte, nicht aber von TRII, wurde der humane BRIa-ka Rezeptor für die Konstruktion von den verschiedenen Rezeptorchimären gewählt. Diese unterscheiden sich durch die Länge des N-terminalen humanen BRIa-ka-Abschnitts bzw. des C-terminalen EmRSK1-Abschnitts. In Abb. 37 wird die humane BRIa-ka-Aminosäuresequenz in ihrer gesamten Länge gezeigt. Das BRIa-ka-Konstrukt enthält die Q-D Mutation in der Aminosäure an Position 233, welche zur konstitutiv aktiven Form führt.

```
MPQLYIYIRLLGAYLFIISRVQGQNLDSMLHGTGMKSDSDQKSENGVTLAPEDTLPFLKCYCSGHCPDDAINNT
CITNGHCFALIEEDDOGETTLASGCMKYEGSDFQCKDSPKAQLRRTIECCRTNLCNQYLQPTLPPVIGPFFDGS
IFWLVLLISMAVCI IAMIIFSSCFYKHYCKSISSRRRYNRDLEQDEAFIPVGESLKDLIDQSQSSGSGSGLPLL
VORTIAKD I QMVRQV KGRYGEV WMGKWRGEKVAVKVFFTTEEASWFRETEIYQTVLMRHENILGFIAADIKGTG
SWTQLYLITDYHENGSLYDFLKCATLDTRALLKLAYSAAACGLCHLHTEIYGTQGKPAIAHRDLKSKNILIKKNGS
CCIADLGLAVKFNSDTNEVDVPLNTRVGTKRYMAPEVLDESLNKNHFQPYIMADIYSFGLI IWEMARRCITGGIV
EEYQLPYYNMVPSDPSYEDMREVVVCVKRLRPIVSNRWNSDECLRAVLKLMSECWAHNPASRLTALRIKKTAKMV
ESQDVKI
```

Abbildung 37 - Die Aminosäuresequenz des humanen BRIa-ka (P36894). Die komplette Sequenz enthält 532 Aminosäuren, wobei die ersten 152 Aminosäuren den extrazellulären Teil bilden. Die Transmembrandomäne enthält 24 Aminosäuren. Diese sind durch eine Umrahmung hervorgehoben. 356 Aminosäuren bilden die intrazelluläre Region. Die darin enthaltene GS-Domäne wird hier durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet. Die Mutationsstelle für die

4. Ergebnisse

Produktion des BRIa-ka ist hier durch einen schwarzen Hintergrund markiert. Die eingekreisten Aminosäuren sind die Nukleotidbindungsstelle. Doppelt unterstrichen ist der Loop L45.

Die drei konstruierten Rezeptorchimären werden hier näher beschrieben.

- Chimäre: QEmRSK1-ka

Bei der Konstruktion der ersten Chimäre wurden die ersten 139 N-terminalen Aminosäuren von EmRSK1-ka, welche sich aus der extrazellulären Region, dem Transmembranteil und den ersten 24 intrazellulären Aminosäuren zusammensetzt, durch die ersten N-terminalen 215 Aminosäuren von BRIa-ka (homologe Region) ausgetauscht. Der intrazelluläre Anteil samt GS-Domäne dieser Chimäre ist dem EmRSK1-ka zugehörig. Sie trägt jedoch die oben beschriebene Q-D-Mutation.

```
MPQLYIYIRLLGAYLFIIISRVQGNLDSMLHGTGMKSDSDQKSENGVTLAPEDTLPFLKCYCSGHCPDDAINNT
CITNGHCFAIIEEDDQGETTLASGCMKYEGSDFQCKDSPAQLRRTIECCRTNLCNQYLQPTLPPVIGPFFDGS
IRWLVLLISMAVCIAMIIFSSFCFYKHYCKSISSRRRYNRDLEQDEAFIPVGESLKDLIDQSQS SGSGSGKPFLL
VSQTIARDTTLVLCIGKREGEVWRAVCNGEVVAVKIFSSRDGASWTRETQIYTTALLSHPNILAYYASDMISRG
GCTQLWLVTAYHAAGSLHDFLSTAKGVTPQCGLKLARSIAAGLAFHSEVVGFHGKPP IAHRDIKSKNILVMANN
EACLADFGALVKTSGKMNGGGSDEANESGDALPPASLFAGTKRYMAPEILALYPLVWGGWVRARTQERQIDKK
QSGCEDENLSIPGELLECRHPLLSFDVYVYLDVYALGLVLWEIWRRTGKQYELPYDSVPSDPNLFQMYRVVV
LGEPYDSPCNTLVLDLPLPMQVCHLCNHILVGRIGATLEAHRHRRRHGGSGRRPPLTMERRGSSDEEWLVRWADVIA
ECWHPRYTHRLSALRVRKTLTVIEATVS
```

Abbildung 38 - Aminosäuresequenz der Chimäre QEmRSK1ka. Grau hinterlegt ist der dem humanen BRIa wt zugehörige Anteil der Chimäre, auf weißem Hintergrund ist der zu EmRSKI zugehörige Anteil geschrieben. Die Transmembrandomäne ist durch eine Umrahmung hervorgehoben. Die GS-Domäne wird durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet. Die Mutationsstelle für die Produktion des BRIa-ka ist durch Fettdruck markiert. Die eingekreisten Aminosäuren sind die Nukleotidbindungsstelle. Doppelt unterstrichen ist der Loop L45.

- Chimäre: QEmRSK1-ka-SG

Bei dieser Chimäre wurden die ersten 169 N-terminalen Aminosäuren von EmRSK1-ka, die die extrazelluläre Region, die Transmembrandomäne und die ersten 54 intrazellulären Aminosäuren enthält, gegen die ersten N-terminalen 245 Aminosäuren von BRIa-ka (homologe Region) ausgetauscht. Diese Chimäre enthält also die GS-Domäne, die ATP-Bindungsstelle und die FKBP12 (Leucin-Prolin)-Bindungsstelle von BRIa.

4. Ergebnisse

```
MPQLYIYIRLLGAYLFIISRVRQGNLDSMLHGTGMKSDSDQKXSENGVTLAPEDTLPFLKCYCSGHCPDDAINNT
CITNGHCFAIIEEDDQGETTLASGCMKYEGSDFQCKDSPAQLRRTIECCRTNLCNQYLQPTLPPVVI GPFDFGS
IFWLVLLISMAVCI IAMIIFSSCFYKHYCKSISSRRRYNRDLEQDEAFIPVGESLKDLDQSQSSGSGSGLPLL
VORTIAKD IQMVRQVGGGSGYGEVWRAVCNGEVVAVKIFSSRDGASWTRETQIYTTALLSHPNILAYYASDMISRG
GCTQLWLVTAYHAAGSLHDFLSTAKGVTPQCGLKLARSIAAGLAFHSEVVGFHGKPPIAHRDIKSKNILVMANN
EACLADFGALVKT SKGMNGGTSDEANESGDALPPASLFAGTKRYMAPEILALYPLVWGGWVRARTQERQIDKK
QSGCEDDNLSIPGELLECRHPLLSFDVYVLDVYALGLVLWEIWRRTGKQYELPYDSDPNFLQMYRVVV
LGEPYDPCNTLVLDLPLMQVCHLCNHILVGRIGATLEAHRHRRHGGSGRRPSLTMERRGSSDEEWLVRWADVIA
.ECWHPRYTHRLSALRVRKTLTVIEATVS
```

Abbildung 39 - Aminosäuresequenz der Chimäre QEmRSK1-ka-SG. Grau hinterlegt ist der dem humanen BRIa ka zugehörige Anteil der Chimäre, auf weißem Hintergrund ist der zu EmRSKI zugehörige Anteil geschrieben. Die Transmembrandomäne ist durch eine Umrahmung hervorgehoben. Die GS-Domäne wird durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet. Die Mutationsstelle für die Produktion des BRIa-ka ist durch Fettdruck markiert. Die eingekringelten Aminosäuren sind die Nukleotidbindungsstelle. Doppelt unterstrichen ist der Loop L45.

- Chimäre: QEmRSK1-ka-FIA

Bei dieser Chimäre wurden die ersten 217 N-terminalen Aminosäuren von EmRSK1-ka (inklusive der extrazellulären Region, der Transmembrandomäne und den ersten 102 intrazellulären Aminosäuren) durch die ersten 293 Aminosäuren von BRIa-ka (homologe Region) ausgetauscht.

```
MPQLYIYIRLLGAYLFIISRVRQGNLDSMLHGTGMKSDSDQKXSENGVTLAPEDTLPFLKCYCSGHCPDDAINNT
CITNGHCFAIIEEDDQGETTLASGCMKYEGSDFQCKDSPAQLRRTIECCRTNLCNQYLQPTLPPVVI GPFDFGS
IFWLVLLISMAVCI IAMIIFSSCFYKHYCKSISSRRRYNRDLEQDEAFIPVGESLKDLDQSQSSGSGSGLPLL
VORTIAKD IQMVRQVGGGSGYGEVWRMGKWRGEKVAVKVFFTEEASWFRETEIYQTVLMRHENILGFIA.SDMISRG
GCTQLWLVTAYHAAGSLHDFLSTAKGVTPQCGLKLARSIAAGLAFHSEVVGFHGKPPIAHRDIKSKNILVMANN
EACLADFGALVKT SKGMNGGTSDEANESGDALPPASLFAGTKRYMAPEILALYPLVWGGWVRARTQERQIDKK
QSGCEDDNLSIPGELLECRHPLLSFDVYVLDVYALGLVLWEIWRRTGKQYELPYDSDPNFLQMYRVVV
LGEPYDPCNTLVLDLPLMQVCHLCNHILVGRIGATLEAHRHRRHGGSGRRPSLTMERRGSSDEEWLVRWADVIA
.ECWHPRYTHRLSALRVRKTLTVIEATVS
```

Abbildung 40 - Aminosäuresequenz der Chimäre QEmRSK1-ka-FIA. Grau hinterlegt ist der dem humanen BRIa ka zugehörige Anteil der Chimäre, auf weißem Hintergrund ist der zu EmRSKI zugehörige Anteil geschrieben. Die Transmembrandomäne ist durch eine Umrahmung hervorgehoben. Die GS-Domäne wird durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet. Die Mutationsstelle für die Produktion des BRIa-ka ist durch Fettdruck markiert. Die eingekringelten Aminosäuren sind die Nukleotidbindungsstelle. Doppelt unterstrichen ist der Loop L45.

Alle Chimären werden graphisch in der Abbildung 41 veranschaulicht.

4. Ergebnisse

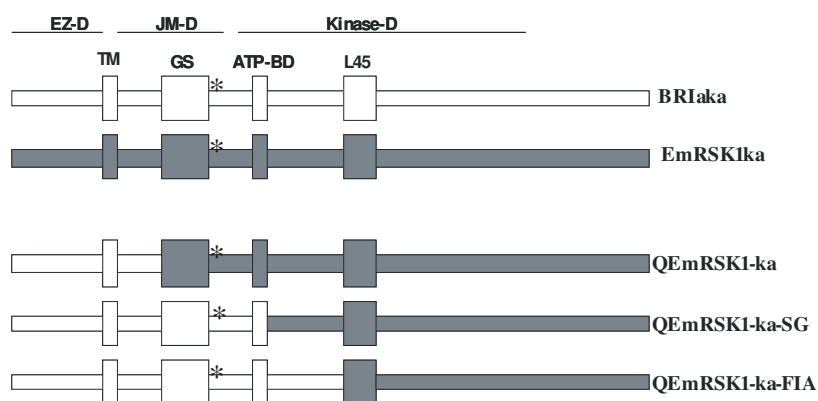


Abbildung 41 – Schematische Darstellung der konstruierten Rezeptorchimäre. Die Anteile des BRIa-Rezeptors sind in weiß dargestellt, die von EmRSK1 in grau. Die extrazelluläre (EZ-D), die Juxtamembran- (JM-D) und die Kinase-Domäne (Kinase-D) sind durch die oberste waagrechte Linien angezeigt; Die Boxen repräsentieren die Transmembrandomäne (T), die GS-Box (GS), die ATP-Bindungsdomäne (ATP-BD) und den Loop L45 (L45). Das Sternchen (*) markiert die Q-D-Mutation.

Alle Chimären wurden in pSecTag2/Hygro Vektoren für die Expression in Säugerzellen kloniert. Die fertige Konstrukte wurden sequenziert und nach Bestätigung der Sequenz in *E. coli* (Top10 Zellen von Qiagen) für die Plasmid Aufreinigung vorbereitet (verwendeten Primer: siehe 3.1.3, Konstruktionsstrategie siehe 3.2.2.14).

4.2.6.4.1 Untersuchung der Kinase Aktivität der Chimären QEmRSK1-ka und QEmRSK1-ka-SG (in Abwesenheit eines Typ II-Rezeptors).

Zuerst wurde untersucht, ob die Chimären, welche die Q-D Mutation enthalten, ohne Zugabe von weiteren Faktoren/Rezeptoren die *Echinococcus* Smads phosphorylieren können.

Hierzu wurden jeweils die Chimäre QEmRSK1-ka und QEmRSK1-ka-SG zusammen mit den *Echinococcus* Smads in HEK293-T Zellen co-exprimiert. Als Negativkontrolle wurden HEK293-T Zellen ohne Transfektion (1), als Positivkontrolle BRIa-ka/BRII/Smad1 (2) verwendet. Es konnte keine Phosphorylierung der EmSmads durch die Rezeptorchimären detektiert werden.

4. Ergebnisse

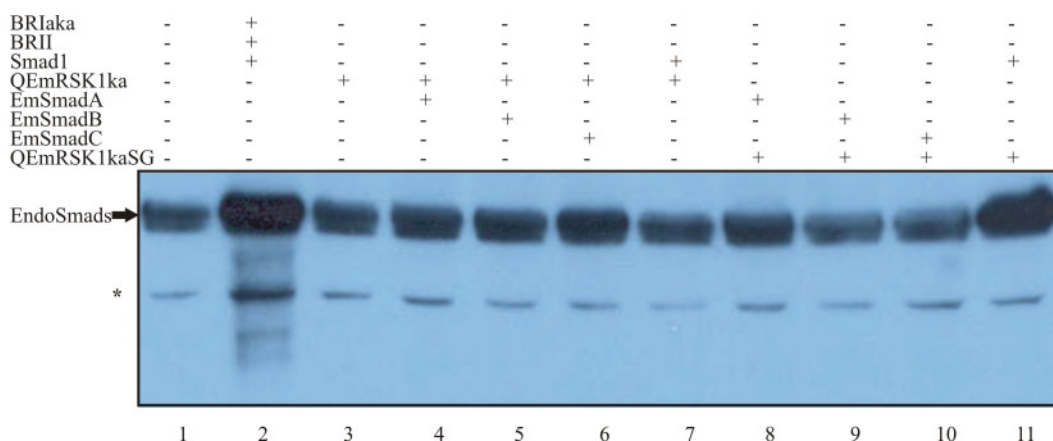


Abbildung 42 - Überprüfung der Kinaseaktivität der Chimären. (1) Mock (Negativkontrolle), (2) BRIIka/BRII/Smad1 (Positivkontrolle); (3-6) QEmRSK1-ka mit EmSmadA (3), EmSmadB (4), EmSmadC (5), oder Smad1(6); (7-11) QEmRSK1-ka-SG allein (7) oder mit EmSmadA (8), EmSmadB (9), EmSmadC (10), oder Smad1(11). Der Pfeil markiert die endogenen Smads; der Stern markiert eine unspezifische Bande. Verwendeter Antikörper: Anti-p-Smad1.

4.2.6.4.2 Untersuchung der Kinaseaktivität der Chimäre QEmRSK1-ka-SG in Anwesenheit eines Typ II-Rezeptors.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit eines Typ II-Rezeptors die Aktivierung der Kinase-Domäne ermöglichen könnte. Dabei wurden sowohl ein BRII- als auch ein TRII-Rezeptor eingesetzt.

QEmRSK1-ka-SG mit den BRII Rezeptor

Bei der Co-Expression von QEmRSK1-ka-SG mit BRII in HEK293-T zeigte sich eine Phosphorylierung von EmSmadB, nicht aber der anderen Smad-Proteine (Abbildung 43)

QEmRSK1-ka-SG mit den TRII Rezeptor

Bei Co-Expression von QEmRSK1-ka-SG mit TRII in HEK293-T wurde keine Phosphorylierung der EmSmads gefunden. (Abbildung 43).

In diesen Experimenten konnte also gezeigt werden, dass QEmRSK1-ka-SG spezifisch durch einen BRII Rezeptor aktiviert werden konnte, wohingegen keine Aktivierung durch eine TRII möglich war. Die Aktivierung von QEmRSK1-ka-SG führte ausschließlich zu einer Phosphorylierung von EmSmadB.

4. Ergebnisse

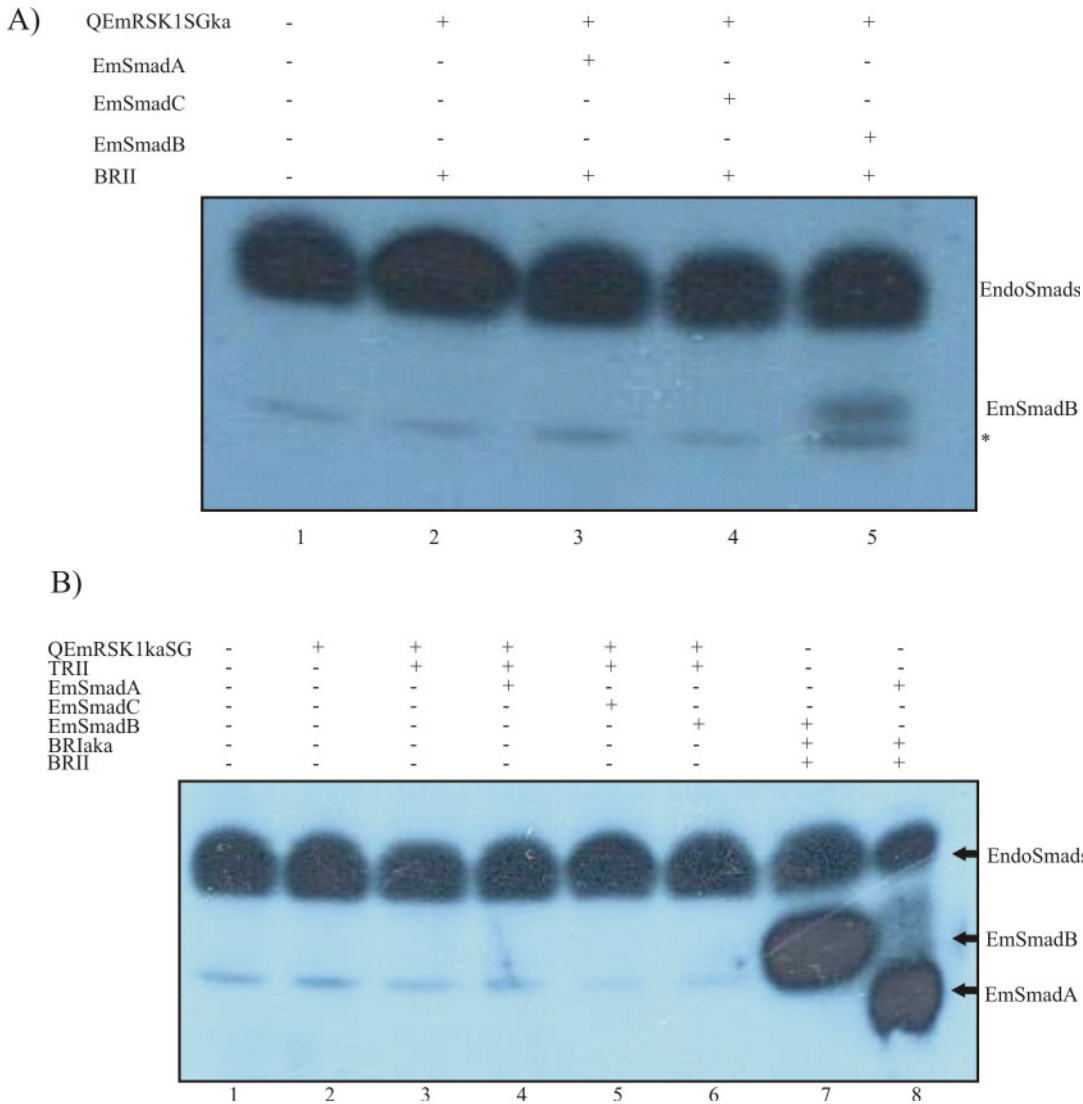


Abbildung 43 - Spezifische Aktivierung von QEmRSK1-ka-SG durch BRII. A) eine positive Interaktion QEmRSK1-ka-SG/BRII konnte gezeigt werden. (1) Mock; (2) QEmRSK1-ka-SG/BRII; (3)QEmRSK1-ka-SG/BRII mit EmSmadA, (4) EmSmadC oder mit EmSmadB (5). B) QEmRSK1-ka-SG kann nicht von TRII aktiviert werden. (1) Mock, (2) QEmRSK1-ka-SG; (3) QEmRSK1-ka-SG/TRII; (4) QEmRSK1-ka-SG/TRII/EmSmadA; (5) QEmRSK1-ka-SG/TRII/EmSmadC; (6) QEmRSK1-ka-SG/TRII/EmSmadB. Die Pfeile zeigen die Kontrolle des phosphorylierte EmSmadB (7) und des phosphorylierten EmSmadA (8).

Die Phosphorylierung von EmSmadB durch die Chimäre QEmRSK1-ka-SG war zwar stärker als die durch EmRSK1 hervorgerufene Phosphorylierung, jedoch immer noch schwächer ausgeprägt als die durch den humanen BMP Rezeptorkomplex hervorgerufene Phosphorylierung.

4.2.6.4.3 QEmRSK1-ka-FIA mit dem BR II-Rezeptor

Um den genauen Aktivierungsmechanismus der Kinaseaktivität von EmRSK1 zu untersuchen, wurde das Phosphorylierungsvermögen der Chimäre QEmRSK1-ka-FIA (in Co-Expression mit dem BRII-Rezeptor) untersucht. QEmRSK1-ka-FIA ist die Chimäre, welche von den vier konstruierten Chimären den kürzesten Anteil an EmRSK1 trägt. Die extrazelluläre Domäne, die Transmembrandomäne und die ATP-Bindungsstelle stammen bei dieser Chimäre von dem humanen BR1a-ka-Rezeptor. Auch bei QEmRSK1-ka-FIA konnte in Co-Expression mit dem BR II-Rezeptor eine Phosphorylierung von EmSmadB beobachtet werden, welche jedoch keinen großen Unterschied in ihrer Ausprägung zu der durch QEmRSK1-ka-SG produzierten Phosphorylierung zeigte.

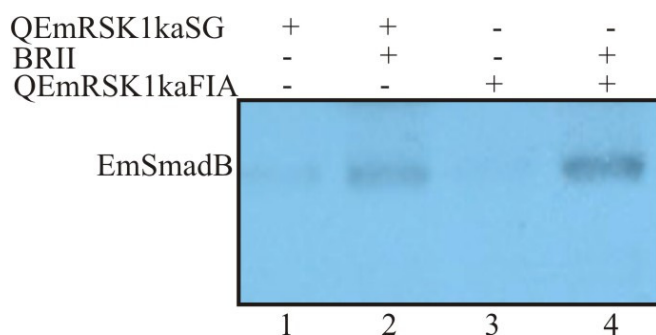


Abbildung 44. Aktivität der Chimäre QEmRSK1-FIA. Als positive Kontrolle wurde QEmTR1kaSG ohne- oder mit BRII (1, 2) benutzt. QEmRSK1-FIA ohne- oder mit BRII (3, 4). Die Phosphorylierung von EmSmadB wurde mit einem anti-phospho-Smad1 Antikörper nachgewiesen.

4.2.6.4.4 Die Kinase-Domäne in der Chimäre QEmRSK1-ka-SG phosphoryliert EmSmadB

Um sicher zu gehen, dass die bei der QEmRSK1-ka-SG-Chimäre beobachteten Phosphorylierung des EmSmadB tatsächlich durch die *Echinococcus*- Kinase hervorgerufen wurde und nicht durch den BRIa-ka-Teil, wurden zwei Konstrukte hergestellt: bei dem ersten wurden die ersten 215 N-terminalen Aminosäuren von BRIa (Primer kz1Dw 5'-AAGCTTACAATTGAACAATGAC-3' und kz1Up 5'-CTCGAGTTTGTGACTGGTCAATAAGG-3') in den pSecTag2/Hygro-Vektor eingebracht (BRIakz1: M₁-S₂₁₅), bei dem zweiten Konstrukt wurden die ersten 245 N-terminalen Aminosäuren von BRIa-ka (Primer kz1Dw 5'-AAGCTTACAATTGAACAATGAC-3' und kz2Up 5'-CTCGAGATACTTCTCCATATCGGC-3') in den pSecTag2/Hygro-Vektor kloniert (BRIakz2: M₁-Y₂₄₅). Diese Konstrukte sind im Vergleich zum gesamten BRIa in Abbildung 45 dargestellt.

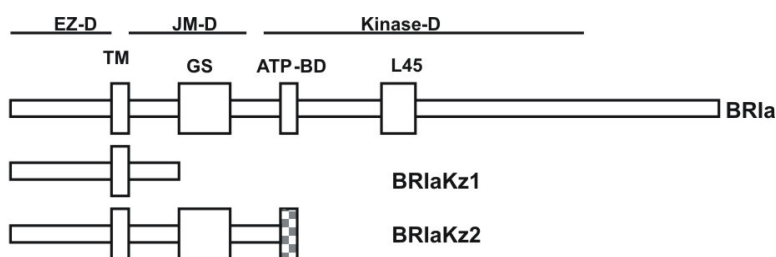


Abbildung 45 - Konstruktion von BRIakz1 und BRIakz2. EZ-D: extrazelluläre Domäne; JM-D: Juxtamembran-Domäne; Kinase-D: Kinase-Domäne; T: Transmembrandomäne; GS: GS-Box; L45: Loop-L45.

BRIakz1 oder BRIakz2 wurde zusammen mit dem BRII Rezeptor und EmSmadB unter Zugabe von BMP2 in HEK 293 Zellen exprimiert. Parallel wurde das Phosphorylierungsvermögen der Chimäre QEmRSK1-ka-SG mit und ohne Zugabe von BMP2 überprüft. Als Positiv-Kontrolle wurde der Komplex BRIa-ka/BRII verwendet. Die Ergebnisse des Experimentes sind in Abbildung 46 dargestellt. Es zeigt sich, dass die neuen Konstrukte BRIakz1 (Spur 3) oder BRIakz2 (Spur 4) trotz Anwesenheit des BRII-Rezeptors und des BMP2-Liganden keine Phosphorylierung hervorrufen können. Die Chimäre QEmRSK1-ka-SG führte in Co-Expression mit und ohne Zugabe des BMP2-Liganden zu einer Phosphorylierung von EmSmadB (Spur 1 und 2). Spur 5 zeigt die Positivkontrolle.

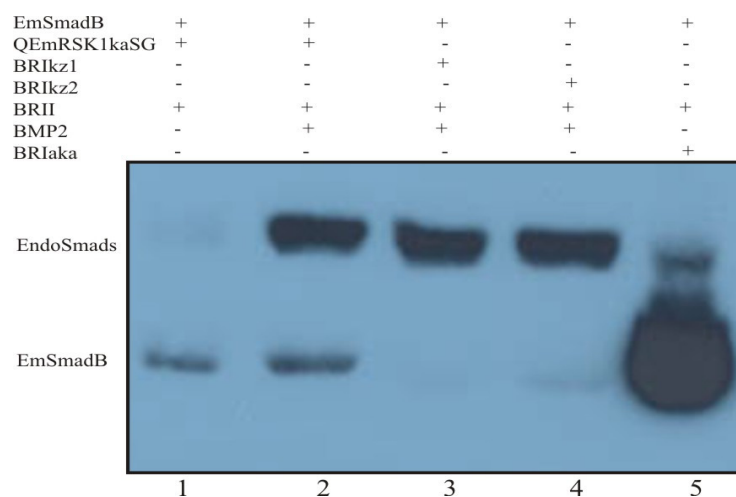


Abbildung 46 - Bestätigung der Em-Kinase Aktivität. QEmRSK1-ka-SG/BRII phosphoryliert EmSmadB in Abwesenheit (Spur 1) und Anwesenheit von BMP2 (Spur 2). Trotz BRII-Anwesenheit und BMP2- Zugabe konnten BRIakz1 (Spur 3) und BRIakz2 (Spur 4) nicht EmSmadB phosphorylieren. BRIa-ka/BRII-Positivkontrolle (Spur5).

4.2.6.4.5 Zusammenfassung der Chimärenexperimente

Im Versuch mit QEmRSK1-ka konnte keine Phosphorylierung von EmSmadB nachgewiesen werden, wohingegen bei QEmRSK1-ka-SG und QEmRSK1-ka-FIA eine Phosphorylierung resultierte. Daraus lässt sich schließen, dass die ersten 215 N-terminalen Aminosäuren von BRIa (welche den extrazellulären Teil, die Transmembranregion und die ersten 39 Aminosäuren (K₁₇₇-S₂₁₅) der Juxtamembranregion vom BRIa umfassen) keine entscheidende Bedeutung für die Aktivierung der Kinase-Domäne des Rezeptors haben oder, alternativ, diese Region nicht ausreicht, um die negative Wirkung der Q-D Mutation im Abschnitt des EmRSK1-ka aufzuheben.

Im Experiment mit QEmRSK1-ka-SG hingegen konnte eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. QEmRSK1-ka-SG unterscheidet sich von QEmRSK1-ka dadurch, dass hier nicht nur ein Teil, sondern die gesamte Juxtamembranregion inklusive GS-Box durch den BRIa-Rezeptor-Anteil gebildet wird. Es lässt sich daraus ableiten, dass also der Bereich der Juxtamembranregion wichtig für die Kinaseaktivität der EmRSK1-Kinase-Domäne ist.

Die bei QEmRSK1-ka-FIA beobachtete Phosphorylierung war nicht stärker als bei QEmRSK1-ka-SG. QEmRSK1-ka-FIA unterscheidet sich von QEmRSK1-ka-SG dadurch, dass der BRIa-Rezeptor-Anteil um 48 Aminosäuren aus dem Bereich der N-terminalen Kinase-Region länger ist. Es lässt sich daraus schließen, dass dieser Abschnitt von 48 Aminosäuren keine größere Bedeutung für die Aktivierung der Kinase-Domäne der Chimäre hat. Der für die Aktivierung der Kinase-Domäne wichtige Abschnitt liegt also zwischen den Aminosäuren S₂₁₆-Y₂₄₅ im BRIa-Rezeptor. Dieser Bereich kann also den negativen Effekt der Q-D-Mutation im EmRSK1ka-Rezeptor aufheben. Weil der EmRSK1ka-Rezeptor in seiner reinen Form (nicht als Chimäre) trotz Aufweisen einer Juxtamembran-Region keine Kinase-Aktivierung zeigte, kann man daraus schlussfolgern, dass nur spezielle, kompatible Sequenzen der Juxtamembranregion die positive Aktivierung ausüben können.

4.2.7 Untersuchung einzelner Mutationen auf die Kinase-Aktivität des EmRSK1ka Rezeptors.

In einem Sequenzvergleich der zu der S₂₁₆-Y₂₄₅-Region von BRIa homologen Regionen von EmRSK1 und anderen Säuger Typ I-Rezeptoren, zeigte, dass bei den EmRSK1-Rezeptor die Immunophilin FKBP12 Bindungsstelle fehlte, ein Leucin-Prolin Motiv (L₁₉₃ und P₁₉₄ im TRI Rezeptor), welches normalerweise nach der GS Box aller Säuger Typ I-Rezeptoren vorhanden ist.

4. Ergebnisse

Dessen Hauptfunktion liegt in der Vermeidung einer Aktivierung des TGF β Typ I-Rezeptors durch den Typ II-Rezeptor in Abwesenheit eines Liganden (Charng et al., 1996; Chen et al., 1997). In einer kristallographischen Strukturanalyse des intrazellulären Komplexes des TGF β Typ I-Rezeptors zeigte sich eine direkte Bindung der FKBP12 an die Aminosäure L₁₉₅ und L₁₉₆ des Rezeptors. Die benachbarten Aminosäuren L₁₉₃ und P₁₉₄ zeigten keine direkte Interaktion mit FKBP12, scheinen aber wichtig für die Interfacebeständigkeit zu sein (Huse et al., 1999).

Um nun das Zusammenspiel von dem Aminosäuren-Abschnitt S₂₁₆-Y₂₄₅ und der Q-D-Mutation auf molekularer Ebene näher zu beleuchten, wurde bei verschiedenen Einzelmutationen im Bereich des Aminosäuren-Abschnitt S₂₁₆-Y₂₄₅ untersucht, wie sie jeweils die positive Aktivierung durch die Q-D-Mutation beeinflussen.

Mutation K₁₄₆L in der GS-Box von EmRSK1-ka (EmRSK1LP-ka).

Dabei sollte untersucht werden, welche Rolle das LP Motiv für die Aktivierung des EmRSK1ka haben kann. Über Mutagenese (siehe Kapitel 3.2.2.13) sollte also das fehlende LP-Motiv im Echinokokken-Rezeptor nachgeahmt werden. Dazu wurde K₁₄₆ im EmRSK1-ka Rezeptor durch L ausgetauscht, der resultierende Rezeptor wurde EmRSK1LP-ka genannt.

Mutation K₁₄₆L und F₁₄₈L in der GS-Box von EmRSK1-ka (EmRSK1LPLL-ka).

Da aber kristallographisch gezeigt werden konnte (s.o.), dass im humanen TRI-Rezeptor eigentlich die Aminosäuren L₁₉₅ und L₁₉₆ direkte Kontaktstelle für FKBP12 sind, wurde in EmRSK1LP-ka noch eine weitere Mutation eingefügt: F₁₄₈ wurde durch L ausgetauscht.

Abbildung 47 stellt zur Veranschaulichung das humane LP-Motiv der homologen *Echinococcus*-Sequenz und nach Einfügen der einen bzw. beider Mutationen gegenüber.

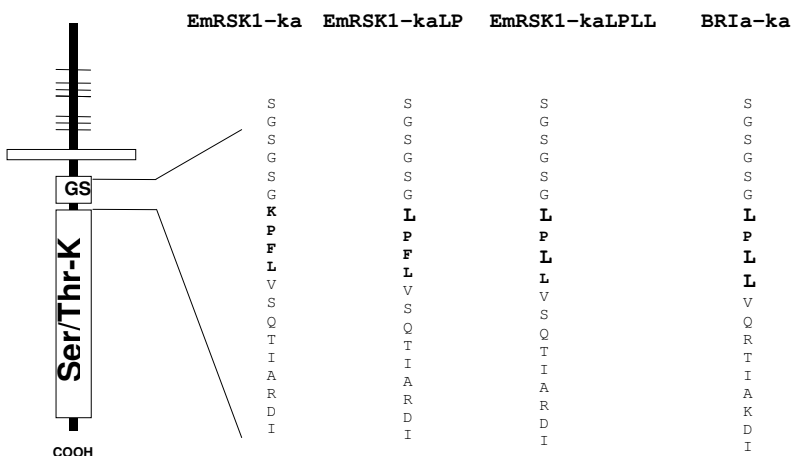


Abbildung 47 – Gegenüberstellung von humanem LP-Motiv zur homologen *Echinococcus*-Sequenz. EmRSK1LP-ka und EmRSK1LPLL-ka

4. Ergebnisse

Nun wurden EmRSK1LP-ka und EmRSK1LPLL-ka in HEK293-T Zellen ohne oder zusammen mit dem BRII Rezeptor co-exprimiert. Als Indikator der Rezeptoraktivität wurde die Phosphorylierung von EmSmadB benützt. Als Kontrolle wurde der EmRSK1 Wild-Typ/BRII-Komplex unter externer Zugabe von BMP2 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 veranschaulicht. Es zeigte sich, dass die mutante Rezeptorform EmRSK1LP-ka auch nach Zugabe von BRII und BMP2 keine Phosphorylierungsaktivität hatte (Spuren 4-5). Die Mutante EmRSK1LPLL-ka hingegen zeigte bei Anwesenheit des BRII-Rezeptors Phosphorylierungsaktivität, die unabhängig von der Ligandenzugabe durch BMP2 war (Spuren 8 und 9). Ohne BRII-Rezeptor fand sich keine Phosphorylierung (Spur 6 und 7). In der Positivkontrolle des wildtypischen EmRSK1 in Co-Expression mit dem BRII –Rezeptor zeigte sich die entsprechende Bande, die nur nach der Liganden-Zugabe zu finden war (Spur 1 und s.o.). Es konnte als eine EmSmadB-Phosphorylierung durch den Rezeptorkomplex EmRSK1LPLL ka/BRII festgestellt werden. Das LPLL Motiv hat also in Zusammenspiel mit der Q-D- Mutation eine positive Wirkung auf die Aktivierung von EmRSK1.

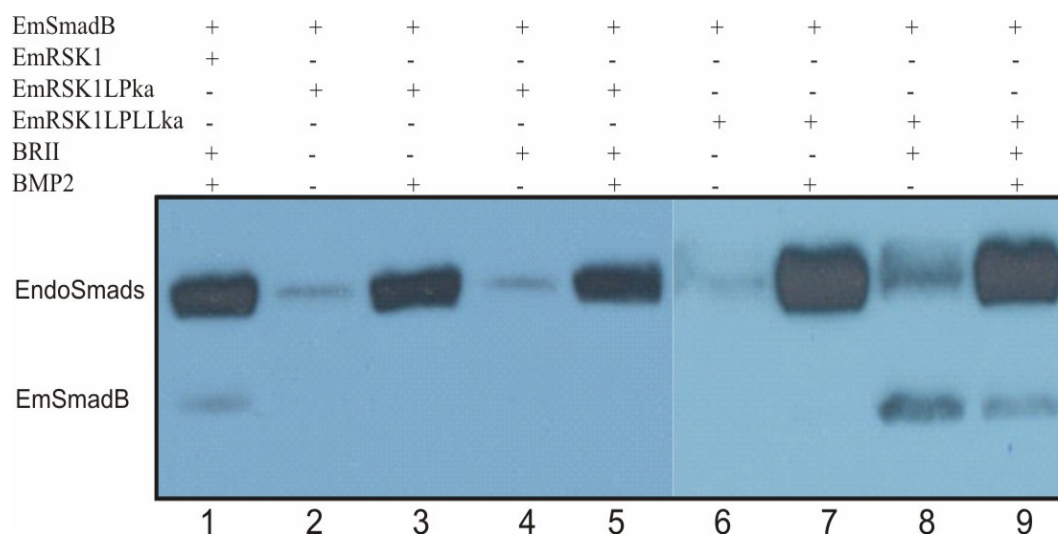


Abbildung 48 – Untersuchung der Phosphorylierungsaktivität von EmRSK1LP-ka und EmRSK1LPLL-ka. Als Kontrolle: EmSmadB/EmRSK1/BRII + BMP2 (Spur 1); Spuren 2, 3: EmSmadB/EmRSK1-ka-LP -/+ BMP2; Spuren 4, 5: EmSmadB/EmRSK1-ka-LP/BRII -/+ BMP2; Spuren 6, 7: EmSmadB/EmRSK1-ka-LPLL -/+ BMP2; Spuren 8, 9: EmSmadB/EmRSK1-ka-LPLL/BRII -/+ BMP2.

4.2.8 Untersuchung der Funktion des Leucin-Zipper-Motivs in EmRSK1 (EmRSK1ØLZ-ka).

Leucin-Zipper sind durch mindestens vier Leucin-Resten charakterisiert, zwischen denen jeweils sechs unterschiedliche, nicht spezifische Aminosäuren liegen. Leucin-Zipper sind an Protein-Protein-Interaktion beteiligt (Landschulz et al., 1988), wobei auch Isoleucin in der Anordnung Leucin funktionell ersetzen kann (Leung & Lassam 1998).

Der EmRSK1 Rezeptor weist viele für die Ser/Thr-Kinase-Rezeptoren charakteristische Merkmale auf. Eine Eigenart, die bislang in keinem anderen bekannten Typ I-Rezeptor der TGFβ-Superfamilie gefunden wurde, ist das Vorhandensein eines putativen Leucin-Zippers bei den Aminosäuren L₃₉₀-L₃₉₇-L₄₀₄-L₄₁₁-L₄₁₈ in der Intrazellulärregion. Interessanterweise wurde auch in zwei weiteren Ser/Thr Kinasen, die in dieser Arbeit in *Echinococcus multilocularis* identifiziert wurden, ein putativer Leucin-Zipper entdeckt. Es handelt sich hierbei um den Rezeptor EmRSK2 (einem dem TGFβ Typ I homologen Rezeptor) und um EmTAK1 (einer cytoplasmatischen TGFβ aktivierten Kinase). Diese Leucin-Zipper befanden sich dabei nicht in einer Coiled-Coil-Region, wie es sonst typisch für Leucin-Zipper ist (Landschulz et al., 1988).

Es stellte sich die Frage, ob der putative Leucinzipper ein Grund für die Inhibierung der Kinase-Aktivität in EmRSK1-ka ist. Da Leucin-Zipper eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielen, wurde als Hypothese aufgestellt, dass Leucin-Zipper mit der Juxtamembran Region interagieren könnten und damit deren aktivierenden Einfluss auf die Kinase-Domäne unterbinden könnten. Dann könnte eine Deletion des Leucin-Zippers zur Aktivierung der Kinase-Domäne führen.

4.2.8.1. Herstellung eines EmRSK1ka mit C-terminaler Deletion

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden über eine PCR nur die 383 N-terminalen Aminosäuren (M₁-N₃₈₃) des EmRSK1-ka amplifiziert. Die weiter downstream folgenden 169 Aminosäuren (L₁₆₉-S₅₅₂), welche den putativen LZ umfassen, wurden bewusst nicht mit amplifiziert, um somit eine Leucin-Zipper-freies Fragment zu gewinnen. Dieses wurde nach Verdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI in den pSecTag2/Hygro Vektor für die Expression in Säugerzellen kloniert (Dw Primer 5'-CCTGTAAGCTTAATGAAAAACATACCA-3' und UpPrimer 5'-CTCGAGAATTGTCTTCATCACTCC-3'). Durch eine Sequenzierreaktion wurde

die Richtigkeit der Sequenz bestätigt. Das so hergestellte Konstrukt wurde mit EmRSK1ØLZ-ka bezeichnet.

Im nächsten Schritt wurde EmRSK1ØLZ-ka gemeinsam mit dem BRII-Rezeptor in HEK293-T Zellen mit und ohne Zugabe von BMP2 co-exprimiert. Dabei konnte schon ohne Zugabe von BMP2 eine diskrete aber doch deutliche Bande von phosphoryliertem EmSmadB nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich nach Zugabe des humanen BMP2 eine deutliche Steigerung der EmSmadB-Phosphorylierung. Dieses Ergebnis unterstützte die Hypothese eines möglichen inhibierenden Effektes der 169 C-terminalen Aminosäuren, welche den LZ beinhalten, in EmRSK1ka.

Abbildung 49 zeigt die oben beschriebenen Ergebnisse.

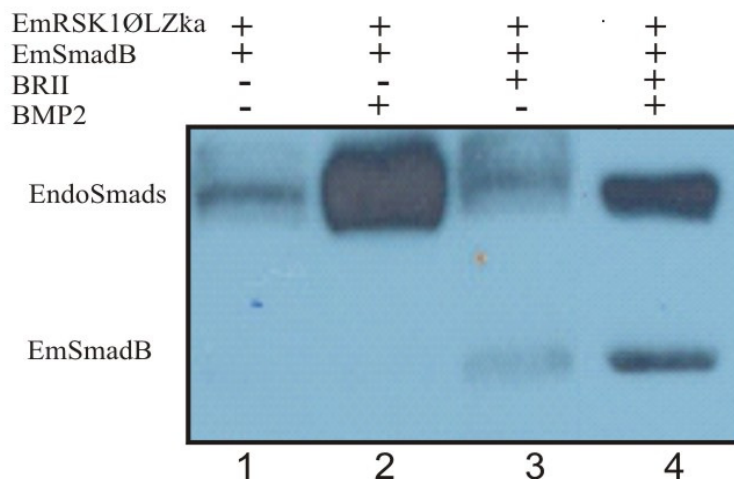


Abbildung 49 – Co-Expression von EmRSK1ØLZ-ka mit BRII und +/-BMP2. Es wurde der Einfluß des C-Terminus auf die Kinaseaktivität von EmRSK1ka in HEK293 Zellen untersucht. EmRSK1ØLZ-ka/EmSmadB ohne- (1) oder mit BMP2 (2); EmRSK1ØLZ-ka/BRII/EmSmadB ohne- (3) oder mit BMP2 (4); die endogenen Smads sind als „endoSmads“ bezeichnet.

4.2.9. Veränderung des LP Motivs im humanen BRIIka beeinflusst die Kinase-Aktivität.

Im nächsten Schritt sollte im Umkehrschluss überprüft werden, ob eine Mutation im LPLL-Motiv des humanen BRII-ka-Rezeptors zu einer Inaktivierung des Phosphorylierungs-vermögens der Kinase-Domäne führen würde.

4.2.9.1. Mutation L₂₂₂-K des Motivs L₂₂₂PLL im humanen BRIa_{ka} (BRIa_{KP}).

Hier wurde das LPLL-Motiv im BRIa-ka Rezeptor mutiert. L₂₂₂ wurde durch K ersetzt, so dass eine ähnliche Sequenz wie in der homologen Region des EmRSK1 Rezeptors resultierte. Dieser mutierte Rezeptor wurde BRIa_{KP} genannt. Die Mutagenese wurde dabei wie in 3.2.2.13 beschrieben vorgenommen.

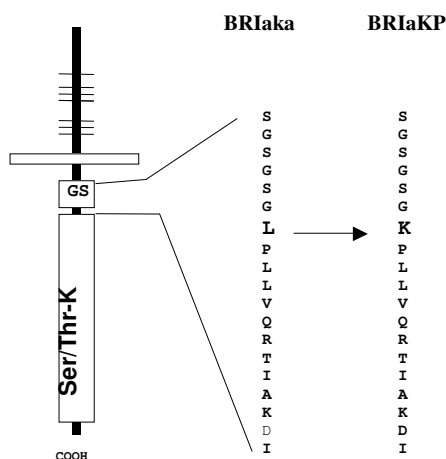


Abbildung 50 Konstruktion des BRIa_{KP} durch L-K Mutation von BRIa-ka. Leucin 222 in der GS-Box des humanen BRIa_{ka} wurde durch Prolin ersetzt. Dazu wurde das Stratagen Mutagenese-Kit verwendet. Der mutierte Rezeptor wurde in pSecTag2/Hygro-Vektor für die Expression in Säugerzellen kloniert.

Im nächsten Schritt wurde BRIa_{KP} zusammen mit BRII in HEK 293 Zellen exprimiert. Als Indikator der Kinaseaktivität wurde die Phosphorylierung von Smad1 und/oder EmSmadB verwendet.

Smad1 konnte trotz der L-K Mutation durch den Rezeptor BRIa_{KP} weiterhin phosphoryliert werden, hier hatte also das veränderte LP-Motiv im BRI-Rezeptor keine Inaktivierung der Kinase zur Folge. EmSmadB hingegen konnte nicht mehr phosphoryliert werden. Dieses Ergebnis war überraschend, zeigte sich hier doch, dass die Phosphorylierungsaktivität der Kinase-Domäne je nach Phosphorylierungssubstrat variiert. Dieser Unterschied könnte darin beruhen, dass die beiden Smads jeweils unterschiedlicher Bedingungen für die Phosphorylierungsreaktion bedürfen.

4. Ergebnisse

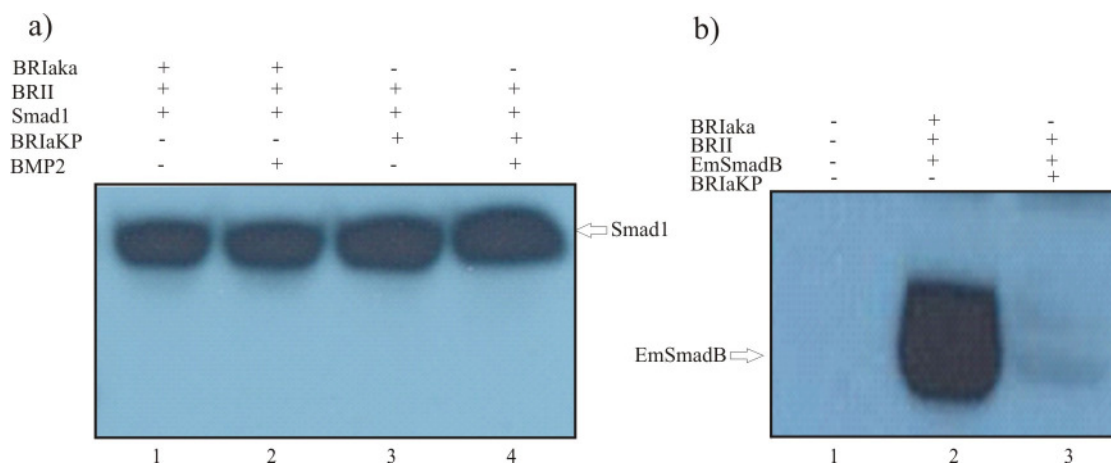


Abbildung 51 –Effekt der LK-Mutation in BRIaKP auf Smad1 und EmSmadB. a) BRIaKa/BRII/Smad1 ohne- (1) mit BMP2 (2); BRIaKP/BRII/Smad1 ohne- (3) mit BMP2 (4); b) Mock (1), BRIaKa/BRII/EmSmadB (2); BRIaKP/BRII/EmSmadB (3).

4.2.10. QEmRSK1SG-ka aktiviert den BMP-Signaltransduktionsweg in C2C12 Zellen

Die Aktivierung der Kinasefähigkeit in EmRSK1 durch humanes BMP2 und BRII, konnte durch eine spezifische Phosphorylierung von EmSmadB nachgewiesen werden (siehe 4.1.11). Im Vergleich zu der unter denselben Bedingungen stattfindenden Phosphorylierung von EmSmadB durch den humanen BRIa-Rezeptor war diese jedoch nur sehr schwach ausgeprägt. Weil die Funktion der Smad-Proteine als Transkriptionsfaktoren von ihrer Phosphorylierung abhängig ist, stellte sich deshalb die Frage, ob die Kinaseaktivität des Parasitenrezeptors EmRSK1 auf EmSmadB ausreichte, um ein Transkriptionsantwort hervorzurufen.

4.2.10.1. Die Expression von QEmRSK1SG-ka induziert das Reportergen in einem Luciferase Assay

Um diese Frage zu beantworten, wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) verwendet. Reportergen-Assays sind ein wertvolles Werkzeug für die Untersuchung von Signalen, die das Transkriptionsgeschehen einer Zelle modulieren, wie z.B. die Rezeptor-Signale, die nach TGF β /BMP Stimulation mittels Signaltransduktoren wie den Smad-Pproteinen bis zum Zellkern weitergeleitet werden.

Für entsprechende Versuche wurde das BMP-sensitive Plasmid pSBE (Jonk et al, 1998), das die *Photinus pyralis*-Luciferase unter dem Smad Binding Element Promotor trägt, als Reporterplasmid eingesetzt. Als Referenzplasmid wurde pRL-TK (Promega), das für die Renilla-Luciferase kodiert,

co-transfiziert, so dass im gleichen Reaktionsansatz sowohl die Transfektionseffizienz als auch das Signal des Reportergens gemessen werden können. Die Transfektionseffizienz für die Reportergen-Assays hat eine entscheidende Bedeutung, deshalb wurde für diese Untersuchung Lipofectamine™ (Invitrogen) als Transfektionsreagenz verwendet. Eine alleinige Transfektion der Chimäre QEmRSK1SG-ka konnte ebenso wenig wie eine alleinige Transfektion der wildtypischen Form oder der konstitutiv aktiven Form vom BRIa-Rezeptor eine Transkriptionsantwort auslösen. Auch nach Zugabe von BMP2 zeigte sich so keine Transkriptionsantwort. Nur unter Zugabe des BRII-Rezeptors konnte bei allen drei untersuchten Rezeptortypen eine Transkriptionsantwort detektiert werden. Schon in den vorangegangenen Experimenten war die Notwendigkeit der Anwesenheit eines Typ II-Rezeptors für die Phosphorylierungsfähigkeit der konstitutiv aktiven Form des *Echinococcus*-Typ I-Rezeptors dargelegt worden. Es ist bekannt, dass der Typ II-Rezeptor den Typ I-Rezeptor durch eine Phosphorylierung aktiviert. Nun sollte der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss es auf die Transkription haben würde, wenn man einen BRII Rezeptor, bei dem die Kinaseaktivität aufgehoben ist, verwenden würde.

Bei Expression vom BRII-LF-KR Rezeptor, der keine Kinase-Aktivität mehr aufwies (Wieser et al., 1995; Attisano et al., 1996; Willis et al., 1996), ohne Anwesenheit eines Typ I-Rezeptors konnte auch nach Zugabe von BMP2 keine Transkriptionsaktivität gemessen werden. Wurde hingegen die nicht mutierte Version des BRII-Rezeptors unter den gleichen Bedingungen exprimiert, konnte eine Transkriptionsantwort (um Faktor 5, s.u. Tabelle) ausgelöst werden. Diese Beobachtung belegt, dass die Mutation im BRII-LF-KR tatsächlich die Kinaseaktivität des Rezeptors aufhob.

Interessanterweise konnte die Co-Expression von BRII-LF-KR zusammen mit wildtypischen BRIa eine leichte Transkriptionsaktivierung auf das Reportergergen (ca. Faktor 0,9) auslösen. Bei Co-Expression von BRII-LF-KR mit der konstitutiv aktiven Form BRIa-ka konnte eine höhere Transkriptionsaktivität (ca. Faktor 1,3) gemessen werden. Wurde BRII-LF-KR zusammen mit QEmRSK1SG co-exprimiert, resultierte daraus eine ungefähr doppelt so hohe Transkriptionsaktivität des Reportergens (ca. Faktor 2,7).

Unter Verwendung eines BRII Rezeptors mit wildtypischer Kinasedomäne in Co-Expression mit den verschiedenen Typ I-Rezeptoren lag die Transkriptionsaktivität wesentlich höher: in Co-Expression mit BRIwt konnte ca. der Faktor 5 gemessen werden, mit BRIa-ka ca. der Faktor 6,5 und mit QEmRSK1SG der Faktor von ca. 7. Die Addition vom BMP2 führte zu keiner wesentlichen Erhöhung der Transkriptionsantwort bei Co-Expression des BRII mit BRIa oder QEmRSK1SG, wohingegen bei Co-Expression mit dem wild Typ BRIawt nach Zugabe von BMP2 immerhin eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität vom Faktor 5,8 auf den Faktor 6,8 beobachtet wurde.

Die Reportergergen Analyse zeigt, dass die Chimäre QEmRSK1SG-ka nicht nur, wie in vorangegangenen Experimenten demonstriert, EmSmadB phosphorylieren kann, sondern auch, dass

4. Ergebnisse

diese Chimäre bei Anwesenheit eines BRII-Rezeptors das Säuger-Signalübertragungssystem komplementieren kann. Denn es konnte gezeigt werden, dass die *Echinococcus* Kinase-Domäne (trotz der sich nur gering darstellenden Phosphorylierung von EmSmadB in vorangegangenen Experimenten) eine Transkriptionsantwort auslösen kann. Diese Aktivität war ähnlich oder sogar höher als die unter Verwendung des BRIa-ka-Rezeptors gemessene Aktivität. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit eines TypII-Rezeptors auch für die konstitutiv aktiven Typ I Rezeptoren zur Auslösung einer Transkriptionsantwort führt. Es konnte auch demonstriert werden, dass ein durch eine Mutation in seiner Kinase-Domäne inaktivierter BMP Typ II-Rezeptor zu einer deutlich geringeren Transkriptionsantwort des Rezeptor I/Rezeptor II-Komplexes führte, diese aber nicht komplett verhindern konnte.

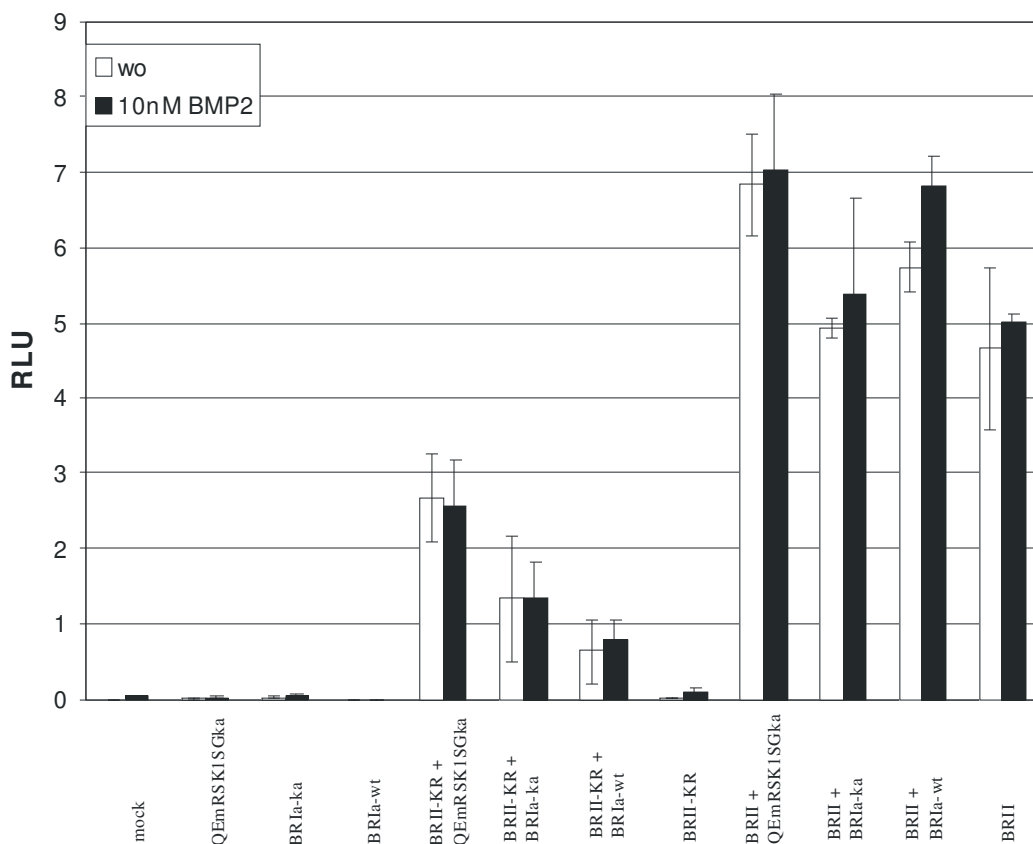


Abbildung 52 Transkriptionseffekt der unterschiedlichen Rezeptor-Komplexe. Die Rezeptorkonstrukte wurden in C2C12 Zellen zusammen mit dem SBE-Lux Reporter exprimiert, die Luciferaseaktivität wurde mit (schwarze Balken) oder ohne (weiße Balken) Zugabe von BMP2 gemessen. Es konnte die Notwendigkeit der BMP Typ II-Rezeptor Kinaseaktivität dargelegt werden. Mock: nicht transfizierte Zellen, Negativkontrolle; QEmRSK1SG: Chimäre mit einer *Echinococcus* Kinasedomäne in konstitutiv aktiver Form; BRIa-ka: konstitutiv aktive Form des BMP Typ I-Rezeptors; BRIa-wt: wild type Form des BMP Typ I-Rezeptors; BRII-KR: BMP Typ II-Rezeptor ohne Kinasefähigkeit; BRII: BMP Typ II-Rezeptor mit erhaltener Kinasefunktion. Wo = without /ohne, RLU= relative Luciferase units

4.3 Klonierung und Charakterisierung von EmBMP, einem BMP-kodierenden Faktor aus *E. multilocularis*

BMPs gehören zur TGF β Zytokin-Superfamilie und zählen mehr als 30 Mitglieder. Der Name dieser Wachstumsfaktoren bezieht sich auf ihre besondere Funktion bei Vertebraten, die Knochen- und Knorpelbildung zu beeinflussen. Darüber hinaus spielen die BMPs noch verschiedene weitere Rolle in der Zellentwicklung, -wachstum, -differenzierung und Apoptose (Celeste et al., 1990; Cunningham et al., 1995; Dunn et al., 1997; Padgett et al., 1987; Reddi, 1995; Storm et al., 1994, 1996; Urist., 1965; Winnier et al., 1995; Zhang et al., 1996).

BMPs sind Homodimere mit einem Molekulargewicht von ca. 30-38 kDa. Sie werden als Präpropeptide mit einer Länge von ungefähr 400-525 Aminosäure synthetisiert. Vor der Sekretion wird ein längenvariables Pro-Segment abgeschnitten (Roberts et al., 1988; Massague et al., 1990; Wozney, 1989).

Auf der Suche nach Zytokinen der TGF β Superfamilie, die sowohl eine Rolle bei Wachstum und Entwicklung von *E. multilocularis* spielen könnten, als auch an der Wirt-Parasit Interaktion teilnehmen könnten, wurde in dieser Arbeit sowohl die cDNA des *embmp* Genes von *E. multilocularis* als auch der komplette chromosomale Locus identifiziert und charakterisiert.

4.3.1. Klonierung und Charakterisierung der *embmp*-Spleiß-Varianten

Aus der cDNA-Bibliothek EST von *Echinococcus granulosus* konnte eine Sequenz identifiziert werden (BF643002), die eine hohe Homologie zu der cDNA von dem bone morphogenetic protein 2/4 aufweist (Fernandez & Maizels, 2000). In Analogie zu dieser Sequenz wurden die Primer BMPDw1 (5'-GTAAACCAATCGGTGAAAA-3') und BMPup (5'-ATCTTGATTTTAGGGTCAATA-3') konstruiert. Mittels PCR konnte ein Fragment von 459 bp aus der *E. multilocularis* cDNA amplifiziert werden. Das Fragment entsprach dem C-Terminus des *embmp* Genes inklusive des Stopkodons. Die Amplifizierung des *embmp* 5' Endes war mittels PCR mit dem Vektor-Primer PJG4-5PR (5'-GATGCCTCCTACCCTTATGATG-3') und dem Insert-Primer BMPup2 (5'-GAGATATCGCGAATTGCGC-3') aus einer cDNA-Bibliothek von *E. multilocularis* erfolgreich.

4. Ergebnisse

Die cDNA von *embmp* besteht aus 1221 bp (ohne Poly A Schwanz). Der C-Terminus der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigt hohe Homologie zu den bone morphogenetic protein (BMP) Faktoren (BLAST). Das *embmp* Gen führt zu 3 verschiedenen Spleiß-Varianten der cDNA, die als EmBMPa, EmBMPb und EmBMPc bezeichnet wurden.

EmBMPa

EmBMPa wird von 1215 Nukleotiden kodiert, umfasst 405 Aminosäuren und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 46 kDa. Das Startcodon befindet sich 121 Nukleotide vom cDNA 5'-Ende entfernt, das kontinuierliche Leseraster endet an Nukleotidposition 1337-1339 mit einem TGA Stopcodon.

```
CGCTGGGTCGAGGGGACATTTGAACCGAGACAGTGGCCAGACCACGGTCCAACAACCTGCCGCCATAACTTTTCTTCTCCACTCTCCGTTT 0090
TACCGCAAAGCACCGCAGCCTTCTGGCGCCATGGGAGATAGCAGAGGGTCCGGAAGAACATTAACACGACTTGTAGTGATTGGTCTTCTA 0180
M G D S R G S G R T L T R L V V I G L L 0020
CTGCAGGCGGCTCAGACTGCGGCCACGGTGGGCAGCAGTGTGTGGAATAAACGAAATTTTTGTGAGTAAGAACCCTCACGGTACGTT 0270
L Q A A Q T A A T V G S S A C G I N E I F V S K N H S R Y V 0050
AGAGCATCAAATATGAAGAAGAGGAGATATTTCTGAATCTGGAGTTCCGGATTACCTTTTACAGCTCAGAGAAAGACACAGTAGAGAATGG 0360
R A S N M K K R R Y F E S G V P D Y L L Q L R E R H S R E W 0080
ATGAATTCGGGCAAACCTGACGGTGGACACGGTCCAGTCTAGGAGTTATTACAACCTATACGTCATCACCGAACCCAGGGGCAAACGAT 0450
M N F G Q T D G G H G P S L G V I T T I R H H R T T G A N D 0110
AGGCAATCACAGTGGCAGAAACGTCAGAGCCTCGATTTCCGCCTTGCACGATTTTCAGTCGGTGTAGCAGTTGATAGCGTGCAGTTTCCGG 0540
R Q S Q W Q K R Q S L D F R L A R F S V G E Q L I A C S L R 0140
CTGCCAATTAGACATTGCATAAACGCATCCACCCCGGTCTCAGTGAAGGTGATTGGTGCAGGGGAGACCCCAAGGGGCGAAGTCTATGTA 0630
L P I R H C I N A S T P V S V K V I G A G E T P R G E V Y V 0170
GAGGCGCGGGGACGGCAGGACAGGACAGAAGGCGTGGCTAAACGTACCCTTCCCTCCTGCCTCCCTCTACAATCTCCTAAGACAAAAG 0720
E A A G T A G Q G Q K A W L N V P L P P A S L Y N L L R Q K 0200
CGTCTTCTTCGATTGCGAGTTGACCTGGCCGATGCCAACGTAATCGACACCTCGCACACGCCTCATCTCCTGACTTTTCATCGCAGTCGA 0810
R L L R L R V D L A D A N V I D T S H T P H L L T F H R S R 0230
```

4. Ergebnisse

GAACGCACTGAACGTCTGAAAAGAGCACGAAGAGATACTAGTGTGATGTGAACCTGGAGGCTTTTGAGCAGAGGAATCCGATAAATGAG	0900
E R T E R L K R A R R D T S A D V N L E A F E Q R N P I N E	0260
GTTAAACCAATCGGTGAAAATCGCAAAAAGCGTCGACGAACACGTCCTAAAAGCAAAGTTGGACAAATAATCGGGAAAAGCGCAATTCG	0990
V K P I G E N R K K R R R T R P K S K S W T N N R E K R N S	0290
CGATATCTCATGAACCAGCGATACGTCGCCTCAACATGCCAACGGCGTGACCTCGTGGTAACTTTAATGCAGTTGGTTGGTCGCGTTGG	1080
R Y L M N Q R Y V A S T C Q R R D L V V N F N A V G W S R W	0320
GTGATTGCTCCGCTGCCTACAACGCTGGCTACTGCTACGGCTACTGTCCCTTCCCCTTTTCAGCCCATTTCAACTACTACCAACCACGCG	1170
V I A P P A Y N A G Y C Y G Y C P F P L S A H F N T T N H A	0350
ATCATCATCCACCTCATGTACAACCTGGGGCTGGCCCCACCCCAAGTCAAACCGCCCTGTTGCACCCTGTACCTTCAGTCCCCAGTCT	1260
I I I H L M Y N L G V A P P Q V K P P C C T P V T F S P Q S	0380
ATTCTCTTCTTCGACAGCGACGAGGTTCGTTCTGCAAGTCTACGAGGACATGGTTGTCGAGACTTGTGGCTGTCGGTGATATTGACCCATA	1350
I L F F D S D E V V L Q V Y E D M V V E T C G C R *	0405
AATCAAGATTTT	1362

Abbildung 53 – EmBMPa: kodierende Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz. Unterstrichen dargestellt ist das putative Signalpeptid; durch dunkelgrauen Hintergrund sind die Nukleotide der Introns gekennzeichnet, die nicht aus der cDNA entfernt werden. Der Pfeil zeigt die Stelle, wo das Intron entfernt wurde. Die Schnittstelle wird durch einen Rahmen markiert. Auf hellgrauem Hintergrund ist die dem aktiven Peptid zugehörige Aminosäuresequenz dargestellt. Das Sternchen (*) markiert das Stopcodon.

EmBMPb

EmBMPb enthält 381 Aminosäuren, die insgesamt ein theoretisches Molekulargewicht von 43 kDa ergeben. Das Startcodon befindet sich in Nukleotidposition 121 vom cDNA 5'-Ende entfernt. Das kontinuierliche Leseraster endet an Nukleotidposition 1265-1267 mit einem TGA Stopcodon.

4. Ergebnisse

CGCTGGGTCGAGGGGACATTTGAACCGAGACAGTGGCCAGACCACGGTCCAACAACCTGCCCCATAACTTTTCTTCTCCACTCTCCGTTT	0090
TACCGCAAAGCACCGCAGCCTTCTGGCGCCATGGGAGATAGCAGAGGGTCCGGAAGAACATTAACACGACTTGTAGTGATTGGTCTTCTA	0180
<u>M G D S R G S G R T L T R L V V I G L L</u>	0020
CTGCAGGCGGCTCAGACTGCGGCCACGGTGGGCAGCAGTGCTTGTGGAATAAACGAAATTTTGTGAGTAAGAACCCTCACGGTACGTT	0270
<u>L Q A A Q T A A T V G S S A C G I N E I F V S K N H S R Y V</u>	0050
AGAGCATCAAATATGAAGAAGAGGAGATATTTTGAATCTGGAGTTCCGGATTACCTTTTACAGCTCAGAGAAAGACAGTAGAGAATGG	0360
R A S N M K K R R Y F E S G V P D Y L L Q L R E R H S R E W	0080
ATGAATTTCCGGCAAACCTGACGGTGGACACGGTCCCAGTCTAGGAGTTATTACAACCTATACGTCATCACCGAACCCACAGGGGCAAACGAT	0450
M N F G Q T D G G H G P S L G V I T T I R H H R T T G A N D	0110
↓	
AGGCAATCACAGTGGCAGAAACGTCAGAGCCTCGATTTCGCCTTGACGATTTTTCAGTCGTTGAAGGTGATTGGTGCAGGGGAGACCCCA	0540
R Q S Q W Q K R Q S L D F R L A R F S V V K V I G A G E T P	0140
AGGGGCGAAGTCTATGTAGAGGGCGGGGACGGCAGGACAGGGACAGAAGGCGTGGCTAAACGTTACCCTCCTCCTGCCTCCCTCTAC	0630
R G E V Y V E A A G T A G Q G Q K A W L N V P L P P A S L Y	0170
AATCTCCTAAGACAAAAGCGTCTTCTCGATTGCGAGTTGACCTGGCCGATGCCAACGTAATCGACACCTCGCACACGCTCATCTCCTG	0720
N L L R Q K R L L R L R V D L A D A N V I D T S H T P H L L	0200
ACTTTTTCATCGCAGTCGAGAACGCACTGAACGTCGAAAAGAGCACGAAGAGATACTAGTGTGATGTGAACCTGGAGGCTTTTGTAGCAG	0810
T F H R S R E R T E R L K R A R R D T S A D V N L E A F E Q	0230
↓	
AGGAATCCGATAAATGAGGTTAAACCAATCGGTGAAAATCGCAAAAAGCGTCGACGAACACGTCCTAAAAGCAAAAAGTTGGACAAATAAT	0900
R N P I N E V K P I G E N R K K R R R T R P K S K S W T N N	0260
CGGGAAAAGCGCAATTCGCGATATCTCATGAACCAGCGATACGTCGCCTCAACATGCCAACGGCGTGACCTCGTGGTTAACTTTAATGCA	0990
R E K R N S R Y L M N Q R Y V A S T C Q R R D L V V N F N A	0290
GTTGGTTGGTTCGCGTTGGGTGATTGCTCCGCTGCCTACAACGCTGGCTACTGCTACGGCTACTGTCCCTTCCCCTTTCAGCCCATTTT	1080
V G W S R W V I A P P A Y N A G Y C Y G Y C P F P L S A H F	0320
AATACTACCAACCACGCGATCATCATCCACCTCATGTACAACCTGGGCGTGGCCCCACCCCAAGTCAAACCGCCCTGTTGCACCCCTGTC	1170
N T T N H A I I I H L M Y N L G V A P P Q V K P P C C T P V	0350
ACCTTCAGTCCCCAGTCTATTCTTCTTCTCGACAGCGACGAGGTCTGTCGAAGTCTACGAGGACATGGTTGTCGAGACTTGTGGCTGT	1260
T F S P Q S I L F F D S D E V V L Q V Y E D M V V E T C G C	0380
CGGTGATATTGACCCTAAAATCAAGATTTT	1290
R *	0381

Abbildung 54 - EmBMPb: kodierende Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz. Unterstrichen dargestellt ist das Signalpeptid; Die Schnittstelle wird durch Umrahmung hervorgehoben; Durch dunkelgrauen Hintergrund sind die Nukleotide des Introns gekennzeichnet, das nicht aus der cDNA entfernt werden. Die Pfeile zeigen die Stellen an, wo Introns entfernt wurden. Durch hellgrauen Hintergrund ist die dem aktiven Peptid zugehörige Aminosäuresequenz markiert. Das Sternchen (*) markiert das Stopcodon.

4. Ergebnisse

EmBMPc

EmBMPc enthält als kürzeste Isoform 301 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 34 kDa. 903 Nukleotide kodieren für dieses Isoform. Das Startcodon befindet sich 291 Nukleotide vom cDNA 5'-Ende entfernt. 42 Basenpaare stromaufwärts findet sich ein „in-frame“ TAG Stopcodon, das kontinuierliche Leseraster endet an Nukleotidposition 1195-1197 mit einem TGA Stopcodon.

```

GCGCTGGGTGAGGGGACATTTGAACCGAGACAGTGGCCAGACCACGGTCCAACAACAGTCCGCCATAACTTTTCTTCTCCACTCTCCGTT 0090
TTACCGCAAAGCACCCGACGCTTCTGGCGCCATGGGAGATAGCAGAGGGTCCGGAAGAACATTAACACGACTTGTAGTGATTGGTCTTCT 0180
ACTGCAGGCGGCTCAGACTGCGGCCACGGTGGGCAGCAGTGTCTTGTGGAATAAACGAAATTTTGTGAGTAAGAACCACCTCACGCTCAGA 0270
                                                                                               *
GAAAGACACAGTAGAGAATGGATGAATTCGGGCAAACAGTACGGTGGACACGGTCCCAGTCTAGGAGTTATTACAACACTATACGTATCAC 0360
      M N F G Q T D G G H G P S L G V I T T I R H H 0023
CGAACCACAGGGGCAAACGATAGCAATCACAGTGGCAGAAACGTAGAGCCTCGATTTCCGCTTGCACGATTTTCAGTCGTGAAGGTG 0450
R T T G A N D R Q S Q W Q K R Q S L D F R L A R F S V V K V 0053
ATTGGTGCAGGGGAGACCCCAAGGGGCGAAGTCTATGTAGAGGCGCGGGGACGGCAGGACAGGACAGAAGGCGTGGCTAAACGTACCA 0540
I G A G E T P R G E V Y V E A A G T A G Q G Q K A W L N V P 0083
CTTCTCTGCCTCCCTCTACAATCTCCTAAGACAAAAGCGTCTTCTTCGATTCGAGTTGACCTGGCCGATGCCAACGTAATCGACACC 0630
L P P A S L Y N L L R Q K R L L R L R V D L A D A N V I D T 0113
TCGCACACGCCTCATCTCTGACTTTTCATCGCAGTTCGAGAACGCACTGAACGTCTGAAAAGAGCACGAAGAGATACTAGTGCTGATGTG 0720
S H T P H L L T F H R S R E R T E R L K R A R R D T S A D V 0143
AACCTGGAGGCTTTTGAGCAGAGGAATCCGATAAATGAGGTAAACCAATCGGTGAAAATCGCAAAAAGCGTCGACGAACACGTCCTAAA 0810
N L E A F E Q R N P I N E V K P I G E N R K K R R R T R P K 0173
AGCAAAAGTTGGACAAATAATCGGGAAAAGCGCAATTCGCGATATCTCATGAACCAGCGATACGTCGCCTCAACATGCCAACGGCGTGAC 0900
S K S W T N N R E K R N S R Y L M N Q R Y V A S T C Q R R D 0203
CTCGTGGTAACTTTAATGCAGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 0990
L V V N F N A V G W S R W V I A P P A Y N A G Y C Y G Y C P 0233
TTCCCCCTTTAGCCCATTTCAATACTACCAACCACGCGATCATCATCCACCTCATGTACAACCTGGGCGTGGCCCCACCCCAAGTCAA 1080
F P L S A H F N T T N H A I I I H L M Y N L G V A P P Q V K 0263
CCGCCCTGTTGCACCCCTGTCACCTTTCAGTCCCAGTCTATTCTTCTTCTTCGACAGCGACGAGGTCGTTCTGCAAGTCTACGAGGACATG 1170
P P C C T P V T F S P Q S I L F F D S D E V V L Q V Y E D M 0293
GTTGTCGAGACTTGTGGCTGTCGGTGATATTGACCCTAAAATCAAGATTTT 1221
V V E T C G C R * 0301

```

Abbildung 55 – EmBMPc: kodierende Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz. Bei dieser Spleiß-Isoform sind alle Introns entfernt. Die Entfernung des ersten Introns ändert das Leseraster und führt zu einem Stopkodon, die resultierende Sequenz kodiert nicht für ein Signalpeptid. Das Sternchen (*) markiert die Stopcodons am 5'- und 3' Ende der Sequenz. Die Schnittstelle wird durch einen Rahmen markiert. Vor hellgrauem Hintergrund ist die dem aktiven Peptid zugehörige Aminosäuresequenz dargestellt. Die Pfeile zeigen die Stelle, wo die drei Introns entfernt wurden.

4.3.2. Der chromosomale Locus von *embmp*

Aus der chromosomalen DNA des H95-Isolates konnte der chromosomale Locus von *embmp* mit spezifischen Primern in seiner gesamten Länge charakterisiert werden. Er misst vom Anfang der Sequenz bis zum Stopcodon 2013 Basenpaare. Darin finden sich 3 Introns im N-terminalen Bereich des Genes, die während der mRNA-Prozessierung unterschiedlich abgespleißt werden. Die Introns haben unterschiedliche Längen von 70 bis zu 677 bp. Werden alle drei Introns während des Spleißvorgangs entfernt, entsteht daraus EmBMPc, welches kein putatives Signalpeptid hat. Werden das zweite und dritte Intron von der mRNA abgetrennt, resultiert daraus EmBMPb, welches zum Unterschied von EmBMPa ein putatives Signalpeptid enthält. EmBMPa entsteht, wenn nur das dritte Intron von der mRNA durch Splicing abgeschnitten wird. Es enthält ähnlich wie bei EmBMPb ein putatives Signalpeptid.

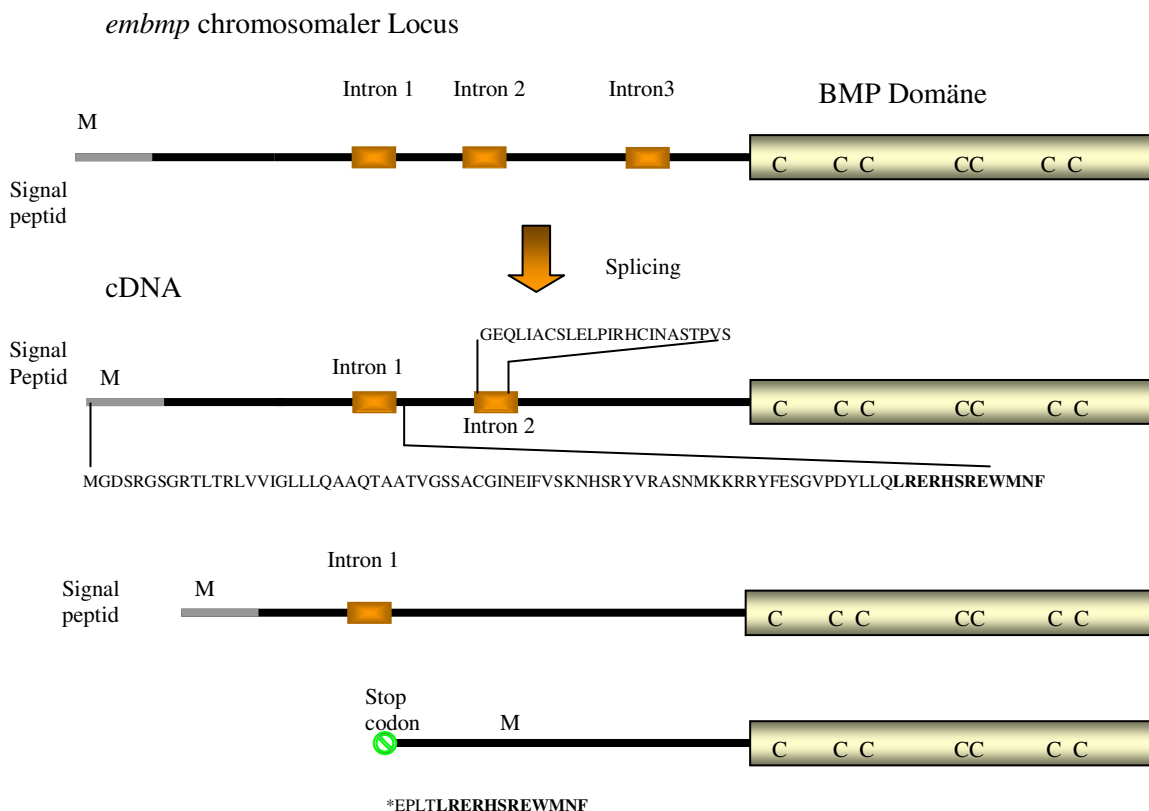


Abbildung 56 – Der chromosomale Locus von *embmp* und die drei Spleiß-Varianten. In der obersten Reihe ist der komplette chromosomale Locus von *embmp* dargestellt. In den nächsten Reihen sind die verschiedenen Spleiß-Varianten: *embmpa*, *embmpb*, *embmpc* gezeigt. Das Start-Metionin (M); Das Signalpeptid ist im grau markiert; die Sieben Cysteine in der BMP Region werden durch ein C angezeigt.

4. Ergebnisse

Exon Nr.	Stelle	Größe (bp)	5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	Intron-größe (bp)	Unterbrochene Aminosäure
1	1-143	143	TCA CG gta cgt	tta cag CTC	70	R (48)
2	214-391	178	GTC G gtg agc	tct cag TG AAG	72	V (131)
3	464-780	317	GAG gtt agg	ttg cag GTT	677	-
4	1458-1892	435				

Tabelle 15 - Die Exon-Intron Organisation in *embmp*. Dargestellt sind die Stellen im Gen, wo die Introns die mRNA unterbrechen. Die Codons des Leserasters in der Exon-Intron-Übergangsregion sind aufgeführt. Dabei sind die Sequenzen der Exons in Großbuchstaben und die der Introns in Kleinbuchstaben geschrieben. Die Länge der jeweiligen Exons bzw. Introns ist in bp angegeben.

4.3.3. Expressionsanalyse von *embmp* in 2 verschiedenen *E. multilocularis* Larvenstadien.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Expression von *embmp* spezifisch für bestimmte Entwicklungsstadien von *E. multilocularis* ist. Dazu wurden genspezifische PCRs mit zuvor gewonnener Metazestoden-cDNA und Protoskolex-cDNA durchgeführt. Die dabei eingesetzten Primer BMPdw1 (5'-GTTAAACCAATCGGTGAAAA-3') und BMPup1 (5'-ATCTTGATTTTAGGGTCAATATC-3') waren dabei gegen die in allen drei Spleiß-Varianten gleich vorkommende BMP-Domäne gerichtet (Siehe Abbildung 57). Aus beiden Ansätzen konnten klare Banden für *embmp* amplifiziert werden. Es zeigte sich also keine stadienspezifische Expression von *embmp*.

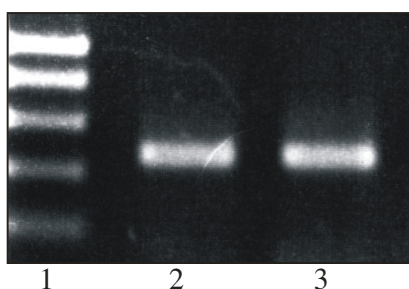


Abbildung 57- Expressionsanalyse von *embmp2* in verschiedenen Larvenstadien. (1) Leiter. Sowohl im PCR-Ansatz mit Metazestoden-cDNA(2) als auch Protoskolex-cDNA (3) als template mit gegen *embmp* gerichteten Primern zeigt sich in der Gelelektrophorese eine deutliche Bande. Es zeigt sich also keine stadienspezifische Expression dieses Gens.

4.3.4. Strukturmerkmale von EmBMP

Beim Vergleich der 3 Isoformen von EmBMP mit den Datenbanksequenzen fand sich eine hohe Homologie zu den bone morphogenetic protein Faktoren, wobei die höchste Homologie zu humanen BMP2/4 war.

In Analogie zu den anderen BMPs könnte man rückschließen, dass das Präpropeptid bei EmBMPa die ersten 302 Aminosäuren, bei EmBMPb die ersten 278 Aminosäuren und bei EmBMPc die ersten 198 Aminosäuren umfassen würde. Durch den Verdau des Propeptids würde ein reifes Protein freigesetzt, welches sich aus den 103 C-terminalen Aminosäuren zusammensetzte. Dieses C-terminale Fragment von EmBMP enthält, genau wie bei anderen BMP-Moleküle, die charakteristischen sieben Cystein Reste. Bei den anderen BMP Faktoren wurde schon beschrieben, dass sechs von diesen sieben Cystein-Resten hoch konserviert sind und einen Cystein-Knoten formieren. Dieser ist wichtig für die Homodimerisierung des BMP Faktoren.



Abbildung 58 - Sequenzvergleich von BMP Homologen verschiedener Organismen. HsBMP2: *Homo sapiens* BMP2 (P12643); DmDPP: *Drosophila melanogaster* Decapentaplegic (ACP07713); EmBMP: *Echinococcus multilocularis* BMP (diese Arbeit); HsBMP3: *Homo sapiens* BMP3 (P12645). Die konservierten Aminosäuren sind durch schwarzen Hintergrund hervorgehoben. Die charakteristischen Cysteine sind durch Sternchen (*) markiert.

4.4. Klonierung und Charakterisierung der cDNA für ein „TGF β Activated Kinase“ (TAK) -Homologes aus *E. multilocularis* (EmTAK1).

Die TGF β -Faktoren können nicht nur den kanonischen Signalübertragungsweg über die Smad-Proteine, sondern auch die von der Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) bestimmten Signalwege aktivieren (Atfi et al., 1997; Adachi-Yamada et al., 1999; Hocevar et al., 1999; Iwasaki et al., 1999; Sano et al., 1999. MAP Kinase-Signalübertragungswege setzen sich aus 3 Proteinkinasen zusammen: MAPKKK (mitogen activated protein kinase kinase kinase), MAPKK (mitogen activated protein kinase kinase) und MAPK (mitogen activated protein kinase). Im ersten Schritt phosphoryliert und aktiviert eine MAPKKK eine MAPKK. Diese phosphoryliert und aktiviert dann eine MAPK (Nishida & Gotoh, 1993; Blumer & Johnson, 1994; Marshall, 1995).

Die humane TGF β Aktivierte Kinase 1 (TAK1) war die erste identifizierte MAPKKK, die über das TGF β - und BMP-Signalübertragungssystem aktiviert wird (Yamaguchi et al., 1995). TAK1 kann auch von Interleukin 1- (IL-1), vom Tumor Nekrose Factor α - (TNF α) und von Toll Like-Rezeptoren aktiviert werden (Holtmann et al., 2001; Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Sakurai et al., 1999; Takaesu et al., 2000; Irie et al., 2000). Viele Downstream-Effekte von TAK1 involvieren die „Stress Activated Protein Kinasen“ (SAPKs) wie zum Beispiel JNK und p38. Dabei aktiviert TAK1 die SAPKs über MAPKKs wie z.B. MKK6, MKK3 (p38; Moriguchi et al., 1996; Shirakabe et al., 1997), MKK4 und MKK7 (JNK; Yamaguchi et al., 1995)

4.4.1. Klonierung und Charakterisierung der *emtak1*-cDNA

Aus dem Plasmid Ig312 aus der cDNA-Bibliothek, die für das Metazestoden-Stadium von *E. multilocularis* hergestellt worden war (Hubert et al., 2004), konnte ein 250 Nukleotid-langes Fragment isoliert werden, welches für ein Protein kodierte, das hohe Homologie zur Familie der TAK1-Proteine aufweist. Das zugehörige Gen wurde darum als *emtak1* bezeichnet. Über eine 5'-3' RACE PCR mit den Primer PU (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') und TAKup3 (5'-GTACGTTTCGCGGTAGTTG-3'); TAKdw3 (5'-ACCTGGCGATGGTCAGGA-3') und PJG4-5-3 (5'-TTGGAGACTTGACCAAACCT-3') konnte die komplette Sequenz identifiziert und charakterisiert werden.

Die gesamte in dieser Arbeit bestimmte cDNA von *emtak1* umfasst ohne Poly A Schwanz 1740 Nukleotide. 51 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons ist ein „in-Frame“ Stopcodon lokalisiert. Ein Spliced-Leader konnten nicht identifiziert werden. Das Startcodon befindet sich 81 bp vom

4. Ergebnisse

cDNA 5'-Ende entfernt. Das komplette Leseraster endet an der Nukleotidposition 1582-1584 mit einem TAA Stopcodon. Das kodierte Protein EmTAK umfasst 500 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 57 kDa (Siehe Abbildung 59).

```

TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTCCGCGGGGGCGATTTGTTTCCACTAAGACTGAAACGGATGGATGCC 0090
                                     *                                                                 M D A 0003

GATAGACCTGCCCCAAAGTGGCTCAGTATAATCATCCGAACCCATCTGACGATGAGCTTAGGTATTGTGTGGAGAGAGTTAAGTCCGTA 0180
D R P A P K V A Q Y N H P N P S D D E L R Y C V E R V K S V 0033

TTAATATACCCGAGGATGAAATTCAAATTGAGAAAAAGAGTGTATCAGGAGGAAGTTTTGGGGATGTCTCATTCGGCACATACCGTGA 0270
F N I P E D E I Q I E K K S V S G G S F G D V S F G T Y R G 0063
-----
AAAAATGTGGTGAAAAGGATTTTAAATTTTCGCTACGAAGAATGAGCGCAAGTACAAC TACCGCAAACGTACACGCTTGACGCCTGC 0360
K N V V K K D F K F F A T K N E R K Y N Y R E T Y T L D A C 0093
-----
AATCACATAAACATCGTCAATTTTATTTGGTGCCGGTCTGACACGGGAAAAGCTAACGTTTCGCTATGTTGTCATTGAGCGGGCGACAAAC 0450
N H I N I V N F I G A G P D T G K A N V R Y V V I E R A T N 0123
-----
GCCTCCCTGGCAGAGCTCATTTGAATCAAGCACTGCATACTCCATTTGGCAGCTGATGCTCTGGAACCTGTCATCTCGCAGATGGGTTGGCG 0540
A S L A E L I E S S T A Y S I W H V M L W N L H L A D G L A 0153
-----
TATCTTCACTCTCGTCTGAGCCAATCATCCATCGGGACCTGAAACCCGCCAACATGCTCCTCTTTGATGGGTGCACCATCCTCAAGATA 0630
Y L H S R P E P I I H R D L K P A N M L L F D G C T I L K I 0183
-----
AGCGACTTTGGTACGTCAAAGATTATTTAGGGCGGGCAAGGAGGACTTGCAGTCGCTAAATCAGGGCTCGCGTATCTATATGGCACCAGAG 0720
S D F G T S K I I E A G K E D L Q S L N Q G S R I Y M A P E 0213
-----
GTACAACAGCGCCGTGTTGGTGAAAGTTATGCCAGTATACGGAGAAGGTGGATATATACAGTATGGCGGTTTCACTCTGGGAGATGTTG 0810
V Q Q R R V G E S Y A Q Y T E K V D I Y S M A V S L W E M L 0243
-----
ACACGAAGATTGGAGCAAAATGTGAATCCTCGCTGTATGAAGATCCGTTTCATGTCCACCCTTTCTAGAATGCCTATTTGCTCGTGGAAATG 0900
T R R L E Q N V N P R C M K I R S C P P F L E C L F A R G M 0273
-----
GCAGAGGATCCCGCTCAGCGACCAACAGCCTTACAATTGGTTCGATTGCTAGATTTTATTATGCGTAAAGTCTGCATGATGAACACCTCC 0990
A E D P A Q R P T A L Q L V R L L D F I M R K V C M M N T S 0303
-----
GAGCTACGCATTGAATTTGAGAGCGTTGGGATTTCCAGTGTCTATCAACAGACTGCCACACAACCTGTGCGATAC GAATACCATAAAAACAG 1080
E L R I E F E S V G I P S V Y Q Q T A T Q L V D T N T I K Q 0333

GAGGGCTCATCACATTGTAGTCTGCCTGAAGAAATGATGACTATGCAAGTTTCTGACTCCAGGTCAAAGTTATCTCTGAGAAGAGAACA 1170
E G S S H C S L P E E M M T M Q V S D S R S K V I S E K R T 0363

```

```

      .           .           .           .           .           .           .
CCTGGCGATGGTCAGGATTTTCAATGTTATGTCACCACTGACGCGACTCTTTTCAATCGTCCATCTGATGCCTCTATCTACTGCGGGGCA 1260
  P G D G Q D F Q C Y V T T D A T L F N R P S D A S I Y C G A 0393
      .           .           .           .           .           .           .
AGATGTCGGCAATCGCCTTCGAAAGAGGAGGTTGCTGCGTTAGACATGAAGCTGGTCCCTGCTTCTACGGCCGGTTCACCCTGCTGGC 1350
  R C R Q S P S K E E V A A L D M K L V P L L L R P V H P A G 0423
      .           .           .           .           .           .           .
GGTTCAAAGCCCGAGATGGAGTTGTACCATAAACATACTGAGCTGGCGAGGGAGTATATCAGACTTGACGAGGAGATAAAACGCTTGAAT 1440
  G S K P E M E L Y H K H T E L A R E Y I R L D E E I K R L N 0453
      .           .           .           .           .           .           .
AAGCTGTGGGACGATAGAGTGACGCAAATTGTCTCGGAGAAGGGCATTAAACCCAAGCATGTTGACAAGTGAAAGAACGCATCAGGGAG 1530
  K L W D D R V T Q I V S E K G I K P K H V D K W K E R I R E 0483
      .           .           .           .           .           .           .
TACTGCAACCTCTGCGTCATTTTGTGCGTGAAGTACAAAAGTCTGGACGCTAAGGACACTGAAATTTTATTGAAACTGCCATCTACGTA 1620
  Y C N L C V I L S R E V Q K S G R * 0500
      .           .           .           .           .           .           .
AAGCTGCCAATAACCGGATTAACACTTTTTATTCATCCGATACCTTCTTAACCCTTCTCCTCTTTTAAAGCCATGTCTTGTGATGAGTCT 1710
      .           .           .           .           .           .           .
GCTGTCATCAATACTAGGGGCTTATTTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1800

```

Abbildung 59 – Nukleotidsequenz der *emtak1* cDNA und die abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Pfeile zeigen die Stelle an, wo Introns entfernt wurden. Kontinuierlich unterstrichen dargestellt ist die Tyrosin Kinase Domäne. Die Umrahmung zeigt die charakteristische MAP-Kinase Region. Unterbrochen unterstrichen dargestellt ist die Ser/Thr-Kinase Domäne. Ihr aktives Zentrum ist durch einen grauen Hintergrund hervorgehoben. Der putative Leucin-Zipper ist durch auf grauen Kreisen geschriebenen L's angezeigt. Sternchen (*) markieren die Stopcodons.

4.4.2. Strukturelle Merkmale von EmTAK1

Das EmTAK1 Protein ist in seiner gesamten Struktur den TAK1-Proteinen von Vertebraten ähnlich. EmTAK1 enthält sowohl eine N-terminale Protein Kinase-Domäne als auch eine lange C-terminale Domäne. Dabei besitzt EmTAK1 eine Sequenz, die vermuten lässt, dass es sowohl eine Ser/Thr- als auch eine Tyrosin-Kinase Aktivität aufweist. Die MAP Kinase Domäne ist zwischen F₇₄-C₁₇₈, die Ser/Thr Protein-Kinase Domäne zwischen I₁₆₂-L₁₇₄ lokalisiert. Die ATP-Bindungsstelle findet sich im Bereich von V₄₈-K₆₄. Ein putativer Leucin-Zipper (PsortII-Program) wird durch folgende Leucine angezeigt: L₄₃₁-L₄₃₈-L₄₄₅-L₄₅₂.



Abbildung 60 Strukturelle Charakteristika von EmTAK1. Schematische Darstellung des EmTAK1 Proteins. Wichtige Motive sind wie folgt gekennzeichnet: ATP-BD: ATP-Bindungsdomäne; Ser/Thr K: Serin/Threonin Kinase-Domäne; MAPK: MAP Kinase-Domäne; LZ: Putative Leucinzipper.

4.4.3. Charakterisierung des chromosomalen *emtak1* Locus

Unter Verwendung spezifischer Primer gegen *emtak1* in Form mehrere überlappender Fragmente konnte der komplette chromosomale Locus charakterisiert werden. Er enthält insgesamt 2650 Basenpaare, die sich auf 6 Exons mit einer Länge von 53 bis 688 bp und 5 Introns mit einer Länge von 49 bis 530 bp aufteilen.

Außer dem ersten Intron, welches im Bereich des 3'-Spleiß-Akzeptors eine GG Sequenz aufweist, haben alle Introns von *Echinococcus emtak1* die beiden kanonische 5'-GT-AG-3' Dinukleotide im Bereich der 5' Spleiß-Donor Sequenz bzw. der 3' Spleiß-Akzeptor Sequenz.

Exon Nr.	Stelle	Größe (bp)	5' Spleiß-Donor	3' Spleiß-Akzeptor	Intron-größe (bp)	Unterbrochene Aminosäure
1	1-53	53	AAC CC gta agc	ttt cgg A TCT	530	P (18)
2	584-668	85	AAG gta cat	ttt aag AGT	119	-
3	788-1034	247	GAG C gta agt	ttt tag TC ATT	49	L (129)
4	1084-1347	264	CAG C gta ggt	acc tag GC CGT	129	R (217)
5	1447-1639	163	GCT CG gtg aga	gtt tag T GGA	83	R (271)
6	1723-2410	688				

Tabelle 16 –Die Exon-Intron Organisation in *emtak1*. Dargestellt sind die Stellen im Gen, wo die Introns die mRNA unterbrechen. Die Codons des Leserasters in der Exon-Intron-Übergangsregion sind aufgeführt. Dabei sind die Sequenzen der Exons in Großbuchstaben und die der Introns in Kleinbuchstaben geschrieben. Die Länge der jeweiligen Exons bzw. Introns ist in bp angegeben.

4.4.4. Nachweis der Parasiten-Spezifität von *emtak1*

Zur Bestätigung, dass *emtak1* spezifisch *E. multilocularis* entstammt und nicht aus einer Kontamination mit Wirts-RNA in der cDNA herrührt, wurden verschiedene genspezifische PCR-Reaktionen aus chromosomaler Wirts- und Parasiten-DNA durchgeführt. Das für die *Meriones* spezifische β -Tubulin Gen konnte nur in dem Wirtsmaterial und *emtak1* mit den Primer TAK15dw (5'- ATGGATGCCGATAGACCTG-3') und TAK13up (5'- GTACGTTTCGCGGTAGTTG-3') nur in dem Parasiten Material nachgewiesen werden, was die Spezifität von EmTAK1 bestätigte und eine Kontamination ausschloss.

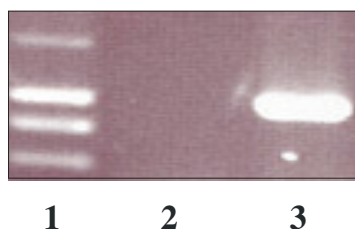


Abbildung 61. Nachweis der Parasiten-Spezifität von *emtak1*. Als template wurde in beiden hier dargestellten PCR-Ansätzen *in vitro* kultivierte Metacestoden-DNA eingesetzt. Im ersten Ansatz (Spur 2) wurden als Primer spezifisch gegen das *Meriones* β -Tubulin-Gen gerichtete Oligonukleotide verwendet. Im zweiten Ansatz (Spur 3) kamen Primer gegen das *emtak1*-Gen zum Einsatz. Spur 1 = Marker.

4.4.5. Analyse der Expression von *emtak1* in zwei verschiedenen *E. multilocularis*-Larvenstadien

Auch bei *emtak1* sollte untersucht werden, ob die Expression des Genes für bestimmte Larvenstadien spezifisch ist. Dazu wurde unter gleichen Versuchsbedingungen wie bei *embmp* (Kapitel 4.3.3) gearbeitet, nur dass hier für *emtak1* die spezifische Primer TAK1dw (5'- GGGGATGTCTCATTCGGC-3') und TAK1up (5'- GTCCAGACTTTTGTACTTC-3') verwendet wurden. Sowohl im Metacestoden- als auch im Protoskolex-Material konnte *emtak1* nachgewiesen werden, so dass keine stadienspezifische Expression für dieses Gen vorliegt.

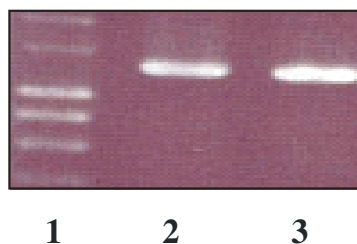


Abbildung 62. Expression von *emtak1* in Metazestode und Protoscolex. Die Expression von *emtak1* in zwei verschiedenen *E. multilocularis*- Larvenstadien wurde untersucht. Im ersten Versuchsansatz (Spur 2) wurde als template Metazestoden-cDNA eingesetzt, im zweiten Ansatz (Spur 3) Protoscolex- cDNA. Marker (1)

4.4.6. TAK Interaktionsuntersuchungen mittels yeast two hybrid

Mittels YTH sollte eine Interaktion zwischen den EmSmad Faktoren und EmTak1 überprüft werden. Dafür wurden zunächst verschiedene YTH-Vektorkonstrukte hergestellt: Zuerst wurde der ORF von *emtak1* in beide Vektoren kloniert, dann wurde eine mutierte Form *emtak1m*, die eine Deletion der ersten 22 Aminosäuren aufweist, in beide YTH Vektoren kloniert. Die mutierte Form vom *emtak1* wurde deshalb eingesetzt, weil eine konstitutiv aktive Form von humanem TAK1 identifiziert werden konnte, die sich durch ein Fehlen der ersten 22 Aminosäuren auszeichnete (Yamaguchi et al., 1995). Nach Überprüfung der korrekten Sequenzen mittels einer Sequenzanalyse wurde durch verschiedene Vektorkombinationen eine Interaktion von EmTAK1 mit den MAP Kinase-Faktoren wie EmRas, EmRal und EmMKK aus *E. multilocularis* (Spiliotis et al., 2004, 2005) untersucht. Die untersuchten Vektorkombinationen und die Interaktionsergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt.

Es konnte weder eine Interaktion von EmTAK1 in seiner wildtypischen Form noch in der mutierten Form mit den EmSmads oder EmMAP-Kinase-Faktoren detektiert werden.

Im nächsten Schritt wurden die mutierten Formen der EmSmads eingesetzt. Es zeigte sich eine deutliche Interaktion zwischen EmTAK1 und der mutierten Form von EmSmadA-m. Mit EmSmadB-m und EmSmadC-m wurde keine Interaktion beobachtet, so dass die Interaktion zwischen EmTAK1 und EmSmadA-m als spezifisch angesehen werden kann.

4. Ergebnisse

A)

	EmSmadA-AD	EmSmadB-AD	EmSmadC-AD	EmRas-AD	EmRal-AD	EmMKK-AD
EmTAK1-BD	-	-	-	-	-	-
EmTAK1-m-BD	-	-	-	nd	nd	nd

B)

	EmSmadA-m-AD	EmSmadB-m-AD	EmSmadC-m-AD
EmTAK1-BD	+++	-	-

Tabelle 17 – Überprüfen der Interaktionsfähigkeit vom EmTAK1 mittels YTH. **A)** Überprüfung der Interaktion mit wt EmSmads und EmRas, EmRal und EmMKK. Weder EmTAK1 wild type noch EmTAK1-m zeigten eine Interaktion mit den *Echinococcus* Faktoren. nd = not done. **B)** Überprüfung der Interaktion mit den konstitutiv aktiven EmSmads-m. Es zeigt sich eine starke Interaktion zwischen EmTAK1 und EmSmadA-m. Keine Interaktion mit den anderen Faktoren.

5 Diskussion

5.1 Das TGF β -Signaltransduktionssystem in *E. multilocularis*

Echinococcus multilocularis ist der Erreger der alveolären Echinokokkose, einer tödlichen Parasitose. Bislang gibt es noch kaum molekulare Daten über den Erreger; insbesondere weiß man wenig über die Mechanismen, welche essentiell für das Wachstum und die Entwicklung des Parasiten sind. Die aktuelle Therapie besteht in einer lebenslangen Einnahme von Benzimidazolpräparaten, die einen parasitostatischen Effekt haben. Genauere molekulare und biochemische Kenntnisse über den Parasiten könnten neue und effizientere Therapie-möglichkeiten für die Behandlung der Echinokokkose aufdecken.

Man kann davon ausgehen, dass *E. multilocularis* ein oder mehrere Systeme von hoch regulierten Wachstums- und Entwicklungs-Mechanismen entwickelt hat. Diese würden dann ermöglichen, dass das jeweilige Entwicklungsstadium im jeweiligen Wirt zum jeweils richtigen Zeitpunkt durchlaufen wird.

Die Faktoren der TGF β Superfamilie üben einen kontrollierenden Einfluss auf viele zelluläre Mechanismen aus, so z.B. auf das Wachstum, die Zelldifferenzierung, die Immunantwort und auf die Apoptose. TGF β -Faktoren konnten in den verschiedensten Organismen identifiziert werden, so z.B. in Vertebraten, Insekten und Nematoden (Massagué, 1998). Man geht daher davon aus, dass diese Faktoren in allen tierischen Zellen vorhanden sind. Besonders über die Struktur von TGF β -Signalfaktoren bei Lophotrochozoen, denen u.a. der Trematode *Schistosoma mansoni* und der Zestode *E. multilocularis* angehören, liegen bislang jedoch kaum Daten vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden entsprechende Mechanismen an *E. multilocularis*, einem Vertreter der dritten großen Gruppe der Helminthen, den Zestoden, durchgeführt. Dies ist u.a. deshalb von besonderem Interesse, da unter Verwendung eines *in vitro*-Kultursystems für *E. multilocularis* bereits deutliche Effekte eines TGF β ähnlichen Zytokins (BMP2) auf das Wachstum des Parasiten beobachtet werden konnte (Spiliotis & Brehm, nicht publizierte Daten).

5.2 *Echinococcus* Smads als TGF β /Activin- und BMP-Signaltransduktoren

Mit dem Ziel der Charakterisierung der TGF β -Signaltransduktion in Zestoden wird in dieser Arbeit zuerst von der Identifikation von neuen Mitgliedern der Familie der Smad-Proteine berichtet, die im Fuchsbandwurm *E. multilocularis* exprimiert werden.

Einer dieser charakterisierten Faktoren, EmSmadB, zeigte strukturelle und funktionelle Eigenschaften, welche denen der Smad-Proteine von Vertebraten ähnlich sind. EmSmadB enthält hoch konservierte MH1- und MH2-Domänen, eine Prolin-reiche Linker-Region mit mehreren putativen Phosphorylierungsstellen für die Mitglieder der MAPK-Familie sowie eine C-terminales SSVS-Motiv, welches EmSmadB als Mitglied der R-Smad Unterklasse ausweist. Diese Klassifizierung wird durch die Ergebnisse der hier durchgeführten heterologen Expressionsstudien gestützt, welche zeigten, dass EmSmadB funktionell mit den humanen BMP-Rezeptoren interagieren kann. Außerdem fand sich bei EmSmadB, wie es typisch für R-Smads ist, die Fähigkeit zur Bildung von Homo- und Heterodimeren, was aber die vorangehende Aktivierung des Proteins in seinem C-terminalen SSVS-Motiv erforderte. Diese Ergebnisse stehen in vollem Einklang mit dem aktuellen Modell der R-Smad-Aktivierung in Vertebraten, welches besagt, dass die Faktoren sich im Ruhezustand durch eine intramolekulare Maskierung der MH2-Domäne über die MH1-Domäne autoinhibieren (Itoh et al., 2000; Lutz & Knaus, 2002). Man vermutet, dass durch die vom Rezeptor ausgehende Phosphorylierung im C-terminalen SSXS-Motiv diese Autoinhibition aufgehoben wird und so die jetzt freie MH2-Domäne als Mediator der homo- und heteromeren Interaktion dienen kann. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass auch bei der Aktivierung von EmSmadB ähnliche Mechanismen involviert sind.

Bei den Säugetieren wurden zwei verschiedene Wege der TGF β -Signalübertragung beschrieben. Bei dem einen werden Zytokine vom Activin/TGF β -Typ an Rezeptorkinasen der Activin/TGF β -Gruppe gebunden, welche dann das Signal über sogenannte AR-Smads, zu denen Smad2 und Smad3 gehören, weiterleiten. Der zweite Signaltransduktionsweg wird durch die Bindung von BMP-ähnlichen Faktoren an Kinasen der BMP-Rezeptor-Familie ausgelöst, was dann zu einer Phosphorylierung der BR-Smads (Smad1, Smad5, Smad8) durch die Rezeptor-Kinase führt (Miyazawa et al., 2002).

Eine wesentliche Rolle für diese selektive Interaktion spielen zwei strukturelle Elemente: zum einen die Region des L45 Loop, welcher im Bereich der intrazellulären Domäne des Rezeptors liegt, und zum anderen der L3 Loop im Bereich der MH2 Domäne des Smad-Proteins (Chen et al., 1998). Es ergaben sich in den hier durchgeführten Experimenten mehrere Hinweise, dass EmSmadB eindeutig der Untergruppe der BR-Smads angehört. Erstens enthält EmSmadB eine L3 Loop Sequenz, die identisch mit der vom humanen Smad1 ist. Zweitens weist das *emsmadB*-Gen Exon-Intron-Grenzen auf, die genau an der entsprechenden Position wie bei den für das humane Smad1 kodierenden Genen liegen, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hinweist. Drittens wird EmSmadB spezifisch durch den BMP Typ I-Rezeptor (BR1a), nicht aber durch den TGF β Typ I Rezeptor (TRI) phosphoryliert. Zusammen mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse von *emsmadB* in verschiedenen Larvenstadien führen diese Ergebnisse zu der Vermutung, dass

EmSmadB an einem BMP-ähnlichen Signalübertragungsweg teilnimmt, welches die Entwicklungsvorgänge im Metazestoden, im Protoskolex und vermutlich auch in weiteren Larvenstadien von *E. multilocularis* reguliert.

Im Gegensatz zu EmSmadB wurden bei EmSmadA und EmSmadC mehrere einzigartige Eigenschaften beobachtet, von denen die herausstechendste war, dass EmSmadA und EmSmadC keine MH1-Domäne aufweisen, wohingegen die typischen R-Smads diese haben.

Ebenso wurde bei DAF14 ein Fehlen der MH1 Domäne nachgewiesen. DAF14 wurde als Smad Faktor in *C. elegans* identifiziert. In Sequenzanalogie zu anderen Säuger- Smad-Komponenten ist DAF14 eher den R-Smads zuzuordnen. Bislang fehlen jedoch biochemische Daten, um die Funktion von DAF14 und seine Klassifizierung genau festzulegen (Patterson & Padgett, 2000). Auch die Säuger-Faktoren Smad6 und Smad7 haben keine MH1-Domäne, doch gehören sie zur Subfamilien der I-Smads, welche an der negativen Regulierung der TGF β -Signalkaskade beteiligt sind (Itoh et al., 2000; Lutz & Knaus, 2002; Miyazawa et al., 2002). EmSmadA und EmSmadC hingegen sind eindeutig aufgrund des Aufweisens einer Phosphorylierungsstelle am C-terminalen Ende als Mitglied der Untergruppe der R-Smads zu identifizieren.

Eine weitere Besonderheit bei den *Echinococcus*-Smads EmSmadA und EmSmadC stellt die variierte Phosphorylierungsstelle dar. Bei den AR-Smads, zu denen EmSmadA und EmSmadC gehören, findet sich üblicherweise ein SSVS-Motiv in der Phosphorylierungsstelle. EmSmadA und EmSmadC jedoch weisen stattdessen ein TSVS-Motiv auf, ein Umstand, der schon bei SmSmad2, einem TGF β Smad in *S. mansoni*, beschrieben wurde (Beall et al., 2000; Osman et al., 2001).

Diese beiden ungewöhnlichen Strukturmerkmale bei EmSmadA und EmSmadC (fehlende MH1 Domäne und modifizierte Phosphorylierungsstelle) haben keinen negativen Einfluss auf deren Phosphorylierung durch TGF β -Rezeptoren, denn es konnte beobachtet werden, dass beide Smads von humanen Rezeptoren phosphoryliert werden konnten.

Welche Schlussfolgerungen könnte man aus dem Fehlen der MH1-Domäne bei EmSmadA und EmSmadC ziehen? Eine der Hauptfunktionen der MH1-Domäne besteht darin, dass es die direkte Bindung der R-Smads an die DNA vermittelt und Transkriptionsspezifität gewährleistet, was bedeutet, dass die verschiedenen R-Smads jeweils auf unterschiedliche Promoter-Strukturen wirken (Fortuno et al., 2001). Interessanterweise scheint es eine Ausnahme dieser Regel zu geben: das Säuger-Protein Smad2 weist eine inaktivierende Insertion im Bereich der MH1-Domäne auf. Somit bindet Smad2 im Gegensatz zu allen anderen bekannten R-Smads nicht mit seiner MH1-Domäne an die DNA. Auch die Transkriptionsspezifität wird offensichtlich bei Smad2 nicht durch die MH1-Domäne beeinflusst. Denn sowohl unter dem wild Typ-Faktor als auch unter einer Mutanten Smad2-Form, bei der man die inaktivierende Insertion in der MH1-Domäne entfernt hatte,

beobachtete man den gleichen Transkriptionseffekt (Fortuno et al., 2001). So könnte man EmSmadA und EmSmadC als die dem Smad2-Protein orthologen Faktoren sehen, bei denen die MH1-Domäne nicht nur durch eine Insertion inaktiviert wurde, sondern durch den kompletten Verlust keine Funktion mehr ausüben kann.

Die zweite Hauptfunktion der MH1-Domäne von Smad3, Smad4 und sogar von der modifizierten MH1-Domäne von Smad2 scheint in der Inhibierung der MH2-Domäne im Grundzustand der Proteine zu bestehen (Attisano & Wrana, 2000; ten Dijke et al., 2000). Folglich könnte die fehlende MH1-Domäne in EmSmadA und EmSmadC zu der Aufhebung der Autoinhibition führen. Diese Hypothese wird durch das Ergebnis des Yeast two hybrid-Experiments gestützt, bei dem EmSmadA ohne vorangegangene Aktivierung zur Homodimer-Bildung fähig war, wozu die typischen R-Smads eigentlich einer Aktivierung im SSXS-Motiv bedürfen. Also könnte EmSmadA im Ruhezustand schon in der homodimeren Form vorliegen.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten sprechen aber nicht dafür, dass EmSmadA in seinem homodimeren Grundzustand als konstitutiv aktives Smad funktionieren kann.

Zur Heterodimerbildung mit einem anderen Smad bedarf es der vorangegangenen Aktivierung des Smads durch eine Phosphorylierung im C-terminalen TSVS-Motiv. Auch in unseren Experimenten konnte keine Interaktion von EmSmadA in seinem Grundzustand mit einem anderen Smad beobachtet werden. Erst durch das Herbeiführen einer Mutation im TSVS-Motiv konnte eine konstitutiv aktive Form hergestellt werden, die eine Interaktion mit dem EmSmadB zeigte.

Ein zweites überraschendes Ergebnis war, dass EmSmadA funktionell mit einem humanen Typ I-Rezeptor sowohl des TGF β - als auch BMP-Signalübertragungssystems interagiert. Gemäß der Struktur seines L3-Loops als auch gemäß der Genstruktur von *emsmadA*, welche einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung mit dem Säuger-*smad2*-Gen vermuten lässt, kann EmSmadA in die Untergruppe der AR-Smads eingeteilt werden. In Einklang mit diesen strukturellen Eigenschaften steht die beobachtete Interaktion von EmSmadA mit dem humanen TGF β Typ I-Rezeptor. Die starke Interaktion zwischen EmSmadA und dem humanen BMP Rezeptor-System ist etwas Besonderes, denn in allen bislang untersuchten Fällen war es so, dass die Smads, welche aufgrund ihres L3-Loops der AR-Untergruppe zuzurechnen waren, selektiv mit Rezeptoren der Activin/TGF β -Familie interagierten (Chen et al., 1998; Lo et al., 1998; Persson et al., 1998).

Diese relaxierte Spezifität von EmSmadA kann nicht nur auf seiner atypischen Struktur beruhen. Denn bei EmSmadC, welches eine ähnliche atypische Struktur mit fehlender MH1 Domäne und modifizierter Phosphorylierungsstelle aufweist, fand sich unter der gleichen Konstellation wie bei EmSmadA mit BMP-Stimulierung des BRIa/BRII Komplexes keine Phosphorylierung.

Eine mögliche Erklärung für die unerwartete Interaktion zwischen EmSmadA und BRIa könnte man in dem Vorhandensein von einigen Aminosäuren-Austauschen im Bereich des EmSmadA L3-Loops sehen, die dann zu einer aufgeweichten Rezeptor-Spezifität dieses Faktors mit den humanen Rezeptoren führten. Zudem muss man sich vergegenwärtigen, dass es sich hier um Smad-Rezeptor-Interaktionen von zwei heterologen Systemen handelt, wo dem Parasiten eigene regulatorische Faktoren, welche für die Spezifität verantwortlich sein könnten, fehlen.

EmSmadC wurde aufgrund seines L3-Loops genau wie EmSmadA in die Untergruppe der AR-Smads eingeordnet. Ebenso wie bei EmSmadA weist das für EmSmadC kodierende Gen Exon-Intron-Grenzen auf, die genau an der entsprechenden Position wie bei dem für das humane Smad2 kodierende Gen liegen, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hinweist.

EmSmadC konnte spezifisch durch den TGF β Typ I Rezeptor phosphoryliert werden, nicht aber durch den BMP Typ I Rezeptor.

Eine andere interessante Beobachtung ist, dass EmSmadC auch durch die konstitutiv aktivierte Form von TRI (TRI-ka) nur bei Anwesenheit des TRII phosphoryliert werden konnte. TRI-ka alleine konnte EmSmadC nicht phosphorylieren.

Diese Resultate suggerieren, dass die Typ II Rezeptoren nicht nur die Aufgabe der Phosphorylierung/Aktivierung der Typ I-Rezeptoren haben. Denn dann müsste die konstitutiv aktivierte Form des Typ I Rezeptors per se eine Phosphorylierung des EmSmadC hervorrufen können. Vielmehr kann man vermuten, dass der Typ II-Rezeptor neben der Phosphorylierung/Aktivierung des Typ I-Rezeptors eine aktivere Rolle bei der Phosphorylierung der R-Smads haben muss.

Zusammenfassend wird aus diesen Daten ersichtlich, dass es in *E. multilocularis* sowohl ein BMP-Signaltransduktionssystem als auch ein TGF β -/Activin-ähnliches System geben muss. EmSmadB ist dabei spezifisch in das BMP- und EmSmadC spezifisch in das TGF β /Activin-Signaltransduktionssystem involviert. EmSmadA hingegen kann als zytoplasmatischer Signaltransduktor möglicherweise für beide Systeme fungieren.

5.3 *Echinococcus* TGF β aktivierte Kinase (TAK1)

Außer den Smad-Proteinen konnte bislang nur TAK1 als weiterer Faktor identifiziert werden, der die durch BMP produzierten Signale in Vertebraten weitervermittelt. TAK1 ist eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase, welche mit der MAP-Kinase-Kaskade kommuniziert. Die genaue Funktion von

TAK1 ist dabei noch nicht bekannt, aber es gibt mehrere Vermutungen. So wird diesem Faktor die Rolle als ein Vermittler beim Cross-Talk zwischen MAP-Kinase-Kaskade und TGF β -Kaskade zugeschrieben. Auch wird angenommen, dass TAK1 bei der Wahrnehmung von Stress-Signalen und bei der Kontrolle der Apoptose beteiligt ist (Kimura et al., 2000).

In yeast two hybrid – Experimenten konnte interessanterweise eine direkte Interaktion zwischen EmTAK1 und der aktivierten Form von EmSmadA (nicht aber mit der wildtypischen Form) festgestellt werden. In vorangegangenen Studien konnte schon eine Interaktion von humanem TAK1 mit inhibitorischen I-Smads nachgewiesen werden (Kimura et al., 2000). Vor kurzem wurde auch eine Interaktion bei den Säugern von R-Smads mit TAK1 beobachtet (Hoffmann et al, 2005), allerdings war diese Interaktion unabhängig von dem Phosphorylierungszustand.

Die Phosphorylierung der Smads durch die MAP Kinasen (ERK) führt zur Inaktivierung der Smads und somit zum Wegfall ihres inhibitorischen Einflusses auf das Zellwachstum. (Calonge & Massague, 1999; Kretzschmar et al., 1997, 1999).

Ob EmTAK1 das aktivierte EmSmadA phosphorylieren kann und ob es seine Aktivität hemmen oder steigern kann, gilt es noch näher zu prüfen.

Um genauer zu verstehen, welche Rolle die in *E. multilocularis* identifizierten Proteine EmTAK1, EmSmadA, EmSmadB und EmSmadC in der Entwicklung des Parasiten spielen und um ihre genauen biochemischen Eigenschaften aufzudecken, ist es erforderlich, die mit jedem Protein korrespondierenden TGF β -Rezeptoren zu untersuchen.

5.4 *Echinococcus multilocularis* TGF β Typ I Rezeptoren

In den bislang veröffentlichten Studien konnte herausgefunden werden, dass im TGF β Signalübertragungssystem zwei transmembrane Rezeptoren mit jeweils Ser/Thr-Kinase-Aktivität miteinander kooperieren müssen. Diese Rezeptoren werden als Typ I- und Typ II- Rezeptoren bezeichnet. Doch ist der Typ I-Rezeptor im Grundzustand katalytisch inaktiv, was auf eine GS-Region zurückzuführen ist, die im Bereich des aktiven Zentrums der Kinasedomäne eingelagert ist und somit das aktive Zentrum inhibiert (Huse et al., 1999). Die Typ II Rezeptoren weisen eine konstitutive Kinase-Aktivität auf. Sie können nach der Bindung des Liganden die Typ I-Rezeptoren im Bereich der GS-Box phosphorylieren. Das führt dann zu einer Restrukturierung des Typ I-Rezeptors, das aktive Zentrum der Kinasedomäne wird frei und eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen R-Smads, die das von TGF β produzierte Signal bis zum Zellkern weiterleiten, wird möglich (Massague 1998).

Die Rezeptoren der TGF β -Superfamilie lassen sich in drei Familien weiter einteilen. Man unterscheidet zwischen den Rezeptoren der TGF β -Familie, der Activin-Familie und der BMP-Familie, die jeweils TGF β -, Activin- oder BMP-Liganden binden.

In dieser Arbeit konnten drei verschiedene TGF β Ser/Thr-Kinase Rezeptoren in *E. multilocularis* identifiziert und charakterisiert werden: EmRSK1, EmRSK2 und EmRSK3, die alle zur Unterklasse der Typ I-Rezeptoren gehören. EmRSK1 weist dabei die höchste Homologie zu der BMP-, EmRSK2 zu der TGF β - und EmRSK3 zu der Activin-Untergruppe auf. Die Tatsache, dass alle drei Mitglieder der TGF β -Rezeptor-Superfamilie vertreten sind, suggeriert eine wichtige Rolle des TGF β Signalübertragungssystem in *E. multilocularis*.

Genauer eingegangen wurde in dieser Arbeit auf den EmRSK1-Rezeptor. Weil in *E. multilocularis* zunächst kein Typ II-Rezeptor identifiziert werden konnte, mussten die Funktionsuntersuchungen des EmRSK1 in einem heterologen System (mit HEK293T-Zellen) vorgenommen werden. Dabei wurden die humanen Liganden TGF β 1 und BMP2 eingesetzt. Im Wissen, dass es für die Aktivierung der Typ I-Rezeptoren aber eines Typ II-Rezeptors bedarf, wurden bei dieser Interaktionsanalyse die humanen BMP- bzw. TGF β - Typ II-Rezeptoren eingesetzt, nämlich BRII und TRII.

Als Ergebnis zeigte sich, dass EmRSK1 durch das humane BMP2 bei Anwesenheit des humanen BMP Typ II Rezeptors aktiviert werden konnte. Es konnte eine spezifische Phosphorylierung des BR-Smad EmSmadB bei dieser Konstellation beobachtet werden, nicht aber der AR-Smads EmSmadA und EmSmadC. Das humane TGF β 1 hingegen konnte unter den gleichen Versuchsbedingungen EmRSK1 nicht stimulieren. Aus diesem Experiment lassen sich zwei Rückschlüsse ziehen: zum einen wird deutlich, dass EmRSK1 am BMP-Signalübertragungssystem teilnimmt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass der *Echinococcus*-Rezeptor auch durch heterologe Wirtsfaktoren der BMP-Gruppe stimuliert werden konnte.

Dabei war aber die resultierende Phosphorylierung von EmSmadB auffällig schwächer ausgeprägt als man es bei der Phosphorylierung durch die humanen Rezeptoren-Komplexe beobachten konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Aktivierung des *Echinococcus*-Typ I Rezeptors aufgrund der hohen Konservierung des TGF β -Signalübertragungssystems zwar durch einen heterologen Typ II-Rezeptor möglich ist, nicht aber ganz optimal ablaufen kann und folglich die Phosphorylierungsaktivität des EmRSK1 geringer ausgeprägt ist, als man sie unter einer Aktivierung des Rezeptors durch einen bisher unbekanntem homologen *Echinococcus* Typ II-

Rezeptor sehen könnte. Diese Hypothese setzt also voraus, dass es auch in *Echinococcus* TGF β -Typ II Rezeptoren geben muss.

Um diesem genauer auf den Grund zu gehen, musste ein von einer heterologen Stimulierung und von einem Typ II Rezeptor unabhängiger EmRSK1 konstruiert werden, also eine konstitutiv aktivierte Form. Während in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass eine Q-D-Punktmutation im Bereich des GS-Domäne zu einer konstitutiven Aktivierung des Säuger Typ I-Rezeptors führte, erzielte man im Fall des EmRSK1 damit den gegenteiligen Effekt: Nach Einfügen dieser Mutation konnte keine Phosphorylierung des EmSmadB mehr beobachtet werden. Dieses Ergebnis ließ sich nicht durch die Anwesenheit der Typ II Rezeptoren BRII oder TRII beeinflussen. Auch die Zugabe der Liganden BMP2 oder TGF β 1 hatte keine Wirkung.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Q-D-Punktmutation bei EmRSK1 zu einer Strukturänderung des Rezeptors führt, die dann eine Inhibition der katalytischen Domäne der Kinase herbeiführt. Weiterhin wäre denkbar, dass diese Mutation die Interaktion mit dem Typ II-Rezeptor behindern könnte. Die möglicherweise durch die Q-D Mutation verursachte Strukturänderung des Rezeptors könnte auch für die ausbleibende EmSmad-EmRSK1ka-Interaktion in der YTH-Untersuchung verantwortlich sein.

Ein weiterer Grund für die schwache Phosphorylierung von EmSmadB, die hier durch EmRSK1 hervorgerufen wurde, könnte darin bestehen, dass EmRSK1 in dem heterologen System der HEK293-T-Zellen nicht adäquat an der Membran exprimiert wird. Denn die Sequenz von EmRSK1 enthält kein Signalpeptid und die molekularen Mechanismen, wie der Rezeptor an der Membran schließlich exprimiert wird, sind noch unbekannt. Im Fall von SmRK1, ein Typ I-Rezeptor in *S. mansoni*, welcher ebenfalls kein Signalpeptid aufweist, wurde ein alternativer Exportmechanismus vorgeschlagen (Davis & Pearce, 1999). Auch im Fall von *E. multilocularis* könnte solch eine Exportmechanismus bestehen, welcher aber in einem heterologen System, wie hier in den HEK293-T-Zellen, nicht optimal funktionieren könnte und somit also die Kinase-Aktivität des EmRSK1 wegen der inadäquaten Rezeptor-Expression an der Membran eingeschränkt ist.

Deshalb wurde die Konstruktion von Rezeptor-Chimären vorgenommen, bei denen der extrazelluläre, transmembrane und ein unterschiedlich langer Anteil der intrazellulären GS-Domäne des Rezeptors humanen Ursprungs war und der restliche intrazelluläre Teil von EmRSK1 stammte. Die Konstruktion der *Echinococcus* Rezeptor-Chimären wurde auf 3 wichtige Punkte ausgerichtet:

1. Eine EmRSK1-Chimäre, wo der extrazelluläre Teil des EmRSK1 durch den extrazellulären Teil eines homologen transmembranen BRIa Rezeptors ersetzt wurde, müsste das Signal Peptid und damit die nötige Information haben, um den Rezeptor an der Membran zu platzieren und zugleich eine ungehinderte Kinase-Aktivität des EmRSK1 aufweisen.
2. Eine Analyse über den Einfluss der GS-Domäne, die bei den Säuger Typ I-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Aktivierung spielt, in Zusammenspiel mit der Q-D Mutation auf die Aktivität des Rezeptoren sollte vorgenommen werden.
3. Es sollte herausgefunden werden, welcher Teil in der GS-Domäne für die Aktivierung des Rezeptors verantwortlich ist.

Insgesamt wurden drei Rezeptor-Chimären konstruiert, die sich durch Verteilung der jeweiligen Chimär-Anteile unterscheiden. QEmRSK1-ka wurde die Chimäre genannt, bei der der humane Anteil neben der Extrazellulär- und Transmembranregion nur die ersten 24 intrazellulären Aminosäuren umfasste, und folglich der EmRSK1-ka-Anteil fast die gesamte Intrazellulärdomäne inklusive der GS-Domäne, der Q-D-Mutation und natürlich der Ser/Thr-Kinase beinhaltete. Bei QEmRSK1-ka-SG, dem zweiten Konstrukt, reicht der humane Anteil des Rezeptors bis zur Mitte der ATP Bindungsdomäne, der folgende Teil stammt von EmRSK1. Im Fall von QEmRSK1-ka-FIA schließlich ist der humane Chimär-Anteil am längsten und reicht bis zum L45-Loop.

Die Experimente zeigten, dass QEmRSK1-ka EmSmadB nicht phosphorylieren konnte. Auch die Zugabe von BRII und/oder BMP2 hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der Rezeptorchimäre. Diese Chimäre weist im intrazellulären Abschnitt, der fast komplett durch EmRSK1 gebildet wird, die schon oben beschriebene Q-D Mutation auf. Schon in den vorangegangenen Experimenten mit den wildtypischen Rezeptoren hatte die Einfügung der Q-D Mutation im intrazellulären Bereich des EmRSK1 zu dessen Inaktivierung geführt, so dass dieses Ergebnis nicht überraschte. Nicht klar war jedoch, wie diese Inaktivierung genau hervorgerufen wurde.

Bei den beiden anderen Chimären jedoch konnte eine Aktivität anhand einer Phosphorylierung von EmSmadB nachgewiesen werden. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass nicht die Q-D-Mutation alleine, sondern nur im Beisein kompatibler Sequenzen der GS-Domäne (S₂₁₆-Y₂₄₅) zu einer konstitutiven Aktivierung führen kann.

Die Bedeutung der GS-Domäne bei den Ser/Thr-Kinasen, wozu die Typ I Rezeptoren der TGF β Superfamilie gehören, wurde schon in vorangegangenen Studien betont. So weiß man, dass eine

Phosphorylierung im Bereich der GS Box zu einer Aktivierung dieser Rezeptoren führt (Wrana et al., 1994a, b; Ventura et al., 1994). Weiterhin konnte herausgefunden werden, dass der Austausch bestimmter Aminosäuren in der GS-Domäne sowohl zu einem Funktionsverlust der Kinase-Aktivität als auch zu einer positiven Aktivierung führen kann (Wieser et al., 1995).

Beim Sequenzvergleich der GS-Box-Region zwischen BRIa, anderen Säuger Typ I-Rezeptoren und EmRSK1 wurde deutlich, dass sich bei EmRSK1 im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren keine Immunophilin FKBP12 Bindungsstelle findet. Bindet der Faktor FKBP12 an diese Stelle, so wird eine spontane Interaktion des Typ II mit dem Typ I-Rezeptors vermieden. Somit wird sichergestellt, dass nur nach Bindung eines Liganden eine Aktivierung des Typ I –Rezeptors durch den Typ II-Rezeptor stattfindet und die Signaltransduktionskaskade eingeleitet wird (Chang et al., 1996; Chen et al., 1997). In anderen Arbeiten konnte man feststellen, dass das Protein FKBP12 eine Rotamase Aktivität besitzt, also zu einer Strukturänderung des Bindungspartners führen kann (Harding et al., 1989). Auch die Q-D-Mutation im Bereich der intrazellulären Domäne könnte eine Strukturänderung des Rezeptors herbeiführen. Dann könnte man sich vorstellen, dass die durch die Q-D-Mutation verursachte Strukturänderung die durch die FKBP12-Bindung verursachte inaktivierende Strukturänderung wieder nivelliert, was in einer konstitutiven Aktivierung münden würde. Fehlt aber die FKBP12-Bindungsstelle, wie es bei EmRSK1 der Fall ist, so könnte die Q-D-Mutation ebenfalls zu einer Strukturänderung des Rezeptors führen, die aber aufgrund der fehlenden Strukturänderung durch FKBP12 letztendlich nicht zu einer Aktivierung des Rezeptors führen könnte. Im Umkehrschluss müsste dann das Einfügen einer FKBP12-Bindungsstelle die zur Aktivierung notwendige zusätzliche Strukturänderung ermöglichen. Um diesem nachzugehen wurde durch verschiedene Mutationen versucht, die FKBP12- Bindungsstelle zu imitieren.

Während der einzelne Austausch von K₁₄₆ gegen L im Bereich der GS-Box des *Echinococcus*-Rezeptors keine Aktivierung von EmRSK1ka bewirken konnte, führte der doppelte Austausch von K₁₄₆ (L) und F₁₄₈ (L) zu einer konstitutiven Aktivierung von EmRSK1ka. Hier war die dabei beobachtete Phosphorylierung von EmSmadB genauso ausgeprägt wie man sie beim Versuch mit der Rezeptorchimäre QEmRSK1-SGka beobachten konnte, deren gesamte GS-Domäne humanen Ursprungs war. Es konnte also nachgewiesen werden, dass spezifisch die beiden Leucin-Reste an den Stellen 146 und 148 eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des *Echinococcus* EmRSK1 Rezeptors im Zusammenspiel mit der Q-D Mutation haben.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Einführung der Q-D-Mutation in der GS-Box beim *Echinococcus*-Rezeptor EmRSK1-ka im Gegensatz zu den humanen Typ I-Rezeptoren zu keiner konstitutiven Aktivierung führte. Diese konnte erst durch Konstruktion einer Rezeptorchimäre erreicht werden, bei der der humane Anteil der Chimäre die FKBP12-

Bindungsstelle (LPLL) und Q-D-Mutation umfasste. Die Beteiligung der FKBP12-Bindungsstelle bei der konstitutiven Aktivierung durch die Q-D-Mutation konnte dabei durch die Tatsache belegt werden, dass der die Q-D-Mutation tragende Echinococcus-Rezeptor EmRSK1-ka durch Einfügen von die FKBP12-Bindungsstelle imitierenden Mutationen aktiviert werden konnte.

Hervorzuheben ist zudem die schon bei den Versuchen mit den wildtypischen Rezeptoren gemachte Beobachtung, dass eine Phosphorylierung von EmSmadB nur erfolgt, wenn man zu dem konstitutiv aktivierten Typ I Rezeptor einen Typ II Rezeptor hinzu gibt. Dies unterstützt nochmals die oben beschriebene Hypothese, dass die Smad-Proteine des *Echinococcus* nicht allein durch einen aktivierten Typ I-Rezeptor phosphoryliert werden können (wie es bei den humanen Smad-Proteinen ist), sondern zugleich der Anwesenheit des Typ II-Rezeptor bedürfen. Welchen Einfluss genau der Typ II-Rezeptor auf die Phosphorylierung hat, muss in kommenden Studien noch genauer beleuchtet werden.

5.4.1 Der Leucin-Zipper in den *Echinococcus* Ser/Thr Kinasen

Unter Leucin-Zippeln versteht man eine charakteristische Anordnung von Aminosäuren, wobei mindestens vier Leucin-Reste mit jeweils sechs dazwischen liegenden, nicht spezifischen Aminosäuren, hintereinander angeordnet sind.

Grundsätzlich kann man sagen, dass jeweils zwei Leucin-Zipper miteinander eine Bindung eingehen können und somit verschiedene Protein-Interaktionen ermöglichen (Surks et al., 1999). So konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Leucin-Zipper die Transkriptionsfaktoren eine Homodimer- oder Heterodimerbildung eingehen können (Turner & Tjian, 1989). Auch ermöglichen sie die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA (Landschulz et al., 1988).

Interessanterweise fand sich auch im EmRSK1-Rezeptor ein Motiv mit vier Leucin-Resten und einem Isoleucin-Rest, wobei jeweils sechs variable Aminosäuren dazwischen lagen, so dass man hier einen Leucin-Zipper vermuten muss. Bereits zuvor wurde gezeigt, dass Leucine in Zippeln funktionell durch Isoleucin ersetzt werden können (Leung & Lassam, 1998). Diese Beobachtung ist interessant, denn bislang wurden in den TGF β -Rezeptoren keine Leucin-Zipper beschrieben.

Auch in zwei weiteren *Echinococcus* Proteinen, die beim TGF β Signaltransduktionssystem teilnehmen, nämlich in EmRSK2 und EmTAK1, konnten solche Leucin-Zipper-Motive nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt sollte nun der mögliche Einfluss des Leucin-Zippers auf die EmRSK1-ka Aktivität herausgefunden werden. Dazu wurde eine Mutante des Rezeptors konstruiert, bei der die letzten 169 Carboxy-terminalen Aminosäuren entfernt wurden, die auch den Leucin-Zipper beinhalten. Diese Mutante wies auch die oben beschriebene Q-D-Mutation im Bereich der GS-Domäne auf. Es zeigte sich, dass die Entfernung der letzten 169 Carboxy-terminalen Aminosäuren zu einer konstitutiven Aktivierung des EmRSK1-ka-Rezeptors führte, allerdings wurde die Phosphorylierungsaktivität des EmRSK1-ka-Rezeptors nach der Zugabe von BMP2 deutlich gesteigert.

Man weiß, dass es bei den Signalübertragungskaskaden je nach einwirkendem Stimulus zur Bildung von unterschiedlichen Multienzymkomplexen kommt, die abhängig von der jeweiligen Zusammensetzung eine positiv oder negativ regulierende Wirkung auf die Signaltransduktionskaskade haben (Hunter, 1995).

Marx et al. fanden heraus, dass die Leucin-Zipper eine wichtige regulierende Rolle in solchen Multienzymkomplexen beim Ryanodin Rezeptor haben (Marx et al., 2001), einem wichtigen Rezeptor zur Regulierung des Calcium-Haushaltes in Muskelzellen. Genauere molekulare Einsichten lieferten Marks et al.: Die Leucin-Zipper im Ryanodin-Rezeptor gehen mit Leucin-Zippern spezifischer Proteine eine Bindung ein. Diese Proteine wiederum sind an Enzyme mit Phosphatase- oder Kinase-Aktivität gekoppelt. Handelt es sich um eine Phosphatase, so resultiert daraus eine Dephosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors und somit eine Negativregulierung. Umgekehrt führt die indirekte Bindung der Kinase zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung des Rezeptors (Marks et al., 2002).

Man könnte vermuten, dass der EmRSK1-Rezeptor im Grundzustand eine Konformation aufweist, wo das Carboxy-terminale Ende mittels des Leucin-Zippers über ein noch nicht bekanntes Kopplungs-Protein an die GS-Domäne bindet und somit eine Aktivierung derselben unmöglich macht. Eine Entfernung des Carboxy-terminalen Endes würde dann zu einer wieder zugänglichen GS-Domäne führen und eine Aktivierung des Rezeptors ermöglichen. Dies könnte dann das vorliegende Versuchsergebnis erklären. Zum anderen wäre aber auch denkbar, dass der Leucin-Zipper in EmRSK1, ähnlich wie beim Ryanodin-Rezeptor beobachtet (Marx et al., 2001), indirekt über ein Kopplungsprotein mit einer Phosphatase bindet, die dann den EmRSK1-Rezeptor inaktiviert. Dann würde ebenfalls die Entfernung des Leucin-Zippers zu einer Aufhebung der Dephosphorylierung führen und eine Aktivierung ermöglichen.

Zusammenfassend konnte man also eine Kinase Aktivität des EmRSK1 nachweisen und verschiedene Mechanismen, welche die Kinase Aktivität beeinflussen, aufdecken. Allerdings war die durch den EmRSK1-Rezeptor hervorgerufene Phosphorylierung von EmSmadB nicht so stark ausgeprägt, wie sie durch den humanen Rezeptoren-Komplex produziert wurde. Dabei stellte sich die Frage, ob die schwache Phosphorylierung letztendlich ausreichend ist, um eine Gentranskription zu bewirken.

Um diese Frage zu beantworten, wurden verschiedene Luciferase Assays in HEK293-T- Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass im Versuchsansatz mit QEmRSK1-ka-SG eine Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Somit mussten also die humanen endogenen R-Smads durch QEmRSK1-ka-SG aktiviert worden sein und die aktivierten R-Smads dann nach der Oligomerisierung mit endogenen Co-Smads zum Zellkern gewandert sein, so dass sie an der Bildung des Transkriptionsapparates für die Regulierung der Zielgene teilnahmen. Interessanterweise konnte QEmRSK1-ka-SG das Reporterogen sogar besser induzieren als man es im Versuchsansatz mit dem homologen humanen BR1a-ka-Rezeptor beobachten konnte. Diese Ergebnisse lassen also schlussfolgern, dass die Transkriptionsaktivität der Smad-Proteine nicht proportional zu ihrem Phosphorylierungsgrad ist.

Auch in den Luciferase-Experimenten konnte nur eine Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden, wenn zusätzlich neben dem konstitutiv aktivierten Typ I-Rezeptor ein Typ II-Rezeptor vorhanden war. Wenn die Kinase-Aktivität des Typ II-Rezeptors durch die von Wieser et al. beschriebene Mutation aufgehoben wurde (Wieser et al., 1995), so konnte man interessanterweise dennoch eine resultierende (wenn auch schwächer ausgeprägte) Transkriptionsaktivität des Rezeptor-Komplexes nachweisen. Diese Beobachtung macht deutlich, dass es nicht die Kinase-Aktivität des Typ II-Rezeptors ist, die eine Aktivierung der Smads ermöglicht. Vielmehr wird die schon oben gemachte Vermutung unterstützt, dass der Typ II-Rezeptor neben Funktion der Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors auch auf bislang unbekannte Weise einen direkten Einfluss auf die Aktivierung der Smad-Proteine hat.

5.5 Wachstumsfaktor der Bone Morphogenetic Protein (BMP) Familie in *E. multilocularis*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in *E. multilocularis* TGF β -Signalübertragungssysteme gibt, die durch vom Wirt stammende BMP-Liganden und wahrscheinlich auch TGF β - und/oder Activin-Liganden stimuliert werden können. Es stellte sich als nächstes die Frage, ob *E. multilocularis* solche Wachstumsfaktoren auch selbst produzieren

könne. Tatsächlich konnte im Parasitenmaterial das Gen *embmp* identifiziert werden. Das hierdurch kodierte Protein EmBMP zeigt hohe Homologie zu den Zytokinen der BMP Familie.

Es wurden 3 Spleißvarianten identifiziert, von denen zwei eine putative Signalpeptidsequenz aufweisen. Bei den Spleißvarianten mit Signalpeptid könnte nach Transport aus der Zelle EmBMP zum einen über Bindung an Parasiten-Rezeptoren für die Autorregulierung des Parasitenwachstums eine Rolle spielen, zum anderen aber auch über Bindung an einen Wirts-BMP-Rezeptor einen Einfluss auf die Produktion von wirtseigenen Wachstumsfaktoren haben. Diese könnte der Parasit dann für sein eigenes Wachstum/Differenzierung ausnutzen. Besonders interessant ist auch die Vorstellung eines möglichen Einflusses von EmBMP auf die Differenzierung der wirtseigenen Immunzellen und somit auf den Verlauf der Infektion.

Bezüglich der Spleißvariante ohne Signalpeptid kann man sich verschiedene Möglichkeiten vorstellen. Zum einen könnte es sein, dass diese Isoform aufgrund des fehlenden Signalpeptids die Zelle nicht verlassen kann. Zum anderen könnte diese Spleißvariante die Zelle über einen alternativen Transportmechanismus verlassen. Solch ein alternativer Transportmechanismus wurde schon bei *S. mansoni* vorgeschlagen, weil trotz fehlenden Signalpeptids der Rezeptor SmRK1 an der Membran lokalisiert ist. (Davis & Pearce, 1999).

In vorangegangenen Studien konnten interessante Ergebnisse über die Funktion von BMP-Molekülen bezüglich der Entwicklung von Helminthen geliefert werden. Dabei wurde insbesondere der Faktor Daf-7, ein BMP-ähnlicher Faktor, in *C. elegans* untersucht.

C. elegans weist bestimmte chemosensoriale Neurone (ASI) auf, die ihm zur Wahrnehmung seiner Umgebung dienen. Diese Neurone können auch bei geeignetem Umgebungsmilieu den Faktor Daf-7 produzieren. Daf-7 bindet dann an zwei Ser/Thr-Kinase-Rezeptoren (Daf-4 und Daf-1). Dadurch wird der Entwicklungsschritt zum nächsten Larvenstadium beim Parasiten eingeleitet. Findet sich bei nicht optimalen Umgebungsbedingungen keine Produktion von Daf-7, so bleibt der Nematode in seinem aktuellen Entwicklungsstadium verharren (Riddle & Albert, 1997; Padgett et al., 1998).

In einer *in vitro* Analyse wiederum konnte gezeigt werden, dass TGF β einen Einfluss auf die Entwicklung der L3 Larvenstadien von *Ancylostoma caninum* hat (Arasu, 2001).

Die Tatsache, dass das menschliche Immunsystem nicht im Stande ist, Infektionen durch Helminthen und insbesondere hier durch *E. multilocularis* suffizient abzuwehren, lässt die Vermutung aufkeimen, dass die Parasiten über bestimmte Mechanismen verfügen, welche auf das humane Immunsystem einen regulativen Einfluss haben. Dass dieser Einfluss vornehmlich über sekretierte Faktoren von Helminthen ausgeübt wird, konnte bislang in erster Linie für parasitäre Nematoden und den Trematoden *S. mansoni* gezeigt werden (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003; Pearce & McDonald, 2002). Für die Larvenstadien der Zestoden, die sich in engem Kontakt mit

diversen Organsystemen des Wirts entwickeln, ist in dieser Hinsicht bislang jedoch noch nichts bekannt.

Für die Faktoren der TGF β Superfamilie konnte ein antiinflammatorischer Effekt auf das Säuger-Immunsystem nachgewiesen werden (Wahl et al., 1989). Bei Autoimmun-Erkrankungen wiederum konnte eine Herunterregulierung der TGF β -Faktoren nachgewiesen werden (Miller et al., 1992; Chen et al., 1994). Auch konnte in *in vitro* - Experimenten gezeigt werden, dass die TGF β -Faktoren einen hemmenden Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung haben.

Es konnte gezeigt werden, dass von der Fruchtfliege *Drosophila* stammende BMP humane BMP-Rezeptoren stimulieren konnte (Sampath et al., 1993) Da EmBMP eine hohe Homologie sowohl zu den humanen als auch *Drosophila*-BMP-Molekülen aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass auch EmBMP humane BMP-Rezeptoren stimulieren könnte. Eine für die Pathogenese der Echinokokkose sehr interessante Fragestellung wäre deshalb, ob EmBMP über die Interaktion mit den humanen Rezeptoren das menschliche Immunsystem beeinflussen kann.

Hierzu müsste zunächst beantwortet werden, ob EmBMP vom Parasiten nach außen (also Richtung Wirtsgewebe) sezerniert wird und ob EmBMP in der Lage ist, Säuger-Rezeptoren der TGF β -Familie zu aktivieren. Die Voraussetzungen zur Beantwortung dieser Fragen wurden in dieser Arbeit mit der erstmaligen Charakterisierung vom EmBMP geschaffen.

5.6 Die wichtige Frage nach einem TGF β Typ II Rezeptor aus *E. multilocularis*

Lange wurde vermutet, dass es bei den Plathelminthen keinen Typ II Rezeptor der TGF β -Rezeptor-Familie gäbe. Neuere Daten jedoch widersprechen dieser Annahme. Forrester et al. konnten in *S. mansoni* einen TGF β Typ II Rezeptor identifizieren (Forrester et al., 2004). Tatsächlich konnte nach intensiver Suche in unserem Labor mittels degenerativer PCR auch in *E. multilocularis* ein TGF β Typ II Rezeptor identifiziert werden, der eine hohe Homologie zu den Activin-Rezeptoren aufweist (K. Brehm, persönliche Mitteilung). In *C. elegans* wurde neben den zwei Typ I-Rezeptoren SMA-6 und DAF-1 nur ein einziger Typ II-Rezeptor gefunden (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Die Typ I-Rezeptoren sind hierbei unterschiedlichen Unterfamilien zugehörig. Dennoch konnten sie beide durch den Typ II-Rezeptor aktiviert werden und jeweils unterschiedliche Effekte hervorrufen. In Anbetracht der Tatsache, dass in *E. multilocularis* drei verschiedene Typ I-Rezeptoren identifiziert wurden, stellt sich die Frage, ob der neu identifizierte Typ II-Rezeptor mit allen drei Typ I-Rezeptoren interagiert oder ob es noch weitere Typ II-Rezeptoren gibt. Dazu müssten noch weitere Studien folgen.

5.7 *Echinococcus* Smads und humane Rezeptoren

Weil die Sequenz des neu identifizierten *Echinococcus* Typ II-Rezeptors noch nicht komplett vorliegt, konnten in dieser Arbeit keine Interaktionsanalysen mit diesem Rezeptor durchgeführt werden. Aus den schon vorliegenden Sequenzen geht aber hervor, dass dieser Typ II-Rezeptor in die Untergruppe der Activin-Rezeptoren eingeordnet werden kann. Wie schon bei *C. elegans* stellt sich auch hier die Frage, ob der eine identifizierte *Echinococcus* Typ II-Rezeptor mit allen der drei identifizierten *Echinococcus* Typ I-Rezeptoren interagieren kann. Um dieser Frage nachzugehen, wurde zuerst untersucht, ob ein humaner Activin-Typ II-Rezeptor (ActRIIb) gemeinsam mit unterschiedlichen humanen Typ I-Rezeptoren eine Phosphorylierung bei den *Echinococcus*-Smads hervorrufen könne.

Bei Säugerzellen verwenden die Activin- und TGF β Rezeptoren die gleiche AR-Smad Gruppe um das Signal weiter zu leiten. Der humane Typ I-Rezeptor Alk5 gehört zur Untergruppe der TGF β -Rezeptoren. Er weist eine über 90%-ige Homologie im Bereich der Kinasedomäne mit Alk4 auf, der ein Activin-Typ I-Rezeptor ist. Angesichts dieser hohen Homologie war es nicht überraschend, dass der TGF β -Typ I- Rezeptor Alk5 einen funktionellen Komplex mit dem Activin-Typ II Rezeptor ActRIIb bilden konnte, der eine Phosphorylierung von dem AR-Smad EmSmadC bewirkte.

Zwischen den intrazellulären Teilen von den humanen Typ II Rezeptoren der BMP-Unterfamilie und der Activin-Unterfamilie findet sich eine geringere Homologie (ca. 40%). Dennoch konnte auch der humane BMP-Typ I-Rezeptor Alk3 in Anwesenheit von ActRIIb eine Phosphorylierung von Echinokokken-Smads hervorrufen. Damit konnte also gezeigt werden, dass der humane Activin-Typ II-Rezeptor sowohl mit dem humanen TGF β -Typ I-Rezeptor als auch mit dem humanen BMP-Typ I-Rezeptor kooperieren kann.

Bislang wurde angenommen, dass der Typ I-Rezeptor dafür verantwortlich ist, dass die Signale spezifisch an die Smads der jeweilig zugehörenden Untergruppe weitergeleitet werden. D.h. also, dass die zur BMP-Untergruppe gehörenden Typ I-Rezeptoren ihre Signale nur an BR-Smads weitergeben, wohingegen die zur TGF β - und Activin-Untergruppe gehörenden Typ I-Rezeptoren nur mit den AR-Smads interagieren. In dieser Arbeit kam es jedoch zu dem interessanten Ergebnis, dass der humane BMP-Typ I-Rezeptor in Anwesenheit von ActRIIb nicht nur das BR-Smad EmSmadB phosphorylierte, sondern auch EmSmadA und EmSmadC, die in die Untergruppe der AR-Smads eingeordnet werden. Im Fall von EmSmadA konnte in oben beschriebenen Experimenten gezeigt werden, dass dieses durch den Komplex von BRIa-ka und BRII-Rezeptoren phosphoryliert werden konnte, obwohl es kein BR-Smad ist. Dies könnte man sich durch andere Regionen neben dem L3-Loop erklären, die für die Interaktion mit dem Rezeptor verantwortlich

sind. Die Ergebnisse mit dem ActRIIb-Rezeptor bestätigen, dass eine Interaktion zwischen BRIa-ka-Rezeptor und EmSmadA möglich ist. Bei EmSmadC hingegen war im Versuch mit dem BRIa-ka- und BRII-Rezeptor-Komplex keine Phosphorylierung beobachtet worden, wohingegen im Versuch mit dem BRIa-ka- und ActRIIb-Rezeptorkomplex nun eine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Also muss man annehmen, dass hier die Interaktionsspezifität von BRIa-ka mit den R-Smads durch die Anwesenheit des ActRIIb-Rezeptors beeinflusst wurde.

5.7.1 Das L₂₂₂PLL Motiv im humanen BRIa-ka

Bei dem Echinokokken-Rezeptor EmRSK1-ka konnte wie oben beschrieben eine Aktivierung nur durch das Einfügen zweier Austauschmutationen herbeigeführt werden, die zu einer Imitation der humanen FKBP12-Bindungsstelle führten. Nun interessierte im Umkehrschluss, ob eine Veränderung der humanen FKBP12-Bindungsstelle zu einer Beeinträchtigung der konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führe. Dazu wurde im BRIa-ka-Rezeptor eine Austauschmutation L₂₂₂-K durchgeführt, die das korrespondierende Motiv des EmRSK1-ka-Rezeptors nachahmte. Tatsächlich konnte der so mutierte BRIa-ka-Rezeptor keine Phosphorylierung der Echinokokken-Smads mehr hervorrufen. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass dieser Rezeptor weiterhin das humane Smad1 phosphorylieren konnte. D.h. also, dass die Phosphorylierungsaktivität der Kinasedomäne je nach Phosphorylierungssubstrat variieren kann.

Abschließend lässt sich festhalten, dass mit dieser Arbeit die ersten Grundsteine zum Verständnis der TGFβ-Signaltransduktionskaskade in *E. multilocularis* gelegt wurden. Es zeigte sich, dass in diesem Parasiten sowohl die TGFβ-, BMP- als auch Activin-Signalübertragungswege vertreten sind. EmBMP, EmRSK1 und EmSmadB nehmen an der BMP-Kaskade teil, wobei EmTAK1 einen cross talk mit der MAP-Kinase-Kaskade ermöglichen könnte. EmRSK2, EmSmadA und/oder EmSmadC sind der TGFβ-Signaltransduktion zuzuordnen. EmRSK3 ist mit EmSmadA und/oder EmSmadC am Activin-Signalübertragungsweg beteiligt. Basierend auf diese Arbeit sollten in künftigen Studien weitere TGFβ-Komponenten identifiziert (TGFβ- und Activin-Liganden, weitere Typ II Rezeptoren, I- und Co-Smads) werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Aufdeckung der Funktion des erst vor kurzem in *E. multilocularis* identifizierten Typ II Rezeptors: Welcher Typ I Rezeptor ist Interaktionspartner? Interagiert er mit mehreren Typ I Rezeptoren oder gibt es weitere für den jeweiligen Typ I Rezeptor spezifischen Typ II Rezeptoren? Welche Smads sind Phosphorylierungssubstrat dieses Komplexes?

Zudem muss festgehalten werden, dass in dieser Arbeit bislang unbekannte Mechanismen in der TGFβ-Signaltransduktion aufgedeckt wurden, die auch neue Einblicke z.B. im Signaltransduktionssystem von Säugern ermöglichen könnten.

6.1 Zusammenfassung

Die molekularen Mechanismen der Wirt-Parasit-Interaktion bei der durch den Zestoden *Echinococcus multilocularis* ausgelösten Erkrankung der alveolären Echinokokkose sind bislang ungeklärt. Zudem liegen keine Daten über Entwicklungs- und Differenzierungsmechanismen dieses Parasiten vor, die für die Entwicklung neuer Antiparasitika genutzt werden könnten.

Ein bei der Evolution der Metazoen bereits frühzeitig entstandener Signaltransduktionsmechanismus zur Steuerung von Entwicklungsvorgängen ist das TGF β /BMP-System, das aus strukturell verwandten Zytokinen der TGF β (transforming growth factor β) bzw. BMP (bone morphogenetic protein)-Familie, oberflächenständigen Rezeptoren der TGF β -Rezeptorfamilie (Typ I und Typ II) und intrazellulären Signaltransduktoren der Smad-Familie besteht. Außer an Entwicklungsvorgängen tierischer Organismen könnte diesem System eine wichtige Rolle bei der Wirt-Helminth-Kommunikation während Infektionsprozessen zukommen, wie in vorherigen Studien am Nematoden *Brugia malayi* und am Trematoden *Schistosoma mansoni* gezeigt werden konnte.

Erste, wichtige Schritte zur Charakterisierung von TGF β und BMP-Signalsystemen in Zestoden wurden in der vorliegenden Arbeit getan. Aufbauend auf einem vorherigen Bericht zu einem Transmembranrezeptor (EmRSK1) und einem Smad-Homologen (EmSmadA) aus *Echinococcus multilocularis* wurde die Liste der TGF β /BMP Signaltransduktionsfaktoren in *E. multilocularis* in dieser Arbeit deutlich erweitert und erstmals umfangreiche funktionelle Studien durchgeführt. Die hier charakterisierten Faktoren umfassen zwei weitere Serin/Threonin-Kinasen der TGF β /BMP-Rezeptorfamilie (EmRSK2, EmRSK3) sowie intrazelluläre Transduktoren der R-Smad-Subfamilie (EmSmadB, EmSmadC) und ein Homologes zur MAP-kinase-kinase-kinase TAK1 (TGF β activated kinase 1), genannt EmTAK1. Zudem konnte erstmals für einen parasitären Helminthen ein Zytokin der BMP-Subfamilie, EmBMP, auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen legen nahe, dass *E. multilocularis* sowohl ein TGF β wie auch ein BMP-Signalsystem exprimiert. Ersteres wird sehr wahrscheinlich durch die Kinase EmRSK2 und den Smad-Faktor EmSmadC gebildet, letzteres durch EmRSK1 und EmSmadB. EmSmadA nimmt eine Sonderstellung ein, da es sowohl durch TGF β - wie auch durch BMP-Rezeptoren aktiviert werden kann. Die genaue Rolle von EmRSK1 und EmTAK1 wäre durch weitere Untersuchungen zu klären.

Signifikante funktionelle Homologien zwischen den TGF β /BMP-Signalsystemen des Parasiten und Säugern konnten nachgewiesen werden, die sich u.a. darin äußern, dass die *Echinococcus* Smad-

Proteine durch entsprechende Rezeptoren des Menschen aktiviert werden können. Darüber hinaus konnten jedoch auch einige deutliche Unterschiede zwischen den Systemen aus Parasit und Wirt nachgewiesen werden, die sich als Angriffspunkte zur Entwicklung von Chemotherapeutika eignen könnten. So fehlt den Smad-Faktoren EmSmadA und EmSmadC eine MH1-Domäne, die sonst unter allen R-Smads hoch konserviert ist. Zudem sind einige bislang noch nie beschriebene, strukturelle Besonderheiten der *Echinococcus* TGF β /BMP-Rezeptoren zu verzeichnen. Auch die Regulation dieser Faktoren und die Kreuz-Interaktion mit weiteren intrazellulären Signalwegen (z.B. der MAP Kinase Kaskade) scheint in *E. multilocularis* anders zu verlaufen als bislang für Vertebraten, Insekten oder Nematoden beschrieben. Schließlich konnte, als sehr wichtiger Befund, auch nachgewiesen werden dass mindestens ein Rezeptor des Parasiten, EmRSK1, mit einem Zytokin des Wirts (BMP2) *in vitro* funktionell interagiert. Da BMP2 in Zellkultursystemen, die das Wachstum des Parasiten am befallenen Wirtsorgan nachstellen, einen deutlichen Effekt auf *E. multilocularis* ausübt, könnte die hier beschriebene EmRSK1/BMP2 – Interaktion von entscheidender Bedeutung für die Wirt-Parasit-Interaktion bei der alveolären Echinokokkose sein.

6.2 Summary

Up to now, the molecular mechanisms of the interactions between host and parasite in the disease of alveolar echinococcosis, caused by the cestode *Echinococcus multilocularis*, are not understood. Furthermore there are not data available about the mechanisms of development and differentiation in this parasite that could be used for the design of novel antiinfectives.

One of the signaling systems which emerged very early in metazoan evolution and which presumably controls developmental processes in all animals is the TGF β signal transduction system. This system consists of various factors: structurally related cytokines of the TGF β (transforming growth factor β) and the BMP (bone morphogenetic protein) family, surface associated receptors of the TGF β receptor family (type I and type II) and intracellular signal transduction factors of the Smad family. In addition to their crucial role in animal development, TGF β /BMP systems could also play an important role in the communication between host and helminths during an infection, as has been shown previous studies on the nematode *Brugia malayi* and the trematode *Schistosoma mansoni*.

In this study, the initial steps towards a characterization of TGF β /BMP signaling in the third large group of parasitic helminths, the cestodes, have been made. Adding to a previous report on a transmembrane receptor (EmRSK1) and a Smad homologue (EmSmadA) from *E. multilocularis*, this work significantly extends the list of known TGF β /BMP signaling factors from *Echinococcus* and provides, for the first time, functional studies on these systems. The newly characterized factors comprise two further serin/threonin kinases of the TGF β /BMP receptor family (EmRSK2, EmRSK3), two further intracellular transducing factors belonging to the subfamily of R-smads (EmSmadB, EmSmadC) and one homologue of the MAP-kinase-kinase-kinase TAK1 (TGF β activated kinase 1), which was designated EmTAK1. Furthermore, and for the first time in a parasitic helminth, a cytokine of the BMP subfamily was characterized on the molecular level. Structural and functional studies suggested that *E. multilocularis* expresses both a TGF β and a BMP signaling system. The kinase EmRSK2 and the Smad factor EmSmadC are most probably components of the first, EmRSK1 and EmSmadB parts of the latter system. Surprisingly, EmSmadA seems to constitute an unusual Smad since it can be activated by both TGF β and the BMP receptors upon expression in mammalian cells. The precise roles of EmRSK3 and EmTAK1 have to be determined in future studies.

In the present work, significant structural and functional homologies between the TGF β /BMP systems of *E. multilocularis* and its mammalian hosts have been detected. Upon expression in

human cells, the *Echinococcus* Smad proteins were, for example, able to functionally interact with the corresponding receptors from *Homo sapiens*. On the other hand, the *E. multilocularis* TGF β /BMP signaling factors also displayed several biochemical differences to those of the host, which could be exploited for the development of antiparasitic drugs. One of these differences is the lack of a usually conserved MH1 domain in EmSmadA and EmSmadC. Moreover, the *Echinococcus* TGF β /BMP receptors display several structural features which have not yet been detected in other members of the protein superfamily. Likewise, the regulation of TGF β /BMP pathways in *Echinococcus* as well as their cross-interaction with other signaling pathways (e.g. the MAP kinase cascade) seems to differ from the situation in vertebrates, insects and nematodes. Finally, this work also provides evidence that at least one host cytokine, BMP-2, can functionally interact with a receptor of the parasite, EmRSK1. This interaction could be highly relevant for host-parasite interaction mechanisms in alveolar echinococcosis since BMP-2 also exerts clear effects on *Echinococcus* growth and differentiation in an *in vitro* cultivation system that mimicks the situation at the affected organ during an infection.

7 Literaturverzeichnis

Abdollah, S., Macias-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1997). TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* 272, 27678-27685.

Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y., and Matsumoto, K. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol Cell Biol* 19, 2322-2329.

Arasu, P. (2001). In vitro reactivation of *Ancylostoma caninum* tissue-arrested third-stage larvae by transforming growth factor-beta. *J Parasitol* 87, 733-738.

Atfi, A., Djelloul, S., Chastre, E., Davis, R., and Gespach, C. (1997). Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J Biol Chem* 272, 1429-1432.

Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F. M., Massague, J., and Wrana, J. L. (1993). Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75, 671-680.

Attisano, L., and Wrana, J. L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296, 1646-1647.

Beall, M. J., McGonigle, S., and Pearce, E. J. (2000). Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF-beta signaling. *Mol Biochem Parasitol* 111, 131-142.

Beall, M. J., and Pearce, E. J. (2001). Human transforming growth factor-beta activates a receptor serine/threonine kinase from the intravascular parasite *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 276, 31613-31619.

Blumer, K. J., and Johnson, G. L. (1994). Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem Sci* 19, 236-240.

Blumer, K. J., Johnson, G. L., and Lange-Carter, C. A. (1994). Mammalian mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK) can function in a yeast mitogen-activated protein kinase pathway downstream of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4925-4929.

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

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

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

- Brummel, T. J., Twombly, V., Marques, G., Wrana, J. L., Newfeld, S. J., Attisano, L., Massague, J., O'Connor, M. B., and Gelbart, W. M. (1994). Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in *Drosophila*. *Cell* 78, 251-261.
- Calonge, M. J., and Massague, J. (1999). Smad4/DPC4 silencing and hyperactive Ras jointly disrupt transforming growth factor-beta antiproliferative responses in colon cancer cells. *J Biol Chem* 274, 33637-33643.
- Carcamo, J., Weis, F. M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J. L., Attisano, L., and Massague, J. (1994). Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 14, 3810-3821.
- Carcamo, J., Zentella, A., and Massague, J. (1995). Disruption of transforming growth factor beta signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol Cell Biol* 15, 1573-1581.
- Celeste, A. J., Iannazzi, J. A., Taylor, R. C., Hewick, R. M., Rosen, V., Wang, E. A., and Wozney, J. M. (1990). Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9843-9847.
- Chacko, B. M., Qin, B., Correia, J. J., Lam, S. S., de Caestecker, M. P., and Lin, K. (2001). The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat Struct Biol* 8, 248-253.
- Chang, M. J., Kinnunen, P., Hawker, J., Brand, T., and Schneider, M. D. (1996). FKBP-12 recognition is dispensable for signal generation by type I transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 271, 22941-22944.
- Chen, Y. G., Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., and Massague, J. (1998). Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 12, 2144-2152.
- Chen, Y. G., Liu, F., and Massague, J. (1997). Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *Embo J* 16, 3866-3876.
- Chen, Y. G., and Massague, J. (1999). Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem* 274, 3672-3677.
- Craig, P. (2003). *Echinococcus multilocularis*. *Curr Opin Infect Dis* 16, 437-444.
- Craig, P. S., Rogan, M. T., and Campos-Ponce, M. (2003). Echinococcosis: disease, detection and transmission. *Parasitology* 127 Suppl, S5-20.
- Cunningham, N. S., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Reddi, A. H., and Lee, S. J. (1995). Growth/differentiation factor-10: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily related to bone morphogenetic protein-3. *Growth Factors* 12, 99-109.
- Davies, S. J., and Pearce, E. J. (1999). Atypical post-translational modification and targeting of a *Schistosoma mansoni* surface receptor, a member of the transforming growth factor beta receptor family of cell surface receptors. *Mol Biochem Parasitol* 104, 299-310.
- de Caestecker, M. (2004). The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 1-11.

de Mendonca, R. L., Escriva, H., Bouton, D., Laudet, V., and Pierce, R. J. (2000). Hormones and nuclear receptors in schistosome development. *Parasitol Today* 16, 233-240.

Derynck, R., and Feng, X. H. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1333, F105-150.

Dunn, N. R., Winnier, G. E., Hargett, L. K., Schrick, J. J., Fogo, A. B., and Hogan, B. L. (1997). Haploinsufficient phenotypes in Bmp4 heterozygous null mice and modification by mutations in Gli3 and Alx4. *Dev Biol* 188, 235-247.

Eckert, J., and Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 17, 107-135.

Eppert, K., Scherer, S. W., Ozcelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Kim, H., Tsui, L. C., Bapat, B., Gallinger, S., Andrulis, I. L., *et al.* (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86, 543-552.

Estevez, M., Attisano, L., Wrana, J. L., Albert, P. S., Massague, J., and Riddle, D. L. (1993). The daf-4 gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development. *Nature* 365, 644-649.

Feng, X. H., and Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *Embo J* 16, 3912-3923.

Feng, X. H., Filvaroff, E. H., and Derynck, R. (1995). Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced down-regulation of cyclin A expression requires a functional TGF-beta receptor complex. Characterization of chimeric and truncated type I and type II receptors. *J Biol Chem* 270, 24237-24245.

Forrester, S. G., Warfel, P. W., and Pearce, E. J. (2004). Tegumental expression of a novel type II receptor serine/threonine kinase (SmRK2) in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 136, 149-156.

Funaba, M., and Mathews, L. S. (2000). Identification and characterization of constitutively active Smad2 mutants: evaluation of formation of Smad complex and subcellular distribution. *Mol Endocrinol* 14, 1583-1591.

Georgi, L. L., Albert, P. S., and Riddle, D. L. (1990). daf-1, a *C. elegans* gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor protein kinase. *Cell* 61, 635-645.

Gomez-Escobar, N., Gregory, W. F., and Maizels, R. M. (2000). Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans* daf-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*. *Infect Immun* 68, 6402-6410.

Gomez-Escobar, N., Lewis, E., and Maizels, R. M. (1998). A novel member of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) superfamily from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Exp Parasitol* 88, 200-209.

Gomez-Escobar, N., van den Biggelaar, A., and Maizels, R. (1997). A member of the TGF-beta receptor gene family in the parasitic nematode *Brugia pahangi*. *Gene* 199, 101-109.

- Gunther, C. V., Georgi, L. L., and Riddle, D. L. (2000). A *Caenorhabditis elegans* type I TGF beta receptor can function in the absence of type II kinase to promote larval development. *Development* 127, 3337-3347.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J., and Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 186-197.
- Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Lagna, G., and Massague, J. (1997). Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* 388, 82-87.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A., Jr., Wrana, J. L., and Falb, D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89, 1165-1173.
- Hemphill, A., Stettler, M., Walker, M., Siles-Lucas, M., Fink, R., and Gottstein, B. (2002). Culture of *Echinococcus multilocularis* metacestodes: an alternative to animal use. *Trends Parasitol* 18, 445-451.
- Herpin, A., Favrel, P., and Cunningham, C. (2002). Gene structure and expression of cg-ALR1, a type I activin-like receptor from the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* 301, 21-30.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F. M., Favrel, P., and Cunningham, C. (2005). Structural and functional evidences for a type 1 TGF-beta-sensu stricto receptor in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggest conserved molecular mechanisms controlling mesodermal patterning across bilateria. *Mech Dev* 122, 695-705.
- Herpin, A., Lelong, C., and Favrel, P. (2004). Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 28, 461-485.
- Hocevar, B. A., Brown, T. L., and Howe, P. H. (1999). TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J* 18, 1345-1356.
- Holtmann, H., Enninga, J., Kalble, S., Thiefes, A., Dorrie, A., Broemer, M., Winzen, R., Wilhelm, A., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., *et al.* (2001). The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J Biol Chem* 276, 3508-3516.
- Hoodless, P. A., Haerry, T., Abdollah, S., Stapleton, M., O'Connor, M. B., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1996). MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85, 489-500.
- Huang, S., Flanders, K. C., and Roberts, A. B. (2000). Characterization of the mouse Smad1 gene and its expression pattern in adult mouse tissues. *Gene* 258, 43-53.
- Hubert, K., Zavala-Gongora, R., Frosch, M., and Brehm, K. (2004). Identification and characterization of PDZ-1, a N-ERMAD specific interaction partner of the *Echinococcus multilocularis* ERM protein Elp. *Mol Biochem Parasitol* 134, 149-154.

- Huse, M., Chen, Y. G., Massague, J., and Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96, 425-436.
- Huse, M., Muir, T. W., Xu, L., Chen, Y. G., Kuriyan, J., and Massague, J. (2001). The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol Cell* 8, 671-682.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389, 622-626.
- Inoue, T., and Thomas, J. H. (2000a). Suppressors of transforming growth factor-beta pathway mutants in the *Caenorhabditis elegans* dauer formation pathway. *Genetics* 156, 1035-1046.
- Inoue, T., and Thomas, J. H. (2000b). Targets of TGF-beta signaling in *Caenorhabditis elegans* dauer formation. *Dev Biol* 217, 192-204.
- Irie, T., Muta, T., and Takeshige, K. (2000). TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett* 467, 160-164.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J., and Ten Dijke, P. (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 267, 6954-6967.
- Iwasaki, S., Iguchi, M., Watanabe, K., Hoshino, R., Tsujimoto, M., and Kohno, M. (1999). Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 274, 26503-26510.
- Jayaraman, L., and Massague, J. (2000). Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *J Biol Chem* 275, 40710-40717.
- Jonk, L. J., Itoh, S., Heldin, C. H., ten Dijke, P., and Kruijer, W. (1998). Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* 273, 21145-21152.
- Jura, H., Bader, A., Hartmann, M., Maschek, H., and Frosch, M. (1996). Hepatic tissue culture model for study of host-parasite interactions in alveolar echinococcosis. *Infect Immun* 64, 3484-3490.
- Kawai, S., Faucheu, C., Gallea, S., Spinella-Jaegle, S., Atfi, A., Baron, R., and Roman, S. R. (2000). Mouse smad8 phosphorylation downstream of BMP receptors ALK-2, ALK-3, and ALK-6 induces its association with Smad4 and transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 682-687.
- Kim, J., Johnson, K., Chen, H. J., Carroll, S., and Laughon, A. (1997). *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* 388, 304-308.
- Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K., and Taga, T. (2000). BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem* 275, 17647-17652.
- Kingsley, D. M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8, 133-146.

- Kirsch, T., Nickel, J., and Sebald, W. (2000a). Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2. *FEBS Lett* 468, 215-219.
- Kirsch, T., Sebald, W., and Dreyer, M. K. (2000b). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* 7, 492-496.
- Konrad, C., Kroner, A., Spiliotis, M., Zavala-Gongora, R., and Brehm, K. (2003). Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol* 33, 301-312.
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12, 857-872.
- Kretzschmar, M., Doody, J., and Massague, J. (1997a). Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 389, 618-622.
- Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., and Massague, J. (1999). A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13, 804-816.
- Kretzschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J., and Massague, J. (1997b). The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 11, 984-995.
- Kretzschmar, M., and Massague, J. (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8, 103-111.
- Krishna, S., Maduzia, L. L., and Padgett, R. W. (1999). Specificity of TGFbeta signaling is conferred by distinct type I receptors and their associated SMAD proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126, 251-260.
- Kroner A. (2002): Klonierung und Charakterisierung von Rezeptorkinasen der EGF- und TGFβ-Familie des kleinen Fuchsbandwurmes, *Echinococcus multilocularis*. Dissertation Universität Würzburg, Medizinische Fakultät.
- Kusanagi, K., Inoue, H., Ishidou, Y., Mishima, H. K., Kawabata, M., and Miyazono, K. (2000). Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell* 11, 555-565.
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A., and Massague, J. (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383, 832-836.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- Lawrence, P. O. (1991). Hormonal effects on insects and other endoparasites in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A, 487-496.
- Leung, I. W., and Lassam, N. (1998). Dimerization via tandem leucine zippers is essential for the activation of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLK-3. *J Biol Chem* 273, 32408-32415.

- Liu, F., Hata, A., Baker, J. C., Doody, J., Carcamo, J., Harland, R. M., and Massague, J. (1996). A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* *381*, 620-623.
- Liu, F., Ventura, F., Doody, J., and Massague, J. (1995). Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* *15*, 3479-3486.
- Lo, R. S., Chen, Y. G., Shi, Y., Pavletich, N. P., and Massague, J. (1998). The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *Embo J* *17*, 996-1005.
- Lopez-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S., and Massague, J. (1991). Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* *67*, 785-795.
- Lutz, M., and Knaus, P. (2002). Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* *14*, 977-988.
- Macias-Silva, M., Hoodless, P. A., Tang, S. J., Buchwald, M., and Wrana, J. L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* *273*, 25628-25636.
- Maizels, R. M., and Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* *3*, 733-744.
- Marks, A. R. (1996). Immunophilin Modulation of Calcium Channel Gating. *Methods* *9*, 177-187.
- Marks, A. R. (1997). Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* *272*, H597-605.
- Marks, A. R., Marx, S. O., and Reiken, S. (2002). Regulation of ryanodine receptors via macromolecular complexes: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *Trends Cardiovasc Med* *12*, 166-170.
- Marshall, C. J. (1995). Opportunities for pharmacological intervention in the ras pathway. *Ann Oncol* *6 Suppl 1*, 63-67.
- Marx, S. O., and Marks, A. R. (2002). Regulation of the ryanodine receptor in heart failure. *Basic Res Cardiol* *97 Suppl 1*, I49-51.
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosembli, N., and Marks, A. R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* *101*, 365-376.
- Massague, J. (1992). Receptors for the TGF-beta family. *Cell* *69*, 1067-1070.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* *67*, 753-791.
- Massague, J., Andres, J., Attisano, L., Cheifetz, S., Lopez-Casillas, F., Ohtsuki, M., and Wrana, J. L. (1992). TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev* *32*, 99-104.

- Massague, J., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1994). The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 4, 172-178.
- Massague, J., Cheifetz, S., Ignatz, R. A., and Boyd, F. T. (1987). Multiple type-beta transforming growth factors and their receptors. *J Cell Physiol Suppl Suppl* 5, 43-47.
- McGonigle, S., Beall, M. J., Feeney, E. L., and Pearce, E. J. (2001). Conserved role for 14-3-3epsilon downstream of type I TGFbeta receptors. *FEBS Lett* 490, 65-69.
- McManus, D. (1995). Hydatid disease. *Am J Trop Med Hyg* 53, 575-576.
- McManus, D. P., Zhang, W., Li, J., and Bartley, P. B. (2003). Echinococcosis. *Lancet* 362, 1295-1304.
- Moriguchi, T., Toyoshima, F., Gotoh, Y., Iwamatsu, A., Irie, K., Mori, E., Kuroyanagi, N., Hagiwara, M., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1996). Purification and identification of a major activator for p38 from osmotically shocked cells. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factor-alpha, and H₂O₂. *J Biol Chem* 271, 26981-26988.
- Moschella, M. C., and Marks, A. R. (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes. *J Cell Biol* 120, 1137-1146.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., and Heldin, C. H. (2001). Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 114, 4359-4369.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997a). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo J* 16, 5353-5362.
- Nakao, A., Roijer, E., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Stenman, G., Heldin, C. H., and ten Dijke, P. (1997b). Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor beta signaling pathway. *J Biol Chem* 272, 2896-2900.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-256.
- Nishida, E., and Gotoh, Y. (1993). The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* 18, 128-131.
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P., and Petersen, N. O. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 16, 291-299.
- Okadome, T., Oeda, E., Saitoh, M., Ichijo, H., Moses, H. L., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1996). Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor-beta type I receptor in vivo. *J Biol Chem* 271, 21687-21690.
- Osman, A., Niles, E. G., and LoVerde, P. T. (2001). Identification and characterization of a Smad2 homologue from *Schistosoma mansoni*, a transforming growth factor-beta signal transducer. *J Biol Chem* 276, 10072-10082.

- Osman, A., Niles, E. G., and LoVerde, P. T. (2004). Expression of functional *Schistosoma mansoni* Smad4: role in Erk-mediated transforming growth factor beta (TGF-beta) down-regulation. *J Biol Chem* 279, 6474-6486.
- Padgett, R. W., St Johnston, R. D., and Gelbart, W. M. (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* 325, 81-84.
- Patterson, G. I., and Padgett, R. W. (2000). TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet* 16, 27-33.
- Pearce, E. J., and MacDonald, A. S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2, 499-511.
- Penton, A., Chen, Y., Staehling-Hampton, K., Wrana, J. L., Attisano, L., Szidonya, J., Cassill, J. A., Massague, J., and Hoffmann, F. M. (1994). Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor. *Cell* 78, 239-250.
- Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engstrom, U., Heldin, C. H., Funa, K., and ten Dijke, P. (1998). The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett* 434, 83-87.
- Piek, E., Heldin, C. H., and Ten Dijke, P. (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* 13, 2105-2124.
- Qin, B. Y., Chacko, B. M., Lam, S. S., de Caestecker, M. P., Correia, J. J., and Lin, K. (2001). Structural basis of Smad1 activation by receptor kinase phosphorylation. *Mol Cell* 8, 1303-1312.
- Qin, B. Y., Lam, S. S., Correia, J. J., and Lin, K. (2002). Smad3 allostery links TGF-beta receptor kinase activation to transcriptional control. *Genes Dev* 16, 1950-1963.
- Rausch, R. L., and Bernstein, J. J. (1972). *Echinococcus vogeli* sp. n. (Cestoda: Taeniidae) from the bush dog, *Speothos venaticus* (Lund). *Z Prakt Anasth Wiederbeleb Intensivther* 23, 25-34.
- Rausch, R. L., and D'Alessandro, A. (1999). Histogenesis in the metacestode of *Echinococcus vogeli* and mechanism of pathogenesis in polycystic hydatid disease. *J Parasitol* 85, 410-418.
- Rausch, R. L., and Wilson, J. F. (1973). Rearing of the adult *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, from sterile larvae from man. *Am J Trop Med Hyg* 22, 357-360.
- Reddi, H. (1995). Bone morphogenetic proteins. *Adv Dent Res* 9, 13.
- Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S. E., Ward, C., Huang, F., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Rosemblyt, N., et al. (2003). PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol* 160, 919-928.
- Ren, P., Lim, C. S., Johnsen, R., Albert, P. S., Pilgrim, D., and Riddle, D. L. (1996). Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF-beta homolog. *Science* 274, 1389-1391.

7. Literaturverzeichnis

- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H., and Miyazono, K. (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7632-7636.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Amagasa, T., Miyazono, K., Takagi, M., and Ichijo, H. (1996). Identification of important regions in the cytoplasmic juxtamembrane domain of type I receptor that separate signaling pathways of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 271, 2769-2775.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Toriumi, W., and Sugita, T. (1999). Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 274, 10641-10648.
- Salzet, M., Capron, A., and Stefano, G. B. (2000). Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. *Parasitol Today* 16, 536-540.
- Samuel, G., Miller, D., and Saint, R. (2001). Conservation of a DPP/BMP signaling pathway in the nonbilateral cnidarian *Acropora millepora*. *Evol Dev* 3, 241-250.
- Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T., and Ishii, S. (1999). ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 274, 8949-8957.
- Savage, C., Das, P., Finelli, A. L., Townsend, S. R., Sun, C. Y., Baird, S. E., and Padgett, R. W. (1996). *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 790-794.
- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H., and Gelbart, W. M. (1995). Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139, 1347-1358.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1997). TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 272, 8141-8144.
- Spiliotis, M., and Brehm, K. (2004). *Echinococcus multilocularis*: identification and molecular characterization of a Ral-like small GTP-binding protein. *Exp Parasitol* 107, 163-172.
- Spiliotis, M., Kroner, A., and Brehm, K. (2003). Identification, molecular characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Gene* 323, 57-65.
- Spiliotis, M., Tappe, D., Sesterhenn, L., and Brehm, K. (2004). Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. *Parasitol Res* 92, 430-432.
- Storm, E. E., Huynh, T. V., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kingsley, D. M., and Lee, S. J. (1994). Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* 368, 639-643.

- Storm, E. E., and Kingsley, D. M. (1996). Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 122, 3969-3979.
- Suga, H., Ono, K., and Miyata, T. (1999). Multiple TGF-beta receptor related genes in sponge and ancient gene duplications before the parazoan-eumetazoan split. *FEBS Lett* 453, 346-350.
- Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J., and Matsumoto, K. (2000). TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 5, 649-658.
- ten Dijke, P., Franzen, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Heldin, C. H., and Miyazono, K. (1994a). Serine/threonine kinase receptors. *Prog Growth Factor Res* 5, 55-72.
- ten Dijke, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Franzen, P., Laiho, M., Miyazono, K., and Heldin, C. H. (1994b). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science* 264, 101-104.
- Timerman, A. P., Wiederrecht, G., Marcy, A., and Fleischer, S. (1995). Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP-ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *J Biol Chem* 270, 2451-2459.
- Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779-791.
- Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
- Ventura, F., Doody, J., Liu, F., Wrana, J. L., and Massague, J. (1994). Reconstitution and transphosphorylation of TGF-beta receptor complexes. *Embo J* 13, 5581-5589.
- Vivien, D., Attisano, L., Wrana, J. L., and Massague, J. (1995). Signaling activity of homologous and heterologous transforming growth factor-beta receptor kinase complexes. *J Biol Chem* 270, 7134-7141.
- Weis-Garcia, F., and Massague, J. (1996). Complementation between kinase-defective and activation-defective TGF-beta receptors reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signaling. *Embo J* 15, 276-289.
- Wieser, R., Wrana, J. L., and Massague, J. (1995). GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *Embo J* 14, 2199-2208.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., and Hogan, B. L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9, 2105-2116.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F., and Massague, J. (1992a). TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71, 1003-1014.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. (1994a). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341-347.

- Wrana, J. L., Carcamo, J., Attisano, L., Cheifetz, S., Zentella, A., Lopez-Casillas, F., and Massague, J. (1992b). The type II TGF-beta receptor signals diverse responses in cooperation with the type I receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57, 81-86.
- Wrana, J. L., Tran, H., Attisano, L., Arora, K., Childs, S. R., Massague, J., and O'Connor, M. B. (1994b). Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 14, 944-950.
- Wu, G., Chen, Y. G., Ozdamar, B., Gyuricza, C. A., Chong, P. A., Wrana, J. L., Massague, J., and Shi, Y. (2000). Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287, 92-97.
- Wu, J. W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D. J., Kyin, S., Muir, T. W., Fairman, R., *et al.* (2001). Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 8, 1277-1289.
- Wu, R. Y., Zhang, Y., Feng, X. H., and Derynck, R. (1997). Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4. *Mol Cell Biol* 17, 2521-2528.
- Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C., and Lodish, H. F. (2001). Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *J Biol Chem* 276, 39404-39410.
- Xie, T., Finelli, A. L., and Padgett, R. W. (1994). The *Drosophila* saxophone gene: a serine-threonine kinase receptor of the TGF-beta superfamily. *Science* 263, 1756-1759.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., and Matsumoto, K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.
- Zavala-Gongora, R., Kroner, A., Wittek, B., Knaus, P., and Brehm, K. (2003). Identification and characterisation of two distinct Smad proteins from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol* 33, 1665-1677.
- Zentella, A., and Massague, J. (1992). Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5176-5180.
- Zhang, H., and Bradley, A. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122, 2977-2986.
- Zhang, Y., Feng, X., We, R., and Derynck, R. (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* 383, 168-172.
- Zhu, H. J., and Sizeland, A. M. (1999). A pivotal role for the transmembrane domain in transforming growth factor-beta receptor activation. *J Biol Chem* 274, 11773-11781.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

A	Adenin
AcRIIb	Activin Typ IIb Rezeptor
AD	Aktivator Domäne
Alk	activin like kinase
AR-Smad	activin associated receptor smads
ASI	Chemosensorisches Neuron
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintri-phosphat
<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
BD	DNA bindende Domäne
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BR1a	BMP Typ Ia Rezeptor
BR1a-ka	BMP Typ Ia Rezeptor (konstitutiv aktiv)
BR2	BMP Typ II Rezeptor
BR-Smad	BMP associated receptor smads
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	complementary DNA
Co-Smad	common mediator Smad
Cys	Cystein
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
DOPE	dioleoyl phosphatidylethanolamine 2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoroacetate
DOSPA	2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoroacetate
<i>E. multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
FCS	fetal calf serum
FKBP12	FK506 binding protein 12
Glu	Glutamat
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HA	Hämagglutinin
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293
His	Histidin
I-Smad	inhibitory Smad
JNK	Jun-aminoterminal Kinase
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
LIZ	Leucin-Isoleucin-Zipper
Lys	Lysin
LZ	Leucin-Zipper
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase

MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
Mg	Magnesium
MH1	Mad homologue 1
MH2	Mad homologue 2
mRNA	messenger RNA
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	basisches nukleäres Lokalisierungssignal
ORF	open reading frame, offenes Leseraster
PCR	polymerase chain reaction
RACE	rapid amplification of cDNA ends
R-Smad	receptor associated Smad
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
S/T-Kinase-Rezeptoren	Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SARA	Smad Anchoring for Receptor Activation
SBE	smad binding element
TAK	TGF β Aktivierte Kinase
TGF β	transforming growth factor β
Thr	Threonin
TRI-ka	TGF β TypI Rezeptor (konstitutiv aktiv)
Trp	Tryptophan
Val	Valin
wt	wild type, wildtypisch
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
YTH	Yeast two hybrid

8.2 Genomische DNA-Sequenzen

8.2.1 EmSmadB (Exons: Großschrift)

gctATGTCAACTCCAATTTCTAGTCTAAATAGCCTTTTTTCTTTACTTCTCCTGCAGTTAAAAGGCTGCTCGGTTGGAA
 GCAAGGTGACGAGGAGGAAAAGTGGGCTGAAAAGGCTGTAGATTCTCTTGTGAAAAAGCTGAAAAAGAAGAAAGGTGCTC
 TTGAGTCCCTGGAAAAAGCTCTGAGTAATCCAGGTGAACCAAGTGAATGCGTTACGATAACCAAGATCTTTGGATGGCAGA
 CTGCAGGTTTCACACCGCAAAGGTCTGCCGCATGTCATATACTGTCGTGTTTGGCGTTGGCCTGATCTGCAGAGTCATCA
 CGAGCTCAAGCCCCTAGACATTTGTGCGTTTTCTTTTTCTGCTAAGGAGAACGAAGTGTGCATAAACCCGTATCACTACA
 AGCGTGTGAAAGTCCAGGtaaatcctggatggtgtaactcattcccacgggtgtgtcctttcaaaaacatagacttata
 ggattatgggtctaagtgaacgcgggctttgatcacacgggtatcatcccatcacttctattcaacacgcctttt
 tgcattcgttttagTTTTGCCGCCCGTTTTGGTTCCAAGGCATAGCGAGTACCCTTGTATGGGGTGGTATCCGCTGGAC
 CTCCAGCGGACTCAACAAGAATAAGCATAATGCCACTCCAGGCTGCTCCACTCTTGGTGGCGTCATCTTATGGTCAGCCG
 ACGTCAGGCGGACCTTCAATGCCTTACAACGTCACCTATCCCCAAGTTTTCACTCAGACCTCGCCTCTCCCCCTGCTAC
 TCCATTAGCAGTGGTGCCCTCCCCCTACCTCCCTTCTCCGCCCTCAGgtatgatattaccattcaccacatttggca
 acattttcaacgccttttggcttcatgggtcatactagtccgtttttccgaaactcgtctgtattagggtttttgaaac
 gaaagtgttgtttgaatgtttagaattttccttcacttttagatgctccttacgaaaatgtaagataacggttgccttgtatg
 cgattttcctcacttgaagcaattcagtgccacagctatgaacgtagttcataacatagaaggatgacgtatggtttag
 ttgacagtgtaaaagtgtcttatcgtttgccgttctccagACACTCATCCAATAAACTACCAAGAACCAAGTACTGGT
 GCTCGATAGTCTACTACGAATAAACACCCGTGTTGGAGAAGCCTTTTTTGCCTCTCAGCCAAGCATCGTGATCGACGGT
 TTCACAGACCCCTTCAAACAACCTCGGACCGCTTCTGTCTCGGCCTCTCTCCAATGTAAACCGCAATTCTACCATTGAAAA
 CACTCGTTCGACACATTGGCAAGGgtgagttcctttttgtaactgggcaaatcatatataaaaaacgtgccttttggataa
 acacaactgtagaactttgataactagaattttagctctaacttacgatttacaagtgtagacgctcatttttctgcaa
 cctaaaacttactgtaataacatcaattgcaaaaatatttttatctaataattttgacggaaaaaccaatttggcgtggc
 cgttaccgtattccttttggatagggcactggtttaggggttaaaaatgggttagtttgggttctacctcctgcgat
 ttatattttggtagtatgccgcaaattacgtctggcatttctgcttccccttttgcagcgtagtcatgatgggcagt ag
 tatgatgttttaaatgaacgaaatttagccacacattaatgatttctaaaaatgccgattactatttctgccaactatc
 tttttactcgtcactcgtctcagctctctggcgttcatctccactgccaatggtcagatacgtacctgtgtgatagg
 cgattcgtcactacatgcaaggaaggcggttatttggcgaccgggtgtaattggttacgcgttgtttcgtttattcgtcgt
 tacagtgcgtgcggttgggtggtggtgatggtgatgctctggtgatggccgcacttaccttttctcatcacttttatctgc
 gcatgtttttcctcgtcaaaaggggctaaaatgagtcctttccggttgcaaaaattatttcgcactttctgtgaataact
 gactttaatttcaagctaaacagaagcattccgctttttgacaagcactcatttttcatatgaagggacctattggggtc
 ctctgtgtgaaattgaacgtcttgccttatttaagGAGTTCACCTACTACGTTGGAGGAGAGGTGTTTGGGAATGCC
 TCTCAGACAGCAGCATCTTTGTGCAGTCGCGCAATTGCAACCACCCGGCACAATTTTAATTTGACTACTGTATGCAAAATT
 CCGCCAGGCTGTTTCGCTGAAGATTTTCTCAAACCAGGAGTTTGTCTAGCTGCTGCGTCGTACAGTGAGCCACGGCTTCGA
 GGCAGTTTACGAGCTACCAAAAATGTGCACGATTAGGATGAGCTTCGTGAAGGGTTGGGGTGCCGAATACCACCGCCAGG
 ATGTCACCTCGACACCCTGCTGGGTTGAGATCCACCTAAACGGCCCCCTCCAGTGGCTGGACCGGCTTCTCACTCAAATG
 GGCACCTCCAGCAATCCCATCTCTTCTGTTTCCctgattcgtttcctttcaccctcttccactctcctcgactttcttcat
 tctttgcttctcgtgtaactgcatttattagggtgcttgccaagcaccagggacaatcatgatgcgccatccagacttca
 ttcttcgccccctccttttgaccccggtggatattcctcgtcctttttaatcatttcaaatgtaacgggttcttaattatg
 tatgtaatgtaagtgccttactacacagtaaaaaaaaaaaaaaaaaagaagaa

8.2.2 EmSmadC (Exons: Großschrift)

gaacgggctattgttaaccaggatagtttaactcgtctgtgttaccatccctcgacccttgatgaaaacgcagaccacgaa
 gtcttgggtggtacacccacgtggtcctttccactcctctagtgtcctctggaATGGGTCCCTCCTATCGCTCATCTGG
 TGATGACTCGACTACTCAAAGCAGCAGTCCGCACACTGGCTCCATGCTCAGgttgggtgtcttcgctccttgcattcattc
 attgtttacacgctcaciaatcgtccttgtgcttttaaaagcgaagaatgaaggcgtcattttcgcgatttcggttattg
 accgagcaccagggcgtatgacgttactacatggaatgaaaaataaacaagttctattgcacaatagttcgtgaocgg
 ggtcgattccgagatcgcaaacacattggacgcgtttaattattgctcaggattacttcaaactatttgtactcctagct

8. Anhang

attaccctgcttcagtcacttttagttattgagctaagaaaagatggcgtatcaaatatgcgcttgggtgactttcgcttc
catttgcacatgcagatgtagcgaaaatccacgatataatttctgactggtgaaatgagatgattaccggttgattha
gtgctcctactcctacatccgtaatttggccaatatcacattacataggctgtattgtttgggtccgcttggaaatca
gctgtttttatttcaggcgcaaatatctactcctagtactactgggtccacaaatataatttagtcaaatattggcagata
accaatgcttgcactttgagtcagcgtttcattaaagagatggctgaccctcatctccttttagtacatttgaccctc
caaagaatacggacttgcgtggtcatggtttatgtatggaagggatgtgcagtctgccaccaaggcacatagaaccg
tgtctacatacacctttacaggaagtagatttcttgggtctactaaagcatgttaatttcttgggtggtagCTACCTG
TCACATGGCCTGAAAAACAGCATGGCAATAAAACCGTCTCCGCCATCAACCTCGTCGCCGACGCTAACAAGCTCGGCAAA
CTGCTCGAAAACGACGGGAGCGGGAACGGGGAAGTTGGATGAGGGTGGGGAGTCTCGGCAGGCCCTGCTGGAACGACGG
ACGCTCTGAGCTGCACGGCACCGGGTAGCAGCAGCAGTGGCGGGGTAGTGGGGATGCCACCTCCACCGGCGGTCTTGAC
TCCCGTTCCCCGGGCGCTCTCTCAAGGGATGAGAAGTGCCTCAGTGAGGATAATGACACTATGGACACTGGTCTAGgtga
gtagagaccgactgctccgtacacttgccttgggtgctcagccgtagccctcgagctgcccgtaaaaggcagccttact
atgtaatcagagcaatgctgaaatttcggaaggatagatagctggtcagaacttggcactggtgctgaggttgaatcc
cgggtcagttctaaggctcaagtaacgattggatagcttctacagcttgcattgggagctcttcgctgctttggggaat
aaaagtgttcagctattgtcataaacactaattaatgtgtaaaatagggttgatgtaacctatttcccttctcttagtc
cttactgtgaggtagatagcccatgctgtatctggtgctccattgccccttcaaaactgattaataacatctctcggc
agaatgaatagtgctgaaggaagactgagtaattggggagatattgtttcaactgaaactggggaatcggccagctcc
ctatcgaatttccattcccacagctccattaacaatgttttctgtagtggggaactcgaataacatttggaaatagttatc
actgggttatgtaatgtcacctcatcttaccatgttctattaataaacaccggcaagaagccattttagctctccttggct
tcggcgtttcaattgacagtggttcttcggactgtccatgtgattgtgatcggacggcattcctttaacttgaatgtttgc
taagtttaccttccactatcaataagtaataaaggtaagtaagcttgcagttctctacagctccatctgtagctctatt
gaagcgcagttactcattgaacattgcttaccatagctctatgattaaggggttcagcaacgtaacatgttgtttggggca
catccgatagcggcatggtctctgcttagacgatttcttgcctaggacaacttcgtctatcaacccaaaaggatcgcgcaa
cttcggagcaagatttccatcaccaactgctggatataaaacggcgttttctcactcatttagcttaataatcagctg
ataatggttcgcttgacacggaatgacacggttacccttctgtatgagaagaagttgaaatatttgggtgcatattgtagctg
ttcattgggtgcttgacacggttacccttctgtgctgctttagACACACTGAACGACATAACAATCGGTGAC
TCGGCGCACACCTCAGTGGCCTACCAAGAGCCAGACTGCTGGTGCTCAGTGTACTACTACGAGACGAATACGCGAGTCGG
CGACACCTTCTACTGTGCTTCTCCCTGTCTCACCGTTGACGGCTTTACCGACCCCTCTCGCGAGAACCCTTCTGTCTCG
GCCTCCTCAGTAACGTTAATCGGGGCCACCAGATTGAACTCACTCGCCGGCACATTGgttagctcttcccaccgccaactc
ttgtttcttgtaccctcatttattcgttctggttgggttctgctgcccacgggaggaagtgataagttcttcatccatcc
tcaggacgtggtaggccaactcagagctctggttaatgagctctgtctttgttttggtaagagtggtggctgtttgggtca
tactggggctacaacgaataactgcgaatgctcgttgcggttccaagtcacttatccatctgtggtttacagtggtg
ttattgctctaccttgttgattgagcaacgattcgcactccttgcctatttcttttgagctatataccttgttcttgggtg
agctaaatgacgcgaagaaatgtgctttacatataaaacctccactccaattgatggatcgcactcactccaatt
gaaccagttgagaagcagcgaatggtgatttgtgaggaatgaattcctttttgactaggcatacacacttttagG
CCACGGTGTGCTCTACTACATTGGAGGCGAGGTTTTGCCGAGTGCCTGAGTGACAGCGCAATCTTCGTCCAGTCGC
CTAATGTAAACCACATGTACAACGGCATCCGGCTACGGTCTGTAAAATTCACCAGgttagctcttcccaccgccaactc
ttgtttcttgtaccctcatttattcgttctggttgggttctgctgcccacgggaggaagtgataagttcttcatccatcc
tcaggacgtggtaggccaactcagagctctggttaatgagctctgtctttgttttggtaagagtggtggctgtttgggtca
tactggggctacaacgaataactgcgaatgctcgttgcggttccaagtcacttatccatctgtggtttacagtggtg
ttattgctctaccttgttgattgagcaacgattcgcactccttgcctatttcttttgagctatataccttgttcttgggtg
agctaaatgacgcgaagaaatgtgctttacatataaaacctccactccaattgatggatcgcactcactccaatt
gaaccagttgagaagcagcgaatggtgatttgtgaggaatgaattcctttttgactaggcatacacacttttagG
TTGCAATTTGAAAATCTTCAATAACCAACACTTTGCGGCACTGCTGAAAGAGAGTGTCAACAATGGCTTCGAGGCGGTCT
ACGCGCTTACTAACATGTGCACTATCCGAATCAGCTTTGTCAAGGGCTGGGGCGCCGAATACAGgtgagctgctgctgct
ttttacacggaatctactccttcatcggcgcgacacttgcgacacagacagttgctgatgagcaagcatgtctaagtg
ttgctgctgactcacttaggctctatctatgtgtggtgcttcccagcagtagccttgcacagtgaaatccggatg
ctgcaaatgctctcttgaccctttctttcagGCGTCAAACAGTGACAAGCACGCCCTGCTGGATAGAGCTTCATTTGA
ACGGTCCCCTCAATGGTTGGACCGTGTCTTAGTCAAATGGGCTCTCCTAACCATCCATGCACGTGAGTAAAGctagacc
aatcaaatcacccccgaaccagccgcaagaaggcttattgcttccaccacataactcccccttctcccggccccctcg
cgccattcaatgctgactgcaccctgtttttcccactcttgcgccaatgcatttgcgtttttctcgactgcttct
ttttaccaaccgcccgaactgctccacatatacctccgccccctcacttggcaactgtgcttatacatgtacgtac
gtgtgctgttgcgaatgtggcctgactcctccactcgcgtaggactttgttcatcttccgtttctgcacgcttcttga
tgactcaacttctctccccctctctgtcatacacacataactcctctctttttatgtattctttaaagattaataaaga
cggataatagctgtcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

8.2.3 EmRSK2(Exons: Großschrift)

gctttggcaaattcatctcctcaatttctttaagaaggatggcgcttattaacgcgctttttactgccccattaatat
ccctactttaaaccttcgtgtgtttccaccaacttttgccgcagttttgcagcgatagccgggtgacttttatataaggca
tagtcgatgtgccctcctttacattttttcttttgatgctctatgtgaaatcttcatcaccttgtaaaaagcatctc
gaaacgtttgacctcaccattgcagtgtaatcatctatgaattttccttcacttctaattaaattttaattcgcaaactc
tttctatgtaagtttagtactttcgctttttcagaacccccagattcactatagggcgataacctccccgatcttctaac
aacctcgaaaacaaagactcgaaaattcccaacATGTTTGCCCTCTCGCTACTCCTTTTTTCTGCCGCTAAGCCGTCCA
TAGCAAATCGGAAAGAATGTCTGAAACTCCTCTGCAATCCTGATGAAAGCGACTGCCATCCCTGTGCAGGCATGTCCGTG
GACGAACTCGGCACATGGCGACGCTACATTGACGCTCTGCTACAGAATTTCAATGACGAGGAGAGCAGTAATGCTTACTA
CCGGCAGATTTGGGAGGAGCCCTTTTGTGCACAATTTACCTGGAGAGCGTTGCATTATCAAGCTGATTAATGAACCAA
ATGTGCCGCTCACAGGCTCTATGAAATGGGgtgtgtagggtctccggtattttctagcctccacttttttacgctcctg
actatttcttccggtgatctatagATGTTTGCGCCAAAAGGATTTCTGGAAGCCCTTCAGCTGTGAGTCGGCGAACATG
CGCTGTTGTAACCTATCCTTCTGTAATCTGCCTCTGAAGGAGGAATTTGTCGAAGTTGATTGTGCGAGGTGCCCAAAGACAA
CACCTAATTGTGATTTTGTCCATCTTCTAGTCCTTGCTGTCCATGCTTGTGCGGGCTGGTGCTTCTGGCGGTGTC
GAGATAAAGCTGgtacgcgctcctttttgcttgcctcctcgcctttttcttttaatttattaattcacccttttcttcaattg
tagACTGGAGAAAATgtaagtccactttatggcggtgggtttgcatcccttaaatgcgtaaatgagtgcttctagttatt
gtttctagatgaagcaagtaaatggtgcatattttattgtttgaaagcaataattgatttaagtagaatcgtcgtcaca
ccttttgctacccttcattacggaatcgcaaatgtgagattcaatgatctacaggggtcgtttttgttttcaagccaa
cgaaagagtggttttcggttataataacagttagctgtttcaattttatgtcggttagcttatgatttaaggctacta
actttttaagcttcataaatgaagtcggtttttatgagatattagagttcgtgtccacttatgttctaggctcaccaga
ttgtttcagattgtgttaacattactacacctatcaagttttctttgttttcatcttccgctcattgaaacactggt
tccatgcaaaaaatcacgaagtcgctgagagttgttgaacctatcatttgatgtgcacctgtgtatcgagttattaat
ctaattctgttaaatctattctatctcatgtcacaatgcgcaatttattttccattccaatcaatcatcctgctata
aaggagagggggaagtttaaggtgatttacttcaccgattttcagCCTCCAAGCACCCGTTTCCATGATTGGTGCTGGG
TGTATCGGCGATGCCACAGGTCACACATCTCCAAGCGACACGCACCCTTGGCACATGGCGGAATGCGGTGCCAGCGGCGC
CTCCATGGTAAGCGCTATACCGACCGCTACCACCACCGCTAATGCCAGCGCCGTCGCTGTCAACGGAGGCGTTCTTAACG
CCACCGCTGCGAATAGTGGGGTCAGTGTGCAACCCTCTCATCGACTCAGTCCCTCTCCATCCCTCTCGCACGCCCTTT
CTGATGGCTAGTTCCTCCATTTCTCTGTGATTGCTGTACGACCTCCTCGGGCCTTGGAGCAATTC AACAGGTGTTTC
GTCTACCACAACCTCCATCGGTGGTCTACGGTCTCGGGCCTCGGAGGTTGTTGGCCTTGGTGGTGGCGGCGCTTCT
ATACAGCTGCTAGTGGGGGTGCTTCTATGCTCCCCACCTCGTGTTCTGCTCCGCCTGGGGCTGGTGGCACTCTGGAAATC
ACTCTATCGGGAAGTGGGTCTGGTGGGGTCTAGCCACTGCTAGTGAACGCACAGTTGCGCGTCAGGTCACTTTGAGTGC
ACGTATTGGCGAAGGGCGATATGGCGAGGTCTGGCTCGGCCGACTGCATGGTGATCAGGTGGCTGTGAAGATATTCTCCA
GTCGGAACGGAACCTCGTGGATTAGAGAGAAGGAGATCTACGAGACAGCTACTCTGCGTCATAGCAACATCCTGGGATTC
ATCGCTGCGGACAACAAGGACAACGGAATCTCAACGGAGCTCTGGCTAATCGCTGAGTATCATCGTCTGGGTTTCGCTCTA
CGATTTCTCCAATCGCACGCCCTTACTCTTCCCGCCCTCATCAAAATGGCCTCATCCATTGCCAACGGACTGGCGCATC
TCCACATGGCCATTGTTGGCACCTCGGGTAAACCACCAATAGCTCATCGTGACCTCAAATCCCAGAAATATTCTGGTAAAA
CGGACGGTGAATGCTGTATCGGGGATTTGGGCTTTGGCGTGAAGTACGACAGTCTCACTGGCCGCGTAGATATCGGTCA
CAACACGGAACGCATTGGCACAAAGCGGTATATGGCACCGGAGGTAATAAATAACACCCTCTATGCCATTCTTTTCGATG
CCTACATGCAAGCGGATATCTACTCGCTGGGTCTGGTCTTTTGGGAGATGACTCGACGTGTCTATGTTGCCAATCTCTAC
GGTCTGAGGAATATCAGCTTCCCTATCAGgtttggcgcttcaaaagtccttctccatttgaaggcccttagtttgatc
tgaaggttcgtgtgtctcttatagGATAACGTAGGCCCTGATCCCTTGATCGAAGAGATGAAGTCCGTGGTGTGTAACCT
GGGCATACGTCCCCATCTGCCATTGGTATGGCAGACGGATGCAAGTCTGCGGCTGCTTTACCACATCATGACGGAGTGTT
GGTTTGCCAACCCTTCCACCGTCTTTAGCAATGCGAATCAAAAAGGACCTTGCGAATCAGCGTCAACAACCTCGGCTCG
CCAAGGCAACCGGTGAGACTCCACTGCCTCCACATATTCTTCGCCAACAGCCCTCCAGTCTAGATGCCCTACCGCCCGG
TGTATTTGTCTATCGATCGGTGGAGGCCGCCAGCGCCGCAAGTAACGCCAACACCTCAACGTTAGAGACAAATCAGGTGG
GGGAGGCGGAGGCGGAGGCGAAGAGGCACTCCTTGCTCCGGTGGACCCACTATTCAACCGCAAATGTGGTTGCCACG
GCAGCGGTGTGGGGGGAAGAGGAAATCTCGGATATTGTtgaactgagaaataattgtaggacatccacccacactatct
caccctgcatttgccttttttctccccattatgtacacacgcgtgcgcgctgtacaatgtgtattttatcactcctt
ctactccgatagtccttagtcatgtctgcgtgtgtcgttgttgggtgttgaaggtcaccagcagcatcagtaaaaggtgg
cactaacgccgacagcatgtgtgaatgagttgtctgcgctctcccgaccctccacaaagccacacggtattatgcccc
ttgaaaccttgaggcacaagttctctgctcctacctccgctctctgctctcccttccctccttctcttccgcatgcat
ccatcaatgacgatcgctaataactcctcgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

8.2.4 EmBMP (Exons: Großschrift)

cgctgggtcgaggggacatttgaaccgagacagtgccagaccacgggtccaacaactgccgccataacttttcttctcca
ctctccggttttaccgcaaagcaccgcagccttctggcgccATGGGAGATAGCAGAGGGTCCGGAAGAACATTAACACGAC
TTGTAGTGATTGGTCTTCTACTGCAGGCGGCTCAGACTGCGGCCACGGTGGGCAGCAGTGCTTGTGGAATAAACGAAATT
TTTGTGAGTAAGAACCCTCACGgtacgtagagcatcaaataatgaagaagaggagatatttcgaatctggagttccgga
ttaccttttacagCTCAGAGAAAGACACAGTAGAGAATGGATGAATTTCTGGGCAAACCTGACGGTGGACACGGTCCCAGTC
TAGGAGTTATTACAACCTATACGTCATCACCGAACACAGGGGCAAACGATAGGCAATCACAGTGGCAGAAACGTGACAGC
CTCGATTTCCGCCTTGACGATTTTTCAGTCGgtgagcagttgatagcgtgcagtttgccggctgccaattagacattgcat
aaacgcatccaccccggtctcagTGAAGGTGATTGGTGCAGGGGAGACCCCAAGGGGCGAAGTCTATGTAGAGGGCGGG
GGACGGCAGGACAGGGACAGAAGGCGTGGCTAAACGTACCACTTCTCCTGCCTCCCTCTACAATCTCCTAAGACAAAAG
CGTCTTCTTCGATTGCGAGTTGACCTGGCCGATGCCAACGTAATCGACACCTCGCACACGCCTCATCTCCTGACTTTTCA
TCGCAGTGCAGAACGCCTGAACGTCTGAAAAGAGCACGAAGAGATACTAGTGCTGATGTGAACCTGGAGGCTTTTGAGC
AGAGGAATCCGATAAATGAGgttaggaatcaaaactcaagttttatgcaacttttggtttagctttcaggctgtgataa
attggtttgaagcaaacacaggcgagctaaccaatatttgtccaccactttgtccggttcgatgcacgaaaatattgtgac
tgaatgtaaaggtttatcatccattttggcttctttacagatatttctgaaagtgattcatttgaaatctcagcgcacggc
gcaaaactcattcaaaaataaagtgttgcttctgtttggttatatttgttaacaaaattaccgatgatatactctattgt
aagaaaggaagtcccattgaccaaccgatgctaaaatggatattgcattgcgggtactgagttccagggcggaagattag
gatttgtgaaggcctgttgaccacataagcctgcaaacacctagtctgttgaggatctcctacctcagaatacacga
atattccttttggatcgtatggtgacgtgggtacacagttggccatgtggaacttatccgagttggaagagttgaaat
ctgacatagtgccttaattgtaggcaaaaaaattgtaagaagaggaggaagaagtggaattgctttttagttttgtagg
gttgatgcgttttctttttgtgatttactttatggaacatcagtagtattcctttgagGTTAAACCAATCGGTGAAAATCG
CAAAAAGCGTCGACGAACACGCTCTAAAAGCAAAGTTGGACAAATAATCGGGAAAAGCGCAATTCGCGATATCTCATGA
ACCAGCGATACGTCGCCTCAACATGCCAACGGCGTGACCTCGTGGTTAACTTTAATGCAGTTGGTTGGTCGCGTTGGGTG
ATTGCTCCGCCTGCCTACAACGCTGGCTACTGCTACGGCTACTGTCCCTTCCCCCTTTTCAGCCCATTTCAATACTACCAA
CCACGCGATCATCATCCACCTCATGTACAACCTGGGGCGTGGCCCCACCCCAAGTCAAACCGCCCTGTTGCACCCCTGTCA
CCTTCAGTCCCAGTCTATTCTCTTCTTCGACAGCGACGAGGTCTTCTGCAAGTCTACGAGGACATGGTTGTCGAGACT
TGTGGCTGTCGGtgatattgaccctaaaatcaagatttt

8.2.5 EmTAK1 (Exons: Großschrift)

taatacgactcactatagggaagcagtggttaacaacgcagagtcgagggggcgatttgtttccactaagactgaaacg
gATGGATGCCGATAGACCTGCCCCAAAGTGGCTCAGTATAATCATCCGAACCCGtaagcttttctaataaccttccat
cacaccttttgggtgaattcgaaaatggccttagttattgcctatctgtggtggaattgtcataacaaaactgtaccggt
tattctatgtacgcctcagcatatcaattagagccctcgttggatctcgccttcttcgcttaaatctataagttgtgac
catttgtattacttggcaaaatagtcgcaaaaatagaggtggaaccaccttctcacgtgagatttccctacattcattgg
tggttcgaattagttacgatgacaaaacctaccacctataatgccacctatattggtgaagttatgtgggtcctgctt
aaaatgcgccaagctttatataattggtccggagttgacattttgcgtggtcaatccttaaagtgaagtagggaaggtggg
ttatgttaactatgggcaagcagttggcaataagttcaagacttctttgcttgttactacttagcaaatttggcctat
tttcatttttgccttcttatttcggATCTGACGATGAGCTTAGGTATTGTGTGGAGAGAGTTAAGTCCGTATTTAATATAC
CCGAGGATGAAATTCAAATTGAGAAAAAGgtacattcccattttcaatcgccctgccttcataacgtttttagttaatcctt
caatctatttatcgaaagtggatatttgcagagaataggtacaaactagggtttttatgtttttaagAGTGTATCAGGA
GGAAGTTTGGGGATGTCTCATTCCGGCACATACCGTGGAAAAAATGTGGTGA AAAAGGATTTTAAATTTTTCGCTACGAA
GAATGAGCGCAAGTACAACCTACCGCAAACGTACACGCTTGACGCCTGCAATCACATAAACATCGTCAATTTATTGGTGC
CGTCCCTGACACGGGAAAAGCTAACGTTTCGCTATGTTGTCATTGAGCGGGCGACAAACGCCTCCCTGGCAGAGCgt aagt
ttcccattttctcctggggccggagtaatttctcctattttagTCATTGAATCAAGCACTGCATACCTCATTGGCACGT
GATGCTCTGGAACCTGCATCTCGCAGATGGGTGGCGTATCTTCACTCTCGTCTGAGCCAATCATCCATCGGGACCTGA
AACCCGCCAACATGCTCCTCTTTGATGGGTGCACCATCCTCAAGATAAGCGACTTTGGTACGTCAAAGATTATTGAGGCG
GGCAAGGAGGACTTGACGTGCTAAATCAGGGCTCGCGTATCTATATGGCACCAGAGGTACAACAGCgt aggtcctcatt
tgttattcatctctgcatgttttatcaagtgaaaatctgtggctatgcttgagagttttgctctcaatgtgatgtttc
gtaacggttgtagttttctaateccatgcaaacctagGCCGTGTTGGTGA AAGTTATGCCAGTATACGGAGAAGGTGGAT
ATATACAGTATGGCGGTTTCACTCTGGGAGATGTTGACACGAAGATTGGAGCAAAAATGTGAATCCTCGCTGTATGAAGAT
CCGTTCAATGCCACCTTTCTAGAATGCCTATTTGCTCGgtgagaattttctgcattccttgcaacgattagaagcactg
tcatgttgagtagagtttaagtggaaatttctgtgtgtttagTGAATGGCAGAGGATCCCGCTCAGCGACCAACAGCCT
TACAATTGGTTCGATTGCTAGATTTTCAATATGCGTAAAGTCTGCATGATGAACACCTCCGAGCTACGCATTGAATTTGAG
AGCGTTGGGATCCCAGTGTCTATCAACAGACTGCCACACAACCTTGTCGATACGAATACCATAAAAACAGGAGGGCTCATC
ACATTTGTAGTCTGCCTGAAGAAATGATGACTATGCAAGTTTCTGACTCCAGGTCAAAGTTATCTCTGAGAAGAGAACAC
CTGGCGATGGTCAGGATTTTCAATGTTATGTCACCACTGACGCGACTCTTTTCAATCGTCCATCTGATGCCTCTATCTAC
TGCGGGGCAAGATGTGGCAATCGCCTTCGAAAGAGGAGGTTGCTGCGTTAGACATGAAGCTGGTTCCTGCTTCTACG
GCCGTTACCCCTGCTGGCGGTTCAAAGCCCGAGATGGAGTTGTACCATAAACATACTGAGCTGGCGAGGGAGTATATCA
GACTTGACGAGGAGATAAAAACGCTTGAATAAGCTGTGGGACGATAGAGTGACGCAAATTTGTCTCGGAGAAGGGCATTAAA

8. Anhang

CCCAAGCATGTTGACAAGTGGAAAGAACGCATCAGGGAGTACTGCAACCTCTGCGTCATTTTGTGCGGTGAAGTACAAAA
GTCTGGACGCTaaggacactgaaatattgaaactgccatctacgtaaagctgccaataaccggattaacacttttta
ttcatccgataccttcttaacccttctcctcttttaagccatgtcttgtgatgagtctgctgtcatcaatactaggggc
ttatttgttaaa

Danksagung

Herrn Professor Dr. Matthias Frosch, Leiter des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, danke dafür, dass er mir die Durchführung einer Doktorarbeit an seinem Institut ermöglichte und das Erstgutachten übernahm.

Für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kreft, Lehrstuhl für Mikrobiologie des Theodor-Boveri-Instituts.

Besonderer Dank gilt Hr. Prof. Dr. Brehm für die Überlassung des interessanten Themas und seine stete Hilfsbereitschaft. Nicht nur auf wissenschaftlichem Gebiet hat er mich immer tatkräftig unterstützt. Danken möchte ich ihm auch für die wertvollen, oft schon zu vorgerückter Stunde stattfindenden, Diskussionen.

Der Echinokokken-Arbeitsgruppe möchte ich für die schöne Zeit danken. Gerne erinnere ich mich an die gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft in der Gruppe zurück. Danken möchte ich hier auch besonders meinem langjährigen Mitstreiter Markus Spiliotis.

Bei Fr. Prof. Dr. Knaus möchte ich mich dafür bedanken, dass Sie es mir ermöglichte, in Ihrem Labor neue Techniken erlernen zu können. Hier gilt natürlich auch mein Dank Ihrer Arbeitsgruppe für die freundliche Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie, die mich immer in meinen Plänen und Projekten unterstützt hat. Danken möchte ich auch meiner Freundin, die mir bei der deutschen Rechtschreibung und Grammatik geholfen hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders beim Deutschen Akademischen Austauschdienst bedanken, durch dessen Stipendium dieser Forschungsaufenthalt erst ermöglicht wurde. Hier gilt mein besonderer Dank Fr. Mönch, die mir immer hilfsbereit zur Seite stand.

Publikationen

Originalarbeiten

Zavala-Góngora, R., Kroner, A., Knaus, P. & Brehm, K., 2005 A member of the transforming growth factor β receptor family of *Echinococcus multilocularis* functionally interacts with human bone morphogenetic protein 2. *Molecular and Biochemical Parasitology*, in Revision.

Gelmedin, V., **Zavala-Góngora, R.**, Fernandez, C. & Brehm, K., 2005 *Echinococcus multilocularis*: cloning and characterization of a member of the SNW/SKIP family of transcriptional coregulators. *Experimental Parasitology*, 111: 115-120.

Hubert, K., **Zavala-Góngora, R.**, Frosch, M. & Brehm, K., 2004 Identification and characterization of PDZ-1, a N-ERMAD specific interaction partner of the *Echinococcus multilocularis* ERM protein Elp. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134: 149-154

Zavala-Góngora, R., Kroner, A., Wittek, B., Knaus, P. & Brehm, K., 2003 Identification and characterisation of two distinct Smad proteins from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *International Journal for Parasitology*, 33: 1665-1677

Konrad, C., Kroner, A., Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.** & Brehm, K., 2003 Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *International Journal for Parasitology*, 33: 301-312

Übersichtsartikel

Brehm, K., Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.**, Konrad, C., Frosch, M., 2005 The molecular mechanisms of larval cestode development: first steps into an unknown world. *Parasitology International*, in Druck.

Kongreßbeiträge

Brehm, K., Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.**, Konrad, C., Bernthaler, P. Do evolutionary conserved molecules mediate an interaction between *Echinococcus multilocularis* and its mammalian host? Hydra-Meeting on Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites, Hydra, Greece, 06.09.-11.09. 2005

Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.**, Konrad, C., Caballero-Gamiz, R., Kroner, A., Gelmedin, V. & Brehm, K. Receptor kinases and the MAP-kinase cascade of *Echinococcus multilocularis* as possible targets for chemotherapy. 6th Drug Development Seminar on Antiparasitic Chemotherapy; Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, Germany, 28.04.-29.04.2005

Konrad, C., Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.**, Kroner, A., Tappe, D. & Brehm, K. Functional characterization of insulin-, EGF- and TGF- β signaling systems in *Echinococcus multilocularis* and their role in host-parasite-interplay. 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Münster, Germany, 26.09-29.09.2004

Konrad, C., Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.**, Kroner, A. & Brehm, K. Signal transduction systems of *Echinococcus multilocularis* and their role in parasite development and host-parasite interaction. XXIst International Congress of Hydatidology, Nairobi, Kenia, 16.08.-21.08.2004

Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.**, Konrad, C., Kroner, A. & Brehm, K. Molecular characterization of the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis* and the host-parasite interplay in alveolar echinococcosis. International Symposium „Threat of Infection“, Würzburg, Germany, 25.07.-28.07.2004

Zavala-Góngora, R., Kroner, A., Wittek, B., Knaus, P. & Brehm, K. Structural and functional characterization of TGF- β signaling systems in *Echinococcus multilocularis*. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie; Würzburg, Germany, 17.03.-20.03.2004. International Journal of Medical Microbiology (2004) 293 (Suppl. No. 38) 99

Konrad, C., Kroner, A., Tappe, D., Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.** & Brehm, K. Identification and characterization of an insulin receptor homologue from *Echinococcus multilocularis*. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie; Würzburg, Germany, 17.03.-20.03.2004. International Journal of Medical Microbiology (2004) 293 (Suppl. No. 38) 113

Hubert, K., **Zavala-Góngora, R.**, Bergmann, M., Frosch, M. & Brehm, K. Functional characterization of ERM (ezrin/radixin/moesin) signaling mechanisms in the *Echinococcus multilocularis* larval stage. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie; Würzburg, Germany, 17.03.-20.03.2004. International Journal of Medical Microbiology (2004) 293 (Suppl. No. 38) 113

Zavala-Góngora, R., Kroner, A., Knaus, P., & Brehm, K. TGF- β Signal-Transduktionsmechanismen in *Echinococcus multilocularis*. Statusworkshop der Fachgruppe „Eukaryote Krankheitserreger“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Erlangen, Germany, 14.-15.02.2003

Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.**, Konrad, C., Kroner, A., Frosch, M. & Brehm, K. Signal transduction systems of *Echinococcus multilocularis* and their possible role in host-parasite communication. 54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie; Heidelberg, Germany, 06.-10.10.2002; *International Journal of Medical Microbiology* (2002) 292: 257.

Zavala-Góngora, R., Kroner, A., Frosch, M. & Brehm, K. Cloning and characterization of TGF- β signaling components expressed by the *Echinococcus multilocularis* larval stage. Joint annual Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology; Lübeck-Travemünde, Germany, 20-23.03.2002

Brehm, K., Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.**, Kroner, A. & Frosch, M. Molekulare Charakterisierung von Signaltransduktionssystemen des Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis*. Statusworkshop der Fachgruppe „Eukaryontische Krankheitserreger“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie; Hannover, Germany, 08.-09.02.2002

Brehm, K., Spiliotis, M., **Zavala-Góngora, R.**, Kroner, A., Konrad, C., Günthel, D. & Frosch, M. Towards a characterization of the hormone-based interaction between the cestode

Echinococcus multilocularis and its intermediate host. International Meeting on „*Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites*“, Hydra, Greece, 14-19.09.2002

Zavala-Góngora, R., Kroner, A., Frosch, M. & Brehm, K. Cloning and characterization of TGF β signaling components expressed by the *Echinococcus multilocularis* larval stage. 53. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie*; Aachen, Germany, 30.09.-04.10.2001; *International Journal of Medical Microbiology* (2001) 291: P184.

Lebenslauf

Ricardo Zavala Góngora

Geburtsdatum: 05.07.1968

Geburtsort: Poza Rica, Veracruz (Mexiko)

Schulbildung

1986 Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium „Emiliano Zapata“,
Poza Rica/Veracruz (Mexiko)

Hochschulausbildung

1986 – 1991 Biologiestudium an der Universidad Veracruzana, Tuxpan, Mexiko
1991 – 1993 Weiterführende Hochschulkurse an der Universidad Autónoma de Nuevo
León/Monterrey, Mexiko
1993 Abschluss als Diplombiologe an der Universidad Veracruzana, Tuxpan,
Mexiko

Master-Aufbaustudiengang

1993 – 1996 Master of Science in Mikrobiologie an der Universidad Autónoma de Nuevo
León, Mexiko.
Thema: Der durch polymorphkernige Leukozyten vermittelte zytolytische
Effekt der Phospholipase A2 und der zytopathische Effekt einer vesikulären
Fraktion von *Entamoeba histolytica* auf humane Hepatozyten
1996 Abschlussexamen zum Master of Science in Mikrobiologie

Berufserfahrung

1996 – 1999 Forschungsprojekt im Rahmen staatlicher Stipendien am Biomedizinischen
Forschungszentrum, Abteilung für molekulare und Zellbiologie,
Mexikanisches Gesundheitsinstitut, Monterrey, Mexiko
Thema: Klonierung und Sequenzierung einer Lysophospholipase in
Entamoeba histolytica

Promotion

04/2000 Beginn der Dissertation am Institut für Hygiene und Mikrobiologie an der
Universität Würzburg, Prof. Dr. Matthias Frosch i. R. eines DAAD-
Promotions-Stipendium