

Aus dem Institut für Parasitologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Molekularbiologische und immunologische  
Untersuchungen des schützenden Proteins Bp1 aus  
der Mikrofilarienscheide der Filarie *Brugia pahangi***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Constanze Reitzenstein**

Gießen 2003

Aus dem Institut für Parasitologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H. Zahner

**Molekularbiologische und immunologische  
Untersuchungen des schützenden Proteins Bp1 aus  
der Mikrofilarienscheide der Filarie *Brugia pahangi***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Constanze Reitzenstein**  
Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zahner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Wengler

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Januar 2003

***Für Clara und Cécile***

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Literaturübersicht</b>	4
<b>2.1 Lymphatische Filariosen</b>	4
2.1.1 Entwicklung von Filarien	4
2.1.2 Geschichtliche Grundlagen und Verbreitung	4
2.1.3 Die menschliche Lymphatische Filariose und deren Einteilung nach klinischen Gesichtspunkten	6
<b>2.2 Modellinfektionen</b>	9
2.2.1 Infektionen mit <i>Litomosoides sigmodontis</i>	9
2.2.2 Infektionen mit <i>Brugia malayi</i>	10
2.2.3 Infektionen mit <i>Brugia pahangi</i>	11
2.2.4 Die Feline Lymphatische Filariose	12
<b>2.3 Die Mikrofilarienscheide</b>	14
2.3.1 Entstehung, Morphologie und Zusammensetzung der Mikrofilarienscheide	14
2.3.2 Proteine der Mikrofilarienscheide	15
<b>3. Material und Methoden</b>	18
<b>3.1 Versuchstiere</b>	18
3.1.1 <i>Mastomys coucha</i>	18
3.1.2 <i>Sigmodon hispidus</i>	18
3.1.3 Kaninchen	18
<b>3.2 Blutentnahme und Serumgewinnung</b>	19
<b>3.3 Parasit und Infektion</b>	19

---

<b>3.3.1</b>	Zwischenwirte	19
<b>3.3.2</b>	Infektion der Zwischen- und Endwirte	20
<b>3.3.3</b>	Bestimmung der Mikrofilariendichte (RAETHER und MAYERHÖFER, 1967)	20
<b>3.4</b>	<b>Antigengewinnung aus Parasitenmaterial</b>	21
<b>3.4.1</b>	Mikrofilarienantigen	21
<b>3.4.2</b>	Adulte Filarien	22
<b>3.4.3</b>	Mikrofilarienscheiden	22
<b>3.4.4</b>	Embryonalstadien	22
<b>3.5.</b>	<b>Antiseren</b>	23
<b>3.5.1</b>	Herstellung eines Antiserums gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1)	23
<b>3.5.2</b>	Antiseren gegen 2-ME/SDS-lösliche und –unlösliche Komponenten von <i>L. sigmodontis</i> -Mikrofilarienscheiden	23
<b>3.6.</b>	<b>Standardtechniken für Antikörper- oder Antigennachweise</b>	24
<b>3.6.1</b>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
<b>3.6.2</b>	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	26
<b>3.6.3</b>	Westernblottechnik (TOWBIN & GORDON, 1984)	26
<b>3.6.4</b>	Ponceau-S-Färbung	27
<b>3.6.5</b>	Coomassie- Färbung von PVDF-Folien	27
<b>3.6.6</b>	Immunfärbung (Immunoblottechnik)	28
<b>3.6.7</b>	Aufarbeitung von <i>E coli</i> -Zellen	29
<b>3.6.8</b>	Bestimmung der Molekulargewichte	29
<b>3.6.9</b>	Chymotrypsinierung und Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) mit Mikrofilarien	29
<b>3.6.10</b>	Peroxidase-Anti-Peroxidase-Test (PAP-Test)	31
<b>3.7</b>	<b><i>In vitro</i>-Versuche mit Mikrofilarien</b>	32
<b>3.7.1</b>	Mikrofilarien- <i>in vitro</i> -Agglutination (Mikrofilarien-Agglutinations-Assay, MAA)	32
<b>3.7.2</b>	Antikörpervermittelter Zytoadhärenztest an Mikrofilarien	33
<b>3.8</b>	<b>Passive Immunisierung</b>	33

---

<b>3.9</b>	<b>Bakterienkulturen</b>	34
3.9.1	Vermehrung	34
3.9.2	Aufbewahrung („Stab Cultures“, SAMBROOK et al., 1989)	34
<b>3.10</b>	<b>Vermehrung von Phagen-Zellen</b>	34
<b>3.11</b>	<b>Immunoscreening der <math>\lambda</math>gt11/<i>B. pahangi</i>-cDNA-Bank</b>	35
3.11.1	Ausplattieren der cDNA-Genbank	35
3.11.2	Zuordnung positiver Signale, Plaquereinigung	36
3.11.3	Phagentitration („Spot-on“-Verfahren)	36
3.11.4	Plattenlysat-Amplifikation („Wet-Box“)	37
<b>3.12</b>	<b>Isolierung rekombinanter <math>\lambda</math>-DNA</b>	37
<b>3.13</b>	<b>Präzipitation von Nukleinsäuren mittels alkoholischer Fällung</b>	38
3.13.1	Ethanol-fällung von DNA	38
3.13.2	Isopropanol-fällung von DNA	39
<b>3.14</b>	<b>DNA-Aufreinigung</b>	39
3.14.1	„Glasmilch-Verfahren“ (modifiziert nach VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979)	39
3.14.2	Phenol/Chloroformextraktion (SAMBROOK et al., 1989)	40
<b>3.15</b>	<b>Spektrophotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung</b>	41
<b>3.16</b>	<b>Isolierung von Plasmid-DNA</b>	41
3.16.1	Isolierung von Plasmid-DNA über „Minipräparation“	41
3.16.2	„Midipräparation“ von Plasmid-DNA	42
<b>3.17</b>	<b>DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen</b>	42
<b>3.18</b>	<b>Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel</b>	43
<b>3.19</b>	<b>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</b>	44
3.19.1	Gelase-Verfahren	44
3.19.2	„Squeeze-Freeze“-Verfahren	45

---

<b>3.19.3</b>	„Spin-N-Freeze“	45
<b>3.19.4</b>	„Glasmilch-Verfahren“	46
<b>3.19.5</b>	Elektroelution aus Agarosegelen (McDONNELL et al., 1977)	46
<b>3.20</b>	<b>Subklonierung von DNA in Plasmidvektoren</b>	47
<b>3.20.1</b>	Vorbereitung des Plasmidvektors	47
<b>3.20.2</b>	Vektor-Insert-Ligation	48
<b>3.20.3</b>	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> und Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen (modifiziert nach LEDERBERG & COHEN, 1974)	48
<b>3.21</b>	<b>Herstellung des <math>\beta</math>-Galaktosidase-Bp1-Fusionsproteins</b>	50
<b>3.21.1</b>	Transduktion rekombinanter $\lambda$ gt11-Phagen in <i>E. coli</i> Y1089	50
<b>3.21.2</b>	Expression des $\beta$ -Galaktosidase-Bp1-Fusionsproteins	50
<b>3.22</b>	<b>Herstellung einer Genombibliothek von <i>B. pahangi</i> im Phagenvektor <math>\lambda</math>EMBL3</b>	51
<b>3.22.1</b>	Isolierung von genomischer DNA aus adulten <i>B. pahangi</i>	51
<b>3.22.2</b>	Vorbereitung des Phagenvektors	52
<b>3.22.3</b>	Partielle Spaltung genomischer DNA	53
<b>3.22.4</b>	Ligation, <i>in vitro</i> -Verpackung und Amplifikation	53
<b>3.23</b>	<b>Screening der genomischen Bank (Klon-Analyse)</b>	55
<b>3.23.1</b>	Markierungsreaktion („Random-Priming“)	55
<b>3.23.2</b>	Transfer von Plaques auf Nylonmembranen („Plaques lift“)	56
<b>3.23.3</b>	Hybridisierung	56
<b>3.23.4</b>	Autoradiografie	57
<b>3.23.5</b>	Isolierung der mit der markierten Probe hybridisierenden genomischen Klone	58
<b>3.23.6</b>	Spaltung genomischer DNA mit Restriktionsenzymen und gelelektrophoretische Auftrennung	58
<b>3.23.7</b>	DNA-Transfer durch Kapillarblotting	59
<b>3.24</b>	<b>Sequenzierung der DNA nach der Kettenabbruchmethode</b>	60
<b>3.24.1</b>	Sequenzierung der cDNA	60

---

3.24.1.1	Sequenzierungsreaktion/PCR (polymerase chain reaction)	60
3.24.1.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
3.24.1.3	DNA-Transfer durch Kapillarblotting	62
3.24.1.4	Crosslinking	62
3.24.1.5	Chemolumineszenzreaktion	62
<b>3.24.2</b>	<b>Computerunterstützte Sequenzanalyse der genomischen DNA</b>	<b>63</b>
<b>3.25</b>	<b>Computergestützte Homologiesuche</b>	<b>63</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunoscreening der <math>\lambda</math>gt11/<i>B. pahangi</i>-cDNA Bank</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Größenbestimmung, Subklonierung und Sequenzierung des cDNA-Klons Bp1</b>	<b>64</b>
<b>4.3</b>	<b>Screening der genomischen <i>B. pahangi</i>-Bank</b>	<b>65</b>
<b>4.4</b>	<b>Southern Blot Analyse der rekombinaten Phagen-Klone</b>	<b>65</b>
<b>4.5</b>	<b>Subklonierung und Sequenzierung der <i>Pst</i>I-Fragmente (gBp1)</b>	<b>65</b>
<b>4.6</b>	<b>Homologiesuche</b>	<b>67</b>
<b>4.7</b>	<b>Expression des <math>\beta</math>-Galaktosidase-Bp1-Fusionsproteins</b>	<b>73</b>
<b>4.8</b>	<b>Herstellung eines Antiserums gegen das rekombinante Protein</b>	<b>74</b>
<b>4.9</b>	<b>Reaktionen des Antiserums gegen das rekombinante Protein im Immunoblot</b>	<b>74</b>
<b>4.10</b>	<b>Mikrofilarien-Agglutinationsassay</b>	<b>77</b>
<b>4.11</b>	<b>Antikörpervermittelte Zytoadhärenz an Mikrofilarien</b>	<b>77</b>
<b>4.12</b>	<b>Antigennachweis auf Mikrofilarienscheiden im IIFT</b>	<b>82</b>
<b>4.13</b>	<b>Reaktionen gegen das rekombinante Protein im PAP-Test</b>	<b>82</b>
<b>4.14</b>	<b>Einfluss der Antiseren gegen das rekombinante Bp1 und gegen den 2 ME/SDS löslichen Anteil der Mikrofilarienscheide (Anti-s) auf die Mikrofilariämie <i>in vivo</i> und intrauterine Stadien</b>	<b>87</b>

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	90
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	96
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	98
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	100

## Abkürzungen

### Abkürzungen wissenschaftlicher Begriffe

Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle
s.c.	subcutan
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines-Serum-Albumin
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
cDNA	copy-desoxyribonucleic acid
CiP	calf intestine phosphatase
cpm	counts per minute
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
$\lambda$	Lambda-Phage
LB	Luria Bertani
$M_r$	relative Molekülmasse
Mf	Mikrofilarie
mRNA	messenger ribonucleic acid
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming units
p.i.	post infectionem
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur (25° C), reverse transcriptase
SDS	Sodium dodecylsopahte
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamine
U	unit(s)
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4Chloro-3 Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

### **Aminosäuren Nomenklatur**

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

**Artbezeichnungen**Filarien

<i>B.p.</i>	<i>B. pahangi</i>	<i>Brugia pahangi</i>
<i>B.m.</i>	<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
<i>L.c.</i>	<i>L. carinii</i>	<i>Litomosoides carinii</i> (alte Bezeichnung für <i>L. sigmodontis</i> )
<i>L.s.</i>	<i>L. sigmodontis</i>	<i>Litomosoides sigmodontis</i>

Versuchstiere

<i>M. coucha</i>	<i>Mastomys coucha</i>
<i>S. hispidus</i>	<i>Sigmodon hispidus</i>

## 1. Einleitung

Filarien sind endoparasitisch lebende Nematoden, die mit Ausnahme der arktischen Zonen weltweit verbreitet sind und einzelne humanpathogene Arten hervorgebracht haben, zu denen auch Vertreter der Gattung *Brugia* zählen. Die Lymphatische Filariose, eine Erkrankung des Menschen in den Tropen, wird durch eine Infektion mit *Wuchereria bancrofti* und zwei Arten der Gattung *Brugia*, *B. malayi* und *B. timori* hervorgerufen. Dabei handelt es sich um eng verwandte Arten, die sich in der geographischen Verbreitung und in der Übertragung über verschiedene Mückenspezies als Zwischenwirte unterscheiden. Die nach einer Infektion auftretenden Krankheitserscheinungen sind bei den drei oben genannten Filarienarten ähnlich. Im chronischen Fall kommt es zu schweren lymphatischen Obstruktionen mit möglicher Sekundärinfektion. Die Erkrankung tritt in mehr als 80 Ländern auf, vgl. Abb.1 (WHO, 2002). Indien, Bangladesh, Indonesien, die Philippinen, Nigeria, die Demokratische Republik Kongo sowie Madagaskar zählen zu den am schwersten betroffenen Ländern.



**Abb. 1: Verbreitung der Lymphatischen Filariose im Jahr 2000**  
rot: endemische Gebiete, rosa: verdächtige Gebiete  
(WHO 2002)

Im Jahre 2000 waren nach Angaben der WHO (2002) 120 Millionen Menschen infiziert; 1,2 Milliarden Menschen leben mit dem Risiko einer Erkrankung. Die Erkrankung betrifft vorwiegend die Einwohner der Slums und ländlichen Gebiete und trägt entscheidend zur Armut bei. Es sind hauptsächlich Erwachsene mittleren Alters betroffen, so dass erhebliche sozioökonomische Konsequenzen auftreten. Die Menschen leben mit Behinderungen und müssen soziale Stigmatisierung ertragen. Die Behandlungen (meist operative Eingriffe) verursachen hohe Kosten. In Indien entsteht jährlich allein durch Lymphatische Filariose ein Verlust von einer Milliarde \$ (WHO, 2002).

Eine Behandlung mit Diethylcarbamazin oder Ivermectin, Substanzen, die vorwiegend mikrofilarizid wirken, kann die Parasiten im Wirt effektiv bekämpfen, ist aber mit Nebenwirkungen verbunden, u.a. weil von den sterbenden Mikrofilarien Antigene freigesetzt werden (PACQUE et al., 1989; OTTESEN, 1987b; GREENE, 1985), die im sensibilisierten Wirt

Überempfindlichkeitsreaktionen auslösen können. Überlebende Adulte können nach der Behandlung weiterhin Mikrofilarien entlassen (GREENE et al., 1985).

Alle bisherigen Ansätze zur Eradikation der Erkrankung haben nicht zu befriedigenden Erfolgen geführt, so dass es erforderlich ist, die Grundlagenforschung auszudehnen, um langfristig neue Wege zur Prophylaxe zu finden.

Eine Erschwernis bei der Entwicklung von Vakzinen gegen Filarien besteht darin, dass die meisten Arten ein extrem enges Wirtsspektrum aufweisen. Zahlreiche Antigene von Filarien konnten zwar bisher kloniert werden, zur Überprüfung auf schützende Immunität müssen jedoch Tiermodelle herangezogen werden. Da die Pathologie von Filariosen weitgehend auf Immunantworten des Wirts zurückzuführen ist (MAIZELS et al., 1987; OTTESEN, 1980; PIESSENS et al., 1980), besitzen Tiermodelle meist nur eine begrenzte Aussagekraft.

Parasitenmaterial von *B. malayi* kann in ausreichender Menge aus Labortieren gewonnen werden. Dieses Infektionsmodell kann aber nicht herangezogen werden, um zu klären, wie der Wirt Mensch auf den Parasiten reagiert, was im Hinblick auf die klinischen Konsequenzen der Infektion, der Möglichkeit der Diagnose und Prophylaxe von Bedeutung ist. *W. bancrofti* konnte bisher nicht auf Labornager übertragen werden. Das zu Versuchszwecken nur spärlich zur Verfügung stehende Material stammt von infizierten Menschen, dem natürlichen Zwischenwirt (Mücken) sowie experimentell infizierten Affen (*Presbytis cristatus*, PALMIERI et al., 1982; LOK & ABRAHAM, 1992; *Macaca cyclopis*, CROSS et al., 1974).

Der eng verwandte Parasit *Brugia pahangi* kann gleichfalls im Labor in ausreichenden Quantitäten erzeugt werden und stellt auch für immunpathologische Untersuchungen ein nützliches Modellsystem dar. So zeigen wiederholt mit *B. pahangi* Larven 3 infizierte Katzen nach DENHAM et al. (1992) Symptome und pathophysiologische Veränderungen, die der Lymphatischen Filariose des Menschen entsprechen. Es können sogar die verschiedenen klassischen Manifestationsformen unterschieden werden (SNOWDEN & HAMMERBERG 1987, 1989; DENHAM et al., 1972a, 1972b, 1975, 1983, 1987; ROGERS & DENHAM 1974, ROGERS et al., 1975a, 1975b). Entwicklungsgeschichtlich stehen sich *B. pahangi* und *B. malayi* noch sehr nahe; so sind ihre Oberflächenantigene hochgradig homolog (MAIZELS et al., 1983).

Die im Lymphsystem des Wirtes parasitierenden adulten weiblichen Filarien, die eine Lebensdauer von acht oder mehr Jahren (LEEWIN, 1962) aufweisen können, produzieren Millionen von Mikrofilarien (L 1), die in die Blutbahn gelangen. Diese von einer „Scheide“ als äußerste Hülle umgebenen Stadien benötigen für ihr Überleben im Wirt verschiedene Strategien, um vom Immunsystem nicht eliminiert zu werden.

Bisher liegen bereits detaillierte Kenntnisse über die biochemische Zusammensetzung der Mikrofilarienscheide vor (BARDEHLE, 1990; HINTZ, 1995). Die einzelnen Proteinkomponenten und Antigene der Scheide konnten modellhaft vor allem an dem Nagerparasiten *Litomosoides sigmodontis* (CONRATHS et al., 1993; SCHÜTZLE, 1994; SCHARES et al., 1994; HIRZMANN, 1997; DAFA`ALLA, 1997; DAFA`ALLA et al., 2000) studiert werden.

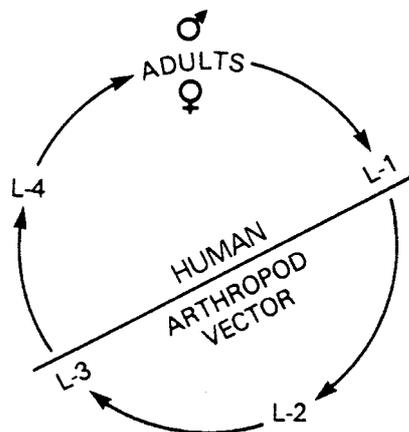
Ziel der Untersuchungen ist es, Strukturen der Scheide zu definieren, die mit dem Immunsystem des Wirts in Wechselwirkung treten. In der vorliegenden Arbeit wird ein Scheidenantigen des Parasiten *Brugia pahangi* mit molekularbiologischen und immunologischen Methoden charakterisiert. Es wird geprüft, ob das Protein an der Oberfläche der Mikrofilarienscheide zugänglich ist und ein schützendes Antigen darstellt. Um mögliche Homologien zu den bereits intensiver erforschten Mikrofilarienscheidenproteinen der Parasiten *L. sigmodontis* und *B. malayi* aufzufinden, wurden auch vergleichende Untersuchungen durchgeführt.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Lymphatische Filariosen

#### 2.1.1 Entwicklung von Filarien

Bis zum Heranreifen zum adulten Nematoden werden 4 Larvenstadien (vgl. Abb. 2) durchlaufen. Die Larve 1 wird bei Filarien auch als Mikrofilarie bezeichnet. Diese wird bei einer Blutmahlzeit von Arthropoden aufgenommen und entwickelt sich im Vektor über die Larve 2 zur metazyklischen Drittlarve. Letztere wird bei einer weiteren Blutmahlzeit auf den Endwirt übertragen, wo eine Weiterentwicklung über das 4. Larvalstadium zur adulten Filarie erfolgt. Einzelne Parasiten überleben im Wirt bis zu acht Jahre oder länger (LEEUWIN, 1962).



**Abb. 2:**

Lebenszyklus von Filarien

(OTTESEN, 1987b)

#### 2.1.2 Geschichtliche Grundlagen und Verbreitung

Die Lymphatische Filariose des Menschen stellt eine weitverbreitete Tropenkrankheit dar, die durch verschiedene hämatophage Arthropoden als Vektoren übertragen wird (siehe Tab.1). Ein Erreger der Erkrankung, *W. bancrofti*, rückte bereits Ende des 19. Jahrhunderts in den Mittelpunkt des Interesses: zunächst wurden die Mikrofilarien im Blut des Menschen von Demaquay 1863 (McMAHON & SIMONSEN, 1996) beschrieben. Wucherer fand 1868 Mikrofilarien im Urin eines Patienten mit Hämatochylurie. Adulte Parasiten wurden zuerst von Bancroft (1876) gefunden und von Cobbold (1877) beschrieben. 1878 vermutete Manson eine Übertragung durch Mücken als Vektoren. Er bemerkte die nächtliche Periodizität der *W. bancrofti*-Mikrofilarien im Blut (SASA, 1976). Erst in diesem Jahrhundert wurden bei vergleichenden morphologischen Untersuchungen adulter Parasiten nunmehr drei human-

pathogene Arten (vgl. Tab. 1) unterschieden (*B. malayi*: BRUG, 1927; *B. timori*: PARTONO et al., 1977).

Die für den Endwirt infektiösen Larven 3 der einzelnen Arten sowie deren im Blut des Endwirts zirkulierenden Mikrofilarien sind morphologisch schwer voneinander zu unterscheiden und teilweise auch schwierig von für Menschen apathogenen *Brugia*-Arten abzugrenzen (WHO, 1992). Die genaue Differenzierung ist mit Hilfe von DNA-Sonden (POOLE & WILLIAMS, 1990, WILLIAMS et al., 1988) und monoklonalen Antikörpern (CARLOW et al., 1987) erleichtert worden.

Bis jetzt wurden 10 *Brugia*-Arten beschrieben, davon parasitieren acht (auch *B. pahangi*) in tierischen Endwirten (WHO, 1992). Fünf der beim Tier beschriebenen *Brugia*-Arten kommen in Asien und dem Pazifik vor, so dass die Differenzierung des endemisch ebenfalls in diesem Gebiet verbreiteten Parasiten *B. malayi* erschwert wird. Zwei Arten (*B. timori* und *B. malayi*) infizieren Menschen auf natürlichem Weg. *B. pahangi* ist experimentell infektiös für den Menschen, obwohl bisher keine natürlichen Infektionen gesichert nachgewiesen werden konnten (WHO 1992).

**Tab. 1: Erreger der menschlichen Lymphatischen Filariose und deren Verbreitung**

Spezies	Wirte	Vektoren	Verbreitung
<i>W. bancrofti</i>	Mensch	Mücken (hauptsächlich: <i>Culex quinquefasciatus</i> , <i>Anopheles</i> spp., <i>Aedes</i> spp.)	Tropen
<i>B. malayi</i>	Mensch, Affen, andere Wild- und Haustiere	Mücken (hauptsächlich: <i>Mansonioides</i> spp., <i>Anopheles</i> spp.)	Süd-China, Indien, Sri Lanka, Indonesien, Timor, Korea, Malaysia, Philippinen, Thailand, Koshima Island (Japan)
<i>B. timori</i>	Mensch	Mücken (hauptsächlich: <i>Anopheles barbirostris</i> )	Indonesien (Timor, Flores, Rote Alor)

Zusammengestellt nach MAK (1987); McMAHON & SIMONSEN (1996); WHO (1992)

### 2.1.3 Die menschliche Lymphatische Filariose und deren Einteilung nach klinischen Gesichtspunkten

Die Symptomatik der Lymphatischen Filariose des Menschen ist vielfältig. Es reicht von Symptomlosigkeit bis zu schweren obstruktiven Veränderungen. Das Paradoxon dieser Erkrankung stellt die oft inverse Beziehung zwischen der Parasitendichte (Menge zirkulierender Mikrofilarien im Blut) und der Schwere der Erkrankung dar, da die chronisch schwer erkrankten Personen meist amikrofilariämisch sind. Nicht jede exponierte und infizierte Person entwickelt Symptome. Manche Personen zeigen eine hohe Mikrofilariendichte im Blut, bleiben aber (teils lebenslang) symptomfrei.

LICHTENBERG vermutete bereits 1956 einen Zusammenhang der pathologischen Veränderungen, die im Verlauf einer menschlichen Lymphatischen Filariose auftreten können, mit der Immunantwort des Wirts auf die Parasiten. PARTONO (1987) teilt die Erkrankung nach pathophysiologischen Gesichtspunkten in zwei Kategorien ein: Das eine „Syndrom“ wird durch Adulte oder sich entwickelnde Adulte verursacht und wird als „Klassische Filariose“ betrachtet. Das andere ist durch die Überreaktion des Immunsystems des menschlichen Wirtes gegen die Mikrofilarien charakterisiert (Okkulte Filariose und **Tropische Pulmonale Eosinophilie (TPE)**). OTTESEN (1987a) vermutete, dass ein Teil der Symptome der Lymphatischen Filariose durch Immunreaktionen gegen Mikrofilarien verursacht werden, die vom Wirt eliminiert werden und bezieht sich dabei auf Beobachtungen von VAN DELLEN et al. (1985). DENHAM & FLETCHER (1987) sieht in der Okkulten Filariose zwei verschiedene amikrofilariämische Formen: TPE auf der einen Seite und eine Erkrankung, die sich in Lymphangitis und Lymphadenitis äußert, auf der anderen. MAIZELS et al. (1995) erkennen ein Spektrum klinischer Krankheitsbilder mit zwei Schwerpunkten: Eine Form, die geprägt ist von asymptomatischer Mikrofilariämie mit hoher Parasitendichte und reversibler Immuntoleranz (geringe T-Zellproliferation, insbesondere der Th1-Zellpopulation sowie hohe filarienspezifische IgG4-Titer) und die amikrofilariämische chronische Erkrankung, die sowohl durch den Parasiten wie durch die Immunreaktion bedingt ist (verstärkte zelluläre Reaktionen, humorale Immunantwort, überwiegend IgG1-,2- und 3- Isotypen).

Die derzeit meist verwendete Einteilung bezieht sich auf unterschiedliche Muster von Immunreaktionen, die bei in endemischen Gebieten lebenden Individuen auftreten und geht auf OTTESEN (1984) zurück:

### 1. Asymptomatische Infektion mit bestehender Mikrofilariämie:

Diese Personen weisen hohe Mikrofilarienspiegel im Blut auf, zeigen aber jahrelang (manchmal lebenslang) keine Symptome. Nach OTTESEN et al. (1977) und PIESSENS et al. (1980) reagieren Lymphozyten dieser Individuen *in vitro* nicht signifikant auf Filarienantigene. Filarienspezifische Antikörper sind nur in geringer Konzentration vorhanden oder fehlen völlig (OTTESEN et al., 1982; MCGREEVY et al., 1980). Nach OTTESEN (1984) würde das Vorhandensein eines „überreaktiven“ Suppressormechanismus, der die Immunantwort auf den Parasiten hemmt, diese Manifestationsform erklären.

### 2. Lymphatische Filariose:

a. **Akute klinische Manifestation:** Hier stehen Lymphangitis (meist retrograd) und -adenitis, Fieber, Schüttelfrost, Mattigkeit - mehrmals im Jahr sich wiederholend - im Vordergrund. Bei mit *W. bancrofti* infizierten Männern äußert sich diese Form meist als akute Epididymo-Orchitis. Fälle mit entzündlichen Knoten in den Brüsten, Skrotum und subkutanem Bindegewebe - wahrscheinlich Folgen von Entzündungsreaktionen um adulte oder sich entwickelnde adulte Parasiten - sind ebenfalls dokumentiert (WHO, 1992). Besonders starke Entzündungsreaktionen gegen Larven und Adultwürmer zeigen Infizierte aus Nicht-Endemiegebieten (WHARTMAN, 1947; PARTONO & PURNOMO, 1978).

b. **Chronische klinische Manifestation:** mit Hydrozele, Chylurie (evtl. mit Hämaturie), Lymphödemen und Elephantiasis. Chronische Epididymitis, Funikulitis und lymphödematöse Verdickung der Skrotalhaut treten bei genitaler Manifestation einer *W. bancrofti*-Infektion auf. Lymphödem und schließlich Elephantiasis der Extremitäten (meist ist unilateral eine Gliedmaße betroffen) führen zu schweren Entstellungen der erkrankten Personen. Sekundärinfektionen (Bakterien und Pilze) sind häufig (WHO, 1992). Das Krankheitsbild wird geprägt durch die chronisch obstruktive Lymphangitis und -adenitis. Die Symptome zeigen sich etwa 10-15 Jahre nach der akuten Erkrankung bei Personen aus endemischen Gebieten und nach etwa ein bis zwei Jahren bei Infizierten aus Nicht-Endemiegebieten (PARTONO & PURNOMO, 1978).

Nach OTTESEN (1980) und KLEI et al. (1981) besteht eine direkte Korrelation der Schwere der Schädigung des lymphatischen Gewebes und der Immunantwort des Wirtes. Je besser die Parasiten vom Immunsystem des Wirtes erkannt werden (d.h. je geringer die Immunsuppression), desto eher kommt es zu lokalen Entzündungsreaktionen mit Schädigung des Lymphsystems (OTTESEN, 1984). An der Immunreaktion ist sowohl die zelluläre als auch die humorale Abwehr beteiligt (OTTESEN et al., 1977; PIESSENS et al., 1980; OTTESEN et

al., 1982). Patienten mit klinisch manifester Lymphatischer Filariose sind aufgrund mikrofilarienspezifischer Antikörper selten mikrofilariämisch (OTTESEN, 1984).

### 3. *Tropische Pulmonale Eosinophilie (TPE):*

Weniger als 1% der an Lymphatischer Filariose erkrankten Personen leiden an TPE (OTTESEN, 1984). Männer sind zweimal häufiger betroffen als Frauen, Kinder erkranken noch seltener (WHO, 1992). Die TPE wird als klassisches Beispiel einer Okkulten Filariose angesehen. Lungenbeschwerden (vorwiegend nächtliche Hustenanfälle) stehen hier im Vordergrund. Die Patienten zeigen eine immunologische Hyperreaktivität gegen alle Filarienantigene, besonders aber gegen Mikrofilarienantigene (OTTESEN et al., 1979). Die filarienspezifischen Immunglobuline aller Klassen insbesondere IgE sind erhöht. Es besteht oft extreme Bluteosinophilie (3000-50.000 Zellen/mm<sup>3</sup> Blut), aber die Schwere der Symptome korreliert nicht mit der Höhe der Eosinophilie.

TPE-Patienten sprechen gut auf eine Behandlung mit Diethylcarbamazin (DEC) an. Unbehandelt entsteht eine chronische Lungenfibrose.

### 4. Asymptomatische amikrofilariämische Form:

Die sehr heterogene Gruppe umfaßt Personen, die in endemischen Gebieten leben (d.h. einem hohen Infektionsdruck ausgesetzt sind) und bei denen weder parasitäre Stadien noch klinische Symptome, jedoch in unterschiedlichem Maß spezifische Antikörper vorhanden sind. Ein Teil dieser Population umfaßt subklinisch Infizierte (amikrofilariämisch, mit nachweislich Filarienantigen im Blut), die interessanteste Fraktion aber bilden Personen, die als immun gelten können: hier finden sich starke zelluläre Immunreaktionen gegen Filarienantigene (OTTESEN et al., 1977) und hohe filarienspezifische Antikörperspiegel (OTTESEN et al., 1982).

## 2.2 Modellinfektionen

### 2.2.1 Infektionen mit *Litomosoides sigmodontis* (TRAVASSOS, 1919)

Die Baumwollrattenfilarie *L. sigmodontis* wird als Modellfilarie häufig eingesetzt (CULBERTSON & ROSE; 1944; LOK & ABRAHAM, 1992). Die Übertragung erfolgt durch eine tropische Milbenart (*Bdellonyssus bacoti*; HIRST, 1913; WILLIAMS & BROWN, 1946). *L. sigmodontis* kann im Labor außer im natürlichen Endwirt, der aus dem Süden der USA stammenden Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*), auch in verschiedenen anderen Nagetieren gehalten werden (HAWKING & BURROUGHS 1946; SINGH & RAGHAVAN, 1962; WENK & HEIMBURGER, 1967; SCHÜTZE et al., 1970), z.B. in der Vielzitzenmaus *Mastomys coucha* (Smith 1834; LÄMMLER et al., 1968; PRINGLE & KING, 1968).

Der Entwicklungszyklus von *L. sigmodontis* wurde von SCOTT (1946), CROSS & SCOTT (1947), WILLIAMS (1948) sowie SCOTT et al. (1951) beschrieben. Die von den in der Pleurahöhle lebenden adulten Weibchen freigesetzten Larven 1 (Mikrofilarien; 70-90 µm x 5-6 µm) zirkulieren im Blut des Endwirts und werden bei der Blutmahlzeit von den hämatophagen Milben aufgenommen. In der Milbe finden zwei Häutungen zu für den Endwirt infektiösen (metazyklischen) Larven 3 statt. Der Endwirt infiziert sich beim erneuten Saugakt der Milbe. Die Larven 3 gelangen über die Lymphe in den regionalen Lymphknoten und über den *Ductus thoracicus* in das venöse System. Nach der Passage des rechten Herzens und der Lunge wird die Pleurahöhle erreicht (WENK, 1967), wo nach zwei Häutungen (10-15 Tage p.i. und 23-24 Tage p.i.) Präadulte entstehen, die sich bis zum 46. Tag p.i. zu adulten Parasiten differenzieren. Während die adulten Weibchen eine Länge von ca. 8-10 cm erreichen, weisen adulte Männchen nur eine Länge von ca. 2,2-2,3 cm auf. Die Präpatenz, d.h. der Zeitraum von der Infektion bis zum Auftreten der ersten nachweisbaren Mikrofilarien im Blut beträgt 50-52 Tage (LÄMMLER et al., 1968; PRINGLE & KING, 1968). Ein Maximum der Mikrofilariendichte im Blut wird meist 120-150 Tage p.i. erreicht; danach fallen die Dichten allmählich ab (LÄMMLER et al., 1968). Eine Periodizität - d.h. eine mit der Tageszeit sich verändernde Mikrofilariendichte im Blut - besteht nicht (BELL & BROWN, 1945). 240-300 Tage p.i. werden die meisten Tiere wieder amikrofilärämisch. LÄMMLER et al. (1968) weisen aber bis zu 500 Tage p.i. noch adulte Parasiten nach.

### 2.2.2 Infektionen mit *Brugia malayi* (BRUG, 1927)

LAING et al. (1960) fanden bei epidemiologischen Studien im natürlichen Verbreitungsgebiet von *B. malayi* in Malaysia außer dem Menschen verschiedene Haus- und Wildtiere als Endwirte: verschiedene Primaten, wie Javaneraffen (*Macaca irus*) und Brillenlanguren (*Presbytis obscurus*), Karnivoren, wie die Hauskatze (*Felis catus*) und den Fleckenmusang (*Paradoxurus hermaphroditus*) sowie einen Vertreter der Edentata, das Javanische Schuppentier (*Manis javanica*). Diese wiesen Mikrofilarien im Blut auf.

Die experimentelle Übertragung von *B. malayi* vom Menschen auf die Hauskatze gelang EDESON & WHARTON (1957) in Malaysia und ermöglichte erstmals die nähere morphologische Untersuchung adulter Parasiten. So konnte BUCKLEY (1960) für die bis dato bekannten Spezies *B. malayi* (BRUG, 1927), *B. pahangi* (BUCKLEY & EDESON, 1956) und *B. patei* (BUCKLEY, NELSON & HEISCH, 1958) - vormals aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit dem Genus *Wuchereria* zugeordnet - das neue Genus *Brugia* definieren.

Die adulten Weibchen, die sich vorzugsweise in den Lymphknoten und -bahnen des Beckens, der Extremitäten und der Genitalien (EDESON & BUCKLEY, 1959) aufhalten und im Wirt mehr als 5 Jahre überleben können (GRENFELL et al., 1991), produzieren bescheidete Mikrofilarien (Länge ca. 170-230 µm; LAING et al., 1960), die sich nach ca. 80-100 Tagen im peripheren Blut nachweisen (EDESON & BUCKLEY, 1959) lassen. Bei der experimentellen Infektion von Labornagern bleibt die hohe Mikrofilariendichte im Blut über 5-26 Wochen bestehen (ASH & RILEY, 1970b).

In den endemischen Gebieten nehmen vor allem Mücken des Subgenus *Mansonioides* (Süd- und Südostasien) und des Genus *Anopheles* (Süd- und Südostasien) bei der Blutmahlzeit Mikrofilarien auf.

Nach subkutaner Infektion von Hauskatzen wiesen EDESON & BUCKLEY (1959) in das Lymphsystem migrierte infektiöse Larven (Larven 3) schon innerhalb von 16 Stunden p.i. nach. Sie beobachteten zwei Häutungen (zur Larve 4: 9.-10. Tag p.i.; nach ASH & RILEY (1970b) am 7.-8. Tag p.i. bei der experimentellen Infektion des Gerbils) und zum Präadulten 35.-40. Tag p.i. (bzw. am 29.-35. Tag p.i. im Gerbil bei ASH & RILEY, 1970b). Die Weibchen erreichten ihre endgültige Größe nach ca. 280 Tagen (5-10 cm, GRENFELL et al., 1991), während die Männchen nach ca. dem 64. Tag im Größenwachstum mehr oder weniger stagnierten.

### 2.2.3 Infektionen mit *Brugia pahangi* (BUCKLEY & EDESON, 1956)

*B. pahangi* ist eine *Brugia*-Spezies, die - nach East Pahang, einem Gebiet in Malaysia benannt - zuerst von BUCKLEY & EDESON (1956) beschrieben wurde. Sie isolierten adulte Parasiten aus natürlich infizierten Katzen und Hunden.

*B. pahangi*-Weibchen können in infizierten Katzen 7-8 Jahren überleben und erreichen eine Länge von 3-7 cm (GRENFELL et al., 1991), die Männchen von 1,3-1,7 cm (SCHACHER, 1962). Die Mikrofilarien von *B. pahangi* weisen eine Länge von 215-270 µm auf (LAING et al., 1960).

Die Entwicklung des Parasiten in der Katze ist insbesondere von SCHACHER (1962) beschrieben worden. Entwicklungsgeschichtlich stehen sich *B. pahangi* und *B. malayi* sehr nahe; so sind beide hinsichtlich ihrer Oberflächenantigene hochgradig homolog (MAIZELS et al., 1983).

Die geographische Verbreitung von *B. pahangi* überschneidet sich mit der von *B. malayi* (Indonesien und Malaysia; WHO, 1992). Da beide Spezies zudem durch hämatophage Arthropoden des gleichen Genus (*Mansonia*) übertragen werden und sich natürliche Endwirte teilen, können Mischinfektionen bei Wild- und Haustieren auftreten. LAING et al. (1960) beschrieben Mischinfektionen in Haus- und Bengalkatzen sowie in Javanischen Schuppentieren (*Manis javanica*). Natürliche Infektionen wurden im Verbreitungsgebiet außer in Hauskatze und -hund auch bei anderen Karnivoren wie dem Tiger, verschiedenen Palmenrollern (Fleckenmusang, Fleckenroller, Binturong) und der Indien-Zibetkatze, bei Primaten, wie dem Plumplori (*Nycticebus coucang*) und bei Insektivoren, wie dem Haarigel (*Echinosorex gym-nurus*) und Nagetieren, wie den Riesenhörnchen (*Ratufa* spp.), gefunden (LAING et al., 1960).

Trotz der oben genannten Gemeinsamkeiten mit *B. malayi* konnte der Beweis, dass es sich bei *B. pahangi* um einen Zoonoseerreger handelt, bisher nicht endgültig erbracht werden, obwohl auf Borneo (Indonesien) Fälle einer natürlichen Infektion bei dort ansässigen Menschen beschrieben wurden (PALMIERI et al., 1985). Die Zuverlässigkeit dieser Untersuchung ist umstritten, da die Parasitenspezies nicht durch detaillierte morphologische Studien bestätigt wurde. Die experimentelle Übertragung auf den Menschen ist dagegen belegt (EDESON et al., 1960b) und führt zu Mikrofilariämie (WHO, 1992). In einem Fall resultierte die Übertragung auf eine freiwillige Versuchsperson (BUCKLEY, 1958) in einem Krankheitsbild vergleichbar mit TPE, einer Manifestationsform der Lymphatischen Filariose (vgl. 2.1.3.).

Für Versuchszwecke eignen sich außer den gut für die Haltung im Labor geeigneten Endwirten Gerbils (*Meriones unguiculatus*; ASH & RILEY, 1970a), Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*; RAMACHANDRAN & PACHECO, 1965) und Vielzitzenmäusen (*Mastomys coucha*;

AHMED, 1967) insbesondere die natürlichen Endwirte Hund und Katze zur Etablierung eines Modellsystems, da sich die Parasiten hier nicht nur entwickeln, sondern auch Immunreaktionen des Wirts zu beobachten sind, die denen bei mit *Brugia malayi*-, *B. timori*- und *W. bancrofti*-infizierten Menschen (Lymphatische Filariose) sehr ähnlich sind (SNOWDEN & HAMMERBERG, 1987, 1989; DENHAM et al., 1972a, 1972b, 1975, 1983, 1987; ROGERS & DENHAM, 1974; ROGERS et al., 1975a, 1975b). GRENFELL et al. (1991) bezeichnen die Erkrankung der Katze als Feline Lymphatische Filariose und stellen diese der humanen Form im direkten Vergleich gegenüber.

LAWRENCE & DENHAM (1992, 1993) wiesen bei Ratten nach, dass die Population adulter *B. pahangi* und die Mikrofilarien von getrennten Immunmechanismen kontrolliert werden.

Auch bei Labornagern können Organschädigungen durch die nach einer Filarieninfektion einsetzende Immunreaktion auftreten. KLEI et al. (1974) sowie KLEI & CROWELL (1981) beschrieben pathologische Veränderungen in Nieren, Leber und Milz *B. pahangi*-infizierter Gerbils. So treten in der Patenz filarienassoziierte Granulome in der Leber auf, wie sie auch bei infizierten Menschen beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen finden sich auch bei AH & THOMPSON (1973) sowie MALONE et al. (1976). Als Ursache der von KLEI & CROWELL (1981) beobachteten filarieninduzierten Amyloidose (Milz) vermuten diese die langanhaltende Immunstimulation durch Mikrofilarien und/ oder exkretorisch-sekretorische Antigene der Parasiten. Die Autoren weisen auf einen Zusammenhang von Immunsuppression und Amyloidose hin, mit einem Hinweis auf Untersuchungen von DRUET & JANIGAN (1966), HARDT, (1971) sowie HARDT & CLAEISSON (1971). So beschleunigt eine Immunsuppression eine Sekundäre Amyloidose, umgekehrt zeigen Mäuse mit Amyloidose eine verminderte Abstoßungsreaktion nach Hauttransplantation. KLEI & CROWELL (1981) verweisen auf das Auftreten einer Sekundären Amyloidose beim Menschen in Verbindung mit einer *W. bancrofti*-Infektion in Papua-Neuguinea.

#### 2.2.4 Die Feline Lymphatische Filariose

Die mit *B. pahangi* infizierte Katze kann offensichtlich als Modell für die menschliche Lymphatische Filariose dienen (DENHAM et al., 1972a, 1972b, 1975, 1983, 1987; ROGERS & DENHAM, 1974, ROGERS et al., 1975a, 1975b; PONNUDURAI et al., 1974; FLETCHER et al., 1986, 1992; GRENFELL et al., 1991), in dem es möglich ist, die Wechselwirkungen zwischen Infektion, Immunität und Erkrankung näher zu untersuchen.

Nach subkutaner Injektion in das Hinterbein der Katze oder durch eine Infektion mittels Nadelstich und Auftropfen einer L3-haltigen Lösung auf die Haut (EWERT & SINGH, 1969), wandern die infektiösen Larven innerhalb weniger Stunden in das Lymphsystem ein und

verweilen im Perinodalsinus des der Inokulationsstelle nächstgelegenen Lymphknotens für ca. 20 Tage (SUSWILLO et al., 1982). Sie kehren dann in die afferenten Lymphe zurück, wo sie - nach Injektion in das Hinterbein - bis in den Pfotenbereich wandern, sich zu Adulten entwickeln und Mikrofilarien freisetzen (SUSWILLO et al., 1982; EWERT & EL BIHARI, 1971). Innerhalb von vier Tagen nach Einwanderung in die Lymphe sind erste histopathologische Veränderungen im betroffenen Lymphknoten zu beobachten (DENHAM & ROGERS, 1975). Als Folge der Immunreaktion (ROGERS et al., 1975a, 1975b) ist der regionale Lymphknoten stark vergrößert. Innerhalb von zwei Wochen nach der Infektion ist eine Dilatation der betroffenen Lymphgefäße zu beobachten, wobei die anfänglich akute entzündliche Reaktion, die in Lymphgefäßwand und -lumen zu beobachten ist, innerhalb von 4 Monaten in eine chronische Entzündung übergeht (ROGERS & DENHAM, 1974). Die Veränderungen wurden auch von SCHACHER & SAHYOUN (1967) beschrieben. Der Durchmesser der Lymphgefäße ist bis zu 10-fach vergrößert (DENHAM & ROGERS, 1975).

Parasiten, die innerhalb von drei Wochen nach der Infektion nicht vom Immunsystem des Wirts eliminiert werden, können bis zu 10 Jahre im Wirt persistieren (WILSON & RAMACHANDRAN, 1971) und Mikrofilarien freisetzen. In wöchentlichen Intervallen infizierte Katzen können amikrofilärämisch werden (DENHAM et al., 1972b; DENHAM & FLETCHER, 1987) und zeigen vergleichbar der Lymphatischen Filariose des Menschen Lymphödeme. Manche Katzen aber weisen weiterhin hohe Mikrofilariendichten auf und bleiben klinisch symptomfrei, ein Phänomen, das bei der asymptomatisch-mikrofilärämischen Manifestationsform der menschlichen Lymphatischen Filariose auftritt. Wenn das Immunsystem postmikrofilärämischer Katzen mit infektiösen Larven erneut konfrontiert wird, werden die meisten dieser Parasiten innerhalb weniger Stunden eliminiert, nur wenige überleben - längstens aber 28 Tage (DENHAM, et al., 1983). DENHAM & FLETCHER (1987) vermuteten, dass diese anschließend eliminierten Filarien für die progressiven Veränderungen bei der Chronischen Lymphatischen Filariose des Menschen verantwortlich sind.

Eine Reduktion oder Eliminierung von Mikrofilarien kann in mikrofilärämischen Katzen durch Injektion von Serum oder IgG (besonders IgG1) aus infizierten amikrofilärämischen Tieren erreicht werden (MEDEIROS et al, 1996). Die Wirkung basiert auf einer antikörperabhängigen zellvermittelten zytotoxischen Reaktion (ADCC). *In vitro* reagieren IgG1-Antikörper von Seren derart behandelter Katzen mit der Mikrofilarienscheide (MEDEIROS et al., 1996).

## 2.3 Die Mikrofilarienscheide

### 2.3.1 Entstehung, Morphologie und Zusammensetzung der Mikrofilarienscheide

*L. sigmodontis*-, *B. malayi*- und *B. pahangi*- Weibchen bringen (wie *Wuchereria bancrofti*) bescheidete Mikrofilarien hervor, während bei anderen Filariengattungen (*Onchocerca*, *Mansonella*, *Dirofilaria*, *Dipetalonema*) die Larven 1 unbescheidet in die Blutzirkulation oder Haut gelangen (VINCENT et al., 1975; BAIN, 1975; MARTINEZ-PALOMO, 1978).

Untersuchungen über die intrauterine Entwicklung von Mikrofilarien liegen von verschiedenen Autoren vor (TERRY et al., 1961; KERSHAW, 1948; McFADZEAN & SMILES, 1956; TAYLOR, 1960; NEAFIE, 1972), darunter für *B. pahangi* von ROGERS et al. (1976). Die Ultrastruktur ausgereifter *B. pahangi*-Mikrofilarien wurde von LAURENCE & SIMPSON (1974) und SUGURI (1977) beschrieben. Vergleichende elektronenoptische Studien der Eihülle und Mikrofilarienscheide von *B. malayi* wurden von ZAMAN (1987) und SCHRAERMEYER et al. (1987a) durchgeführt.

Die bei *Brugia* 42 nm dicke Mikrofilarienscheide leitet sich von der embryonalen Eihülle ab (ROGERS et al., 1976; SELKIRK et al., 1986; SCHRAERMEYER et al., 1987a), wobei an deren Entstehung nach Beobachtungen von ROGERS et al. (1976) und SCHRAERMEYER et al. (1987a) nicht nur die sich entwickelnde Mikrofilarie beteiligt ist (die die sog. homogene „Basisschicht“ bildet), sondern zu der auch Zellen des Uterusepithels beitragen, indem sie eine elektronendichte, partikulär erscheinende äußere Schicht auflagern (McLAREN, 1972; LAURENCE & SIMPSON; 1974; ROGERS et al., 1976; SCHRAERMEYER et al., 1987a). LAURENCE & SIMPSON (1974) und SCHRAERMEYER et al. (1987a) beschrieben für *B. pahangi* bzw. *B. malayi* eine weitere innere elektronendichte Partikelschicht, eine Beobachtung, die McLAREN (1972) auch für *L. sigmodontis* und *Loa loa* mitteilte.

Chemische Analysen isolierter *L. sigmodontis*- und *Brugia*-Mikrofilarienscheiden wurden von BARDEHLE (1990), BARDEHLE et al. (1992a) und KLONISCH (1990) sowie KLONISCH et al. (1991) durchgeführt. Sie fanden im Rahmen von Bausteinanalysen heraus, dass die Scheide zum Großteil aus Aminosäuren (mit Prolin, Glutaminsäure / Glutamin, Alanin, Cystein / Cystin und Glycin als Hauptkomponenten) besteht und somit eine Proteinstruktur darstellt. Kohlehydrate sind nur zu etwa 5 Mol-% enthalten.

Die ermittelten Werte aus den Aminosäure- und Hexosaminanalysen der *Brugia*-Scheiden weichen nur geringfügig von den Resultaten, die BARDEHLE et al. (1992a) für *L. sigmodontis*-Scheiden ermittelten, ab (KLONISCH et al., 1987, 1991) und decken sich weitgehend mit Analyseergebnissen von Eihüllen anderer Nematoden (ANYA, 1976).

Erste histochemische Untersuchungen der Oberflächenkohlenhydrate der Scheiden wurden von SIMPSON & LAURENCE (1972), LAURENCE & SIMPSON (1974) sowie von SAYERS et al. (1984) und HAMMERBERG et al. (1984) durchgeführt. Durch den Einsatz kohlenhydratspezifisch bindender Lektine (GOLDSTEIN, 1981) konnten detailliertere Informationen gewonnen werden. Mit FITC-markierten Lektine zum Nachweis von Kohlenhydraten auf der Oberfläche der embryonalen Eihüllen und Scheiden arbeiteten verschiedene Autoren (FUHRMAN & ASH, 1983a, 1983b; KAUSHAL et al., 1984; DEVANEY, 1985; FUHRMAN & PIESSENS, 1985; RAO et al., 1987a, 1987b; SCHRAERMEYER et al., 1987b; PAULSON et al., 1988), die allerdings zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen, insbesondere das Vorhandensein von Chitin betreffend. Übereinstimmend wird jedoch über die Bindung von „Wheat Germ Agglutinin“ (WGA) an die Scheidenoberfläche berichtet, was auf das Vorhandensein von N-Acetyl-Glucosamin (GlucNAc) hindeutet. FUHRMAN & PIESSENS (1985) schließen sogar, dass Chitin (ein  $\beta$ [1- $\rightarrow$ 4]-verknüpftes GlucNAc-Polymer) am Aufbau von *B. malayi*-Scheiden wesentlich beteiligt ist. Dies steht in starkem Widerspruch zu den Ergebnissen von SCHRAERMEYER et al. (1987a,b) und PETERS et al. (1987), die nach elektronenoptischen Untersuchungen an Schnitten gravider *B. malayi*- und *L. sigmodontis*-Weibchen sowie reifer Mikrofilarien beobachteten, dass die Affinität der Scheide für WGA nach Auflagerung der uterinen Partikelschicht verloren geht. Die Eihüllen früher Embryonalstadien zeigten im Gegensatz zu der Scheidenoberfläche reifer uteriner und Blutmikrofilarien eine hohe Affinität zu WGA, was auf einen Abbau von Chitin während der Embryonalentwicklung deutet. Bestätigt werden diese Untersuchungen durch die Ergebnisse von PAULSON et al. (1988), wonach Eihüllen von *B. pahangi* und *W. bancrofti* eine zehnfach stärkere Affinität zu WGA aufwiesen als reife Mikrofilarien. KLONISCH et al. (1991) und BARDEHLE et al. (1992a) konnten bei ihren biochemischen Analysen der Mikrofilarienscheiden kein GlucNAc nachweisen, ein Hinweis darauf, dass die Scheiden der Blutmikrofilarien kein Chitin mehr enthalten.

### 2.3.2 Proteine der Mikrofilarienscheide

Die Mikrofilarienscheidenoberfläche von *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* ist als primäre Interaktionsfläche in der Auseinandersetzung mit dem Wirtsorganismus anzusehen. Sie ist für größere Proteine – wie Antikörper – nicht durchlässig (ZAHNER et al, 1995). Daraus lässt sich folgern, dass die Oberflächenantigene am Immungeschehen maßgeblich beteiligt sind. Sie werden meist vom mikrofilariämischen Wirt nicht erkannt. Eine mögliche Erklärung hierfür sehen ZAHNER et al. (1995) in der Präsentation von wirtseigenen Antigenstrukturen oder Proteinmodifikationen auf der Mikrofilarienoberfläche, auch könnten an die Oberfläche adsorbierte Serumproteine des Wirts eine Rolle spielen.

Nach CONRATHS et al. (1997) besteht die Scheide von *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* aus vermutlich 7-10 verschiedenen Proteinen. Die Autoren stützen diese Vermutung auf die Ergebnisse der Untersuchungen von CHRIST et al. (1992), HINTZ et al. (1994) und HIRZMANN et al. (1995).

HINTZ (1995) sequenzierte proteolytische Peptidfragmente von fünf Scheidenproteinen von *L. sigmodontis* [shp1 (22 kDa), shp1a (24 kDa), shp3 (120 kDa), shp3a (40 kDa), shp4 (34 kDa)] und Gesamtscheiden partiell.

Bei der Analyse der in 2-Mercaptoethanol und SDS-löslichen Fraktion der radioaktiv markierten Mikrofilarienscheide von *L. sigmodontis* über eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese konnte BARDEHLE (1990) eine Bande mit der scheinbaren molekularen Masse von 22 kDa durch N-terminale Sequenzierung identifizieren (shp1). SELKIRK et al. (1991) gelang es, mit einem Antiserum in der Mikrofilarienscheide von *B. pahangi* ein Molekül (Mf22) zu identifizieren, das sich als homolog zu shp1 von *L. sigmodontis* erwies (CHRIST et al., 1992). Shp1 wird nur in Embryonalzellen exprimiert und transkribiert (CONRATHS et al., 1993; ZAHNER et al., 1995) und repräsentiert einen Bestandteil der inneren homogenen Schicht der Mikrofilarienscheide. Das Protein ist spezifischen Antikörpern – ohne Einsatz proteolytischer Enzyme - nicht zugänglich (BARDEHLE et al., 1991) und scheint unter einer Schicht uterinen Ursprungs verborgen zu sein (ZAHNER et al., 1995).

Shp3 und shp3a sind zwei einander sehr ähnliche Oberflächenproteine (HINTZ et al., 1994; HINTZ et al., 1996). Durch immunhistologische Studien lassen sich Epitope von shp3 und shp3a nur im distalen Uterus auf Mikrofilarien und im uterinen Epithel nachweisen (SCHARES et al., 1994). Nach den Untersuchungen von HINTZ et al. (1996) enthalten Mikrofilarienscheiden Dimethylaminoethanol, das wahrscheinlich über Phosphodiester-Brücken an shp3 und shp3a gebunden ist. Shp3 und shp3a sind vermutlich an der äußeren Scheidenoberfläche lokalisiert. Shp 3 und shp3a werden vom Immunsystem bei einer natürlichen Infektion nicht erkannt (BARDEHLE et al., 1992b). ZAHNER et al. (1995) vermuten, dass die shp3 Polypeptid-Sequenz nach der Translation unter den zugefügten Strukturelementen völlig verborgen ist. Bei den Strukturelementen könnte es sich um wirtseigene Strukturen handeln, so dass der Parasit vor der Immunabwehr des Wirts geschützt ist. Die Scheidenprotein-Gene shp3 und shp3a von *L. sigmodontis*, *B. pahangi* und *B. malayi* wurden von HIRZMANN (1997) isoliert und charakterisiert. Nach HIRZMANN (1997) werden shp3/3a in den Embryonalzellen und im distalen Uterus exprimiert.

HINTZ et al. (1994) gelang es bei der Analyse des in SDS/2ME unlöslichen Scheidenanteils von *L. sigmodontis* durch enzymatische Proteolyse Peptidfragmente zu isolieren, deren N-terminale Sequenzierung möglich war. Anhand geeigneter Peptidsequenzen wurden dege-

nerierte Oligonukleotide synthetisiert und diese in der PCR zur Amplifikation der komplementären cDNA eingesetzt (HIRZMANN et al., 1995). Aus dem von einer Genombibliothek isolierten Gen ließ sich die vollständige Aminosäuresequenz ableiten, die die von HINTZ et al. (1994) gefundenen Peptidfragmente beinhaltet. Das *L. sigmodontis*-Gen kodiert für ein Polypeptid von 222 Aminosäuren (24 kDa). Die homologen Gene von *B. pahangi* und *B. malayi* wurden von HIRZMANN (1997) isoliert und charakterisiert. Die Homologie zwischen den shp2-Molekülen der beiden *Brugia spp.* beträgt 94%, zwischen den shp2-Molekülen der beiden *Brugia spp.* und *L. sigmodontis* 61%. Shp2 stellt in der Scheide einen Bestandteil der homogenen Schicht (Matrix) dar (HINTZ et al., 1994). Shp2 wird in embryonalen und maternalen Zellen, insbesondere im uterinen Epithel transkribiert (CONRATHS et al., 1997). HIRZMANN et al. (1995) fanden für *L. sigmodontis* und *B. malayi* die Transkription nur bei adulten Weibchen.

DAFA'ALLA (1997) isolierte mittels eines Kaninchen-Antiserums gegen den SDS/2ME-löslichen Teil der Mikrofilarienscheide zwei cDNA-Klone aus einer Expressions-cDNA-Bank, die charakterisiert wurden. Die cDNA- und genomische DNA-Sequenz von *Isc1* wurde ermittelt, von *Isc2* die cDNA-Sequenz. Beide Gene kommen nur einmal im Genom vor. Eines der beiden Gene (*Isc1*, von DAFA'ALLA et al., 2000 in *Ls110* umbenannt) wird in Embryonalzellen transkribiert. Das Protein (382 Aminosäuren) wurde bei den Untersuchungen nicht nur in diesen Zellen nachgewiesen, sondern auch im Uteruslumen und intrauterinen Embryonalstadien. Bei immunhistologischen Untersuchungen an intrauterinen Embryonalstadien wurde das Protein an der Eihülle bzw. Scheide gebunden. Ausnahmen stellen frühe multi-zelluläre Embryonalstadien, aber auch fertig entwickelte Mikrofilarien dar. Die Autoren vermuten, dass das Protein eine Rolle bei der Entstehung der Scheide während der Embryonalentwicklung, evtl. im Sinne eines Chaperons, spielt (DAFA'ALLA et al., 2000).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

##### 3.1.1 *Mastomys coucha*

*M. coucha* hat sich wegen ihrer Empfänglichkeit für Filarieninfektionen als Endwirt in Infektionsmodellen als geeignet erwiesen. So wurden adulte *L. sigmodontis*, *B. malayi* und *B. pahangi* (vgl. 3.4.2) und Mikrofilarien der beiden *Brugia*-Arten (vgl. 3.4.1) aus im Institut für Parasitologie, Gießen gezüchteten *M. coucha* (Stamm „GRA-Gießen“) isoliert. Die Nager wurden in Makrolon<sup>®</sup>-Käfigen (PAG Presswerk AG, Essen) auf Hobelspaneinstreu bei 22° C und 50% relativer Luftfeuchte gehalten und mit einem Mischfuttermittel sowie Wasser ad libitum versorgt (vgl. SCHARES, 1992).

##### 3.1.2 *Sigmodon hispidus*

Das Blut zur Gewinnung von *L. sigmodontis*-Mikrofilarien wurde von aus institutseigener Zucht stammenden Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) gewonnen, da die Filarie *L. sigmodontis* hier eine hohe Mikrofilariämie entwickelt und somit größere Mengen bescheidete L1 isoliert (vgl. 3.4.1) werden können.

Die Tiere wurden einzeln in Makrolon<sup>®</sup>-Käfigen auf Hobelspaneinstreu gehalten. Die Tiere wurden mit Alleinfutter für Ratten und Mäuse (Altromin<sup>®</sup>; Altromin GmbH, Lage) sowie Trinkwasser ad libitum versorgt.

##### 3.1.3 Kaninchen

Das zur Herstellung von Antiserum gegen das  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein (vgl. 3.5.1) eingesetzte Kaninchen der Rasse „Weißer Neuseeländer“ und das als Zellspender im Zytoadhärenztest (vgl. 3.7.2) dienende Tier gleicher Rasse wurden in Käfigen auf Gitterrost gehalten. Die Fütterung erfolgte mit Alleinfutter für Kaninchen (RRF 52 Ringkanin Combi; Raiffeisen, Wiesbaden). Heu und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung.

### 3.2 Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Blutentnahme bei *M. coucha* und *S. hispidus* erfolgte mit Hilfe einer Pasteurpipette (Entnahmevolumen ca. 1,0 bis 1,5 ml je Tier) aus dem retrobulbären Venenplexus. Für die Verwendung des Blutes zur Gewinnung von Parasitenmaterial wurde dem Blut Gerinnungshemmer zugesetzt: für *Brugia*-Arten 1/10 Vol. 3,8% (w/v) Natriumcitrat-Lösung (Merck, Darmstadt), für *L. sigmodontis* 75 E/ml Heparin (Liquemin®; Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Whylen).

Kaninchen wurde Blut durch Punktion der Ohrvenen mittels Luer®- Injektionskanülen (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien) entnommen und in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Das Entnahmevolumen betrug jeweils ca. 20 ml.

Zur Serumgewinnung wurde das Blut nach der Gerinnung (1 h bei Raumtemperatur (RT) und 30 min bei 4° C) 10 min mit 5.000 rpm (Minifuge RF; Heraeus) zentrifugiert. Das abgezogene Serum wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

### 3.3 Parasit und Infektion

Die Stammhaltung von *L. sigmodontis* erfolgte im ursprünglichen Endwirt, der Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*). Die Entwicklung im Zwischenwirt fand in der tropischen Milbenart *Bdellonyssus bacoti* (HIRST, 1913) statt.

Als Endwirt für den Infektionszyklus bei den *Brugia*-Arten wurde die Vielzitzenmaus *Mastomys coucha* eingesetzt, als Zwischenwirt diente die Mücke *Aedes aegypti*.

#### 3.3.1 Zwischenwirte

Die zum Zwecke der Stammhaltung von *L. sigmodontis* gehaltenen und gezüchteten Raubmilben (*B. bacoti*) befanden sich in nach oben offenen Glaszylindern (ca. 45 x 25 cm) in einer ca. 10 cm hohen Hobelspanschicht (unbehandeltes Material) mit etwas Watte. Der Raum wurde auf einem gleichbleibenden Temperaturniveau von 26-28° C und einer relativen Luftfeuchte von 70-80% gehalten.

Im Mückenraum herrschten gleiche klimatische Verhältnisse wie im Milbenraum. Die Mücken befanden sich zu je ca. 100 Stück in Käfigen (mit Gaze überzogenen Drahtgestelle), wo sie vor und nach der Blutmahlzeit mit einer 10%igen Saccharose-Lösung (Feinzucker; Südzucker, Mannheim) versorgt wurden und Möglichkeit zur Eiablage hatten. Die Mückenzucht erfolgte wie bei KLONISCH (1990) beschrieben.

### 3.3.2 Infektion der Zwischen- und Endwirte

Die Milbenpopulation wurde, wie bei SCHARES (1992) beschrieben, durch Saugenlassen an mikrofilarämischen (1700 bis 4000 *L. sigmodontis*-Mf/mm<sup>3</sup> Blut, vgl. 3.3.3) Baumwollratten infiziert. Daraufhin wurden nicht infizierte Tiere (*M. coucha* und *S. hispidus*) und infizierte patente Baumwollratten in die Glaszylinder alternierend eingesetzt, so dass eine kontinuierliche Infektion der Versuchstiere und Reinfektion der Milbenpopulation gewährleistet war.

Zur Infektion der Mücken wurden je drei mit *B. malayi* oder *B. pahangi* infizierte *M. coucha* (80-100 Mf/20 mm<sup>3</sup> Blut) mit Pentobarbital (Nembutal<sup>®</sup>; Abbott, Wiesbaden; 50 mg/kg KG, i.p.) betäubt, rasiert und in einen Mückenkäfig gelegt. Alternativ wurde den Mücken mit Liquemin<sup>®</sup> (Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Whylen; vgl. 3.2) ungerinnbar gemachtes, körperwarmes Blut dieser Tiere über eine mit Serum bestrichene Membran (Parafilm M; American Can Company) angeboten. Den Mücken wurde im abgedunkelten Raum für ca. 2 Stunden die Möglichkeit zur Blutmahlzeit gegeben. Elf Tage nach der Infektion fand die Sektion der Mücken statt, wobei Larven 3 nach Quetschen der infizierten Mücken in Ringer-Lösung (GIBCO BRL GmbH, Eggenstein) über das Trichterverfahren nach BAERMANN (1917) isoliert und angereichert wurden. Die Dichte der L3 in der Ringer-Lösung wurde unter dem Binokularmikroskop (Leitz, Wetzlar) bestimmt. Die Infektionsdosis für die etwa 6 Wochen alten *M. coucha* betrug für *B. malayi* 85 L3 je Tier (LÄMMLER et al., 1978; SÄNGER & LÄMMLER, 1979) und für *B. pahangi* 70 L3 je Tier (s.c., Nackenregion).

### 3.3.3 Bestimmung der Mikrofilariendichte (RAETHER und MAYERHÖFER, 1967)

Material:

- ◆ Leukozytenmischpipette nach THOMA (J. Lehnecke GmbH, Schortens)
- ◆ Zählkammern FUCHS-ROSENTHAL und NAGEOTTE (J. Lehnecke GmbH)
- ◆ 4% (v/v) Essigsäure (Merck, Darmstadt)

Durchführung:

Nach 3.2 gewonnenes Blut wurde in einer Leukozytenmischpipette nach THOMA mit 4% (v/v) Essigsäure 1:20 (*L. sigmodontis*) oder 1:10 (*Brugia*-Arten) verdünnt. Die Mikrofilarien (Mf) wurden in einer Zählkammer mit Netzteilung FUCHS-ROSENTHAL (*L. sigmodontis*) oder NAGEOTTE (*Brugia*-Arten) unter dem Binokularmikroskop (Leitz, Wetzlar) ausgezählt. Die Angabe der Mikrofilariendichte erfolgte in Mf/mm<sup>3</sup> (*L. sigmodontis*) oder Mf/20 mm<sup>3</sup> (*Brugia*-Arten).

### 3.4 Antigengewinnung aus Parasitenmaterial

#### 3.4.1 Mikrofilarienantigen

Die Isolierung von Mikrofilarienantigen erfolgte über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation modifiziert nach CHANDRASHEKAR et al. (1984).

Material:

- ◆ Lösung 1: 9 g Percoll (flüssig; Sigma, Deisenhofen) + 1 g 2,5 M Saccharose; H<sub>2</sub>O ad 10 ml
- ◆ Lösung 2: 0,25 M Saccharose-Lösung
- ◆ 1X PBS (**P**hosphate **B**uffered **S**aline) pH 7,4: 7,2 g NaCl; 3,08 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O;  
0,354 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

Durchführung:

Blut wurde den Versuchstieren wie in 3.2 beschrieben, entnommen. Für die Isolierung von *L. sigmodontis*-Mikrofilarien wurde Percoll in 0,25 M Saccharose als 30%ige und 25%ige Lösung angesetzt und in Glaszentrifugenröhrchen geschichtet: Für *B. pahangi*-Mikrofilarien in Schichten von 40% und 35%, für *B. malayi*-Mikrofilarien in Schichten von 40% und 30%. Darüber wurde das mit Liquemin<sup>R</sup> (Hoffmann-LaRoche-AG, Grenzach-Wyhlen; vgl. 3.2) ungerinnbar gemachte und 1:2 mit phys. NaCl-Lösung oder 1X PBS verdünnte Blut aufgetragen. Nach Zentrifugation (1600 rpm für 30 min; Auslauf ohne Bremse; Minifuge RF, Heraeus) konnten die Mikrofilarien aus der Grenzschicht der Percoll-Lösungen über eine Pasteurpipette mit angeschlossener Wasserstrahlpumpe isoliert werden. Der Erfolg der Dichtegradientenzentrifugation wurde mikroskopisch kontrolliert. Zwei Waschschrte mit phys. NaCl-Lösung oder 1X PBS mit Sedimentation (je 10 min bei 1200 rpm; Minifuge RF, Heraeus) schlossen sich an. Die so gewonnenen Mikrofilarien wurden als Suspension ( $2 \times 10^6$  Mikrofilarien in 1 ml 1X PBS) im Eisbad ca. 100x für 1 s bei 20 kHz beschallt (Branson-Sonifier B 12, Danburg) und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Proteingehalt wurde spektrophotometrisch bei 280 nm ermittelt und die aliquotierten Proben wurden bis zur Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

### 3.4.2 Adulte Filarien

Als Material für die Herstellung einer genomischen Bank aus *B. pahangi* sowie für den Einsatz in Westernblot und PAP-Test wurden adulte Filarien aus *M. coucha* isoliert. Filarieninfizierte *M. coucha* wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt und anschließend sofort dekapitiert. Die adulten *B. pahangi* und *B. malayi* wurden aus Herz, Lunge sowie ggf. aus den Hoden und dem Lymphsystem isoliert. Zur Gewinnung von *L. sigmodontis* wurde die Pleurahöhle (Tag 130 p.i.) eröffnet.

Die adulten Filarien wurden nach Geschlecht getrennt in Petrischalen in phys. NaCl-Lösung oder 1X PBS (vgl. 3.4.1) überführt und gewaschen. Nach der Trocknung auf Filterpapierzuschnitten (Schleicher und Schüll, Dassel) wurden sie in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (für die Herstellung einer genomischen *B. pahangi*-Bank vgl. 3.21) oder bei -80° C in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen als Antigen für den Einsatz in Standardtechniken nach 3.6 eingefroren und aufbewahrt.

### 3.4.3 Mikrofilarienscheiden

*B. malayi*-Mikrofilarien wurden über die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (vgl. 3.4.1) gewonnen. Die Scheiden wurden von Dr. M. Hintz (Biochemisches Institut am Klinikum der Justus-Liebig-Universität, Gießen) nach der Methode von BARDEHLE et al. (1991) präpariert und freundlicherweise für den Einsatz in den in 3.6 beschriebenen Standardtechniken zur Verfügung gestellt.

### 3.4.4 Embryonalstadien

Embryonalstadien wurden aus dem Uterus der weiblichen Parasiten (vgl. 3.4.2) gewonnen, indem ca. 30 lebende adulte Würmer in 1 ml PBS (vgl. 3.4.1) in einem Mörser aus Acrylglas (WEGERHOF et al., 1979) mit einer feinen Schere zerschnitten und mit dem Pistill vorsichtig gequetscht wurden. In einem Zentrifugenglas wurde die Suspension auf 5 ml PBS aufgefüllt. Nach 30 min konnten die Embryonalstadien aus dem Überstand abgezogen und mehrfach mit PBS gewaschen werden (200 x g, 10 min).

### 3.5 Antiseren

Die hier angeführten Seren dienen der näheren immunologischen Charakterisierung von Scheidenoberflächenantigenen.

#### 3.5.1 Herstellung eines Antiserums gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1)

Material:

- ◆ 300 µg  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein (vgl. 3.21.2)
- ◆ Freund'sches Adjuvans incomplett (FA; Behringwerke AG, Marburg)

Durchführung:

Zur Herstellung von Antiserum gegen das  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein (vgl. 3.21) wurden einem Kaninchen (vgl. 3.1.3) bei der ersten Immunisierung 100 µg des über präparative 8%ige Acrylamidgele (vgl. 3.6.1) gewonnenen und in einem gleichen Volumen Freund'schem inkomplettem Adjuvans emulgierten Proteins s.c. in die Nackenregion verabreicht. Boosterinjektionen erfolgten zweimal in dreiwöchigem Abstand mit jeweils 100 µg des in Adjuvans emulgierten Proteins. Die Serumgewinnung (vgl. 3.2) erfolgte sechs Wochen nach der ersten Injektion. Als Kontrolle diente Präimmenserum (Prä-Bp1).

#### 3.5.2 Antiseren gegen SDS/2ME-lösliche und -unlösliche Komponenten von *L. sigmodontis*-Mikrofilarienscheiden

Die Kaninchenantiseren gegen die in 2ME-lösliche (Anti-s) und -unlösliche (Anti-p) Antigenfraktion der Mikrofilarienscheide von *L. sigmodontis* wurden wie bei SCHARES et al. (1994) beschrieben, gewonnen und standen für die Arbeit zur Verfügung.

### 3.6 Standardtechniken für Antikörper- oder Antigennachweise

#### 3.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; LÄMMLI, 1970)

Die SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen diente dem Auffinden des Fusionsproteins im Vektor, in präparativer Form zur Gewinnung des zur Immunisierung des Kaninchens benötigten Fusionsproteins und als Vorstufe für Immunoblots zur Spezifitätskontrolle des Antiserums. Es wurde eine einheitliche Acrylamidkonzentration von 8% in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach LÄMMLI (1970) gewählt (Glycin-SDS-PAGE). Verwendung fand eine Mini-Protean-II-Zelle (BIO-RAD, München) für 7 cm x 10 cm große Gele.

#### Material:

- ◆ Lösung A (Sammelgelpuffer, pH 6,8): 6,06 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 4 ml 10%ige (w/v) SDS-Lösung; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt; H<sub>2</sub>O ad 100 ml
- ◆ Lösung B (Trenngelpuffer, pH 8,8): 18,17 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 4 ml 10%ige (w/v) SDS-Lösung, mit HCl auf pH 8,8 eingestellt; H<sub>2</sub>O ad 100 ml
- ◆ Lösung C (Acrylamid-Stammlösung): 30 g Acrylamid (Sigma, Deisenhofen); 0,8 g N,N -Methylen-bis-acrylamid (Sigma, Deisenhofen); H<sub>2</sub>O ad 100 ml
- ◆ Elektrodenpuffer (5-fach konzentriert): 15,15 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 72,05 g Glycin; 5 g SDS; H<sub>2</sub>O ad 1000 ml
- ◆ Probenpuffer (reduzierend; 5-fach konzentriert): 1 ml 20%iges (w/v) SDS; 1 ml Glycerin; 1 ml 2-Mercaptoethanol (BIO-RAD, München); 1 ml Lösung A; einige Tropfen Bromphenolblau-Lösung
- ◆ TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (BIO-RAD, München)
- ◆ 10% (w/v in H<sub>2</sub>O) Ammoniumpersulfat (BIO-RAD, München)
- ◆ Molekulargewichtsmarker:
  - HMW (High Molecular Weight)-Marker (Sigma, Deisenhofen):
  - Myosin 205 kDa
  - β-Galaktosidase 116 kDa
  - Phosphorylase B 97 kDa
  - Rinderserumalbumin 67 kDa
  - Ovalbumin 45 kDa
  - Carboanhydrase 29 kDa

Durchführung:

a) Herstellung der Polyacrylamidgele

Zur Herstellung der Gele wurden die Gelplatten mit den Spacern in den Glasplattenhaltern eingespannt und im Gießstand justiert. Für zwei 8%ige Gele mit je 0,75 mm Dicke wurden für das Trenngel 3,75 ml Lösung B, 4 ml Lösung C sowie 7,25 ml H<sub>2</sub>O verwendet. Nach Zugabe von 60 µl 10% (w/v in H<sub>2</sub>O) Ammoniumpersulfatlösung (BIO-RAD, München) sowie 10 µl TEMED (BIO-RAD, München) wurde die Trenngel-Lösung vorsichtig gemischt, in die Gelkammern gefüllt und mit 70% (v/v) Ethanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation (i.d.R. 30 min bei Raumtemperatur) wurde nach dem Abgießen des Ethanols die Trenngeloberkante mit destilliertem Wasser gespült, trockengetupft, mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und die Kämme eingesetzt. Die 4%ige Sammelgel-Lösung setzte sich aus 1,5 ml Lösung A, 0,6 ml Lösung C, 3,6 ml H<sub>2</sub>O, 30 µl 10% (w/v in H<sub>2</sub>O) Ammoniumpersulfat-Lösung und 10 µl TEMED zusammen. Der Probenauftrag erfolgte 30 min später, nach Entfernen der Kämme und Spülen der Auftragstaschen mit destilliertem Wasser sowie nach dem Zusammensetzen der Elektrophoresekammern und dem Einfüllen von 1X Elektrodenpuffer in die innere (125 ml) und äußere Kammer (200 ml).

b) Vorbereitung der Proben und Elektrophoreseablauf

Der Proteingehalt des als Probe aufgetragenen Antigens wurde spektrophotometrisch bestimmt. Pro Spur wurden etwa 40-50 µg Protein verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftrag 5:1 mit 5X Probenpuffer versetzt, im Wasserbad 5 min gekocht und 5 min bei 13.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde unmittelbar nach der Zentrifugation zur Elektrophorese aufgetragen. In einer Vergleichsspur wurde eine Mischung von Standardproteinen (HMW-Marker) platziert. Die zur Auftrennung der Proben angelegte Spannung betrug 150 Volt, die Stromstärke 60 mA. Mit Erreichen der Bromphenolblaufront am unteren Gelrand wurde der Trenngang beendet.

### 3.6.2 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

#### Material:

- ◆ Coomassie-Farbstoff-Lösung (Lösung P): 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg); 95% (v/v) Ethanol (vergällt) ad 1000 ml
- ◆ Entfärbelösung (Lösung S): 50 ml Eisessig; H<sub>2</sub>O ad 1000 ml
- ◆ Entfärbelösung (Lösung R): 200 ml 96% (v/v) Ethanol; 50 ml Eisessig; H<sub>2</sub>O ad 1000 ml
- ◆ Methanol (Merck, Darmstadt)

#### Durchführung:

Die Gele wurden durch Schwenken für ca. 2 h in einem Teil Coomassie-Farbstoff-Lösung (Lösung P), einem Teil Entfärbelösung (Lösung S) und etwas Methanol gleichzeitig fixiert und gefärbt. Die Entfärbung wurde in Entfärbelösung (Lösung R; mehrere Stunden) vollzogen, bis das Gel klar erschien.

### 3.6.3 Westernblottechnik (TOWBIN & GORDON, 1984)

#### Material:

- ◆ Tris-Glycin-Puffer (Transferpuffer für SDS-Polyacrylamidgele nach BURNETTE, 1981): 3,03 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; 14,4 g Glycin; H<sub>2</sub>O ad 1000 ml
- ◆ PVDF-Folie (Immobilon<sup>®</sup>p-Transfer Membran; Millipore, Eschborn)
- ◆ Blottingpapier: GB 003 (Schleicher & Schüll, Dassel)
- ◆ Fiber-Pads (BIO-RAD, München)

#### Durchführung:

Die zu prüfenden Antigene wurden wie in 3.6.1 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Reaktion mit Antikörpern wurden sie auf eine PVDF-Folie (Immobilon<sup>®</sup>p-Transfer Membran) transferiert. Dazu wurde das Gel mit der Membran in einem „Transblot-Sandwich“: Fibre-Pad - Blottingpapier – Gel – Immobilon<sup>®</sup>p-Transfer Membran – Blottingpapier - Fibre-Pad feucht und luftblasenfrei zusammengepackt. Der Transfer erfolgte in einem Tris-Glycin-Puffer unter Eiskühlung bei 100 V in 1 h in der Trans-Blot-Einheit der Mini-Protean-II-Dual-Slab-Cell mit Kühlelement (BIO-RAD, München).

### 3.6.4 Ponceau-S-Färbung

Zur Lokalisation und Abtrennung der Markerspuren sowie zur Kontrolle des Transfers nach Westernblotting wurden die PVDF-Folien (nach 3.6.3) kurze Zeit reversibel mit dem Farbstoff Ponceau-Rot angefärbt.

Material:

- ◆ PBS/T-Puffer: 0,05% (v/v) Tween 20 in 1X PBS (vgl. 3.4.1)
- ◆ Färbelösung: 0,05 g Ponceau-Rot (Chroma, Stuttgart); 0,5 ml Eisessig; H<sub>2</sub>O ad 500 ml
- ◆ PVDF-Folie (vgl. 3.6.3)

Durchführung:

Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Folie bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden in die Färbelösung getaucht und leicht geschwenkt. Die Markerspuren wurden abgetrennt und nach dem Entfärben in PBS/T-Puffer Coomassie-gefärbt (vgl. 3.6.5). Die restliche Membran wurde zunächst mit PBS/T-Puffer entfärbt, anschließend wurde eine Coomassie- (vgl. 3.6.5) oder Immunfärbung (vgl. 3.6.6) durchgeführt.

### 3.6.5 Coomassie- Färbung von PVDF-Folien

Proteinbanden auf der PVDF-Folie (vgl. 3.6.3) konnten nach beendetem Transfer durch eine Coomassie-Färbung dauerhaft sichtbar gemacht werden.

Material:

- ◆ Coomassie-Farbstoff-Lösung: vgl. 3.6.2
- ◆ Lösung P und Lösung S: vgl. 3.6.2
- ◆ Entfärbelösung: 7,5 ml Eisessig; 20 ml Methanol; H<sub>2</sub>O ad 100 ml

Durchführung:

Die Membran wurde zunächst für 10 min bei Raumtemperatur unter Schwenken in je einem gleichen Vol. Lösung P und Lösung S fixiert und gefärbt. Anschließend wurde mit der Entfärbelösung (Schwenken, mehrmaliger Wechsel der Lösung) überschüssiger Farbstoff entfernt.

### 3.6.6 Immunfärbung (Immunoblottechnik)

Der immunologische Nachweis transferierter Proteine erfolgte über die Immunoblot-Technik.

Material:

- ◆ TBS-Puffer: 12 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 23 g NaCl; H<sub>2</sub>O ad 2000 ml; der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.
- ◆ 1X PBS-Puffer: vgl. 3.4.1
- ◆ PBS/T-Puffer: 0,05% (v/v) Tween 20 in 1X PBS
- ◆ PBS/T-BSA-Lösung: 2% (w/v) Bovines Serumalbumin (Fraktion V; Roth, Karlsruhe) in PBS/T-Puffer
- ◆ Substratlösung: 30 mg 4-Chloro-1-Naphtol (Sigma, Deisenhofen) gelöst in 10 ml Methanol (Merck, Darmstadt) + 30 ml 1X PBS-Puffer (vgl. 3.4.1) + 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ig)
- ◆ Konjugat: Peroxidase-konjugiertes Anti-Kaninchen-Serum (Dianova, München)
- ◆ Protein aus aufgearbeiteten *E. coli*-Zellen (vgl. 3.6.7)
- ◆ Antiseren: Anti-p (vgl. 3.5.2) und Anti-Bp1 (vgl. 3.5.1)
- ◆ Filterpapierzuschnitte GB 003 (Schleicher und Schüll, Dassel)

Durchführung:

Die PVDF-Folien (vgl. 3.6.3) wurden nach Westernblotting (vgl. 3.6.3) und der Färbung mit Ponceau-S (mit anschließendem Entfärben in PBS/T-Puffer; vgl. 3.6.4) 20 min bei RT in der PBS/T-BSA-Lösung inkubiert. Im Falle einer Präadsorption wurde der PBS/T-BSA-Lösung 0,4 mg/ml des durch Aufarbeitung von *E. coli*-Zellen (vgl. 3.6.7) erhaltenen Proteins zugegeben. Das Antiserum Anti-p (vgl. 3.5.2) wurde mit PBS/T-Puffer auf eine Endverdünnung von 1:1000 eingestellt, das Antiserum gegen das lac-Z-Fusionsprotein (Anti-Bp1, vgl. 3.5.1) auf 1:200. Die Membranen wurden in den verdünnten Seren über Nacht unter Schwenken bei 4° C inkubiert. Nach Waschen der Membranen 2x für 5 min in PBS-T-Puffer und 1x für 5 min in 1X PBS, wurden sie 1 h mit dem Anti-Kaninchen-Konjugat unter Schwenken bei RT inkubiert und danach erneut gewaschen (5x für je 5 min in PBS-Puffer). Das Substrat wurde angesetzt und die Membranen mit dem Substrat inkubiert bis die gewünschte Intensität der Banden erreicht war. Nach dem Überführen und Waschen der Membranen in Aq. dest. (ca. 30 min) konnten sie auf Filterpapierzuschnitten (Schleicher und Schüll, Dassel) getrocknet und fotografisch dokumentiert werden.

### 3.6.7 Aufarbeitung von *E.coli*-Zellen

Durch Präadsorption mit einer Proteinpräparation aus dem *E. coli*-Stamm Y1089 konnten Kreuzreaktionen mit *E. coli*-Proteinen im Immunoblot vermieden werden.

Material:

- ◆ TBS-Puffer: 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl
- ◆ LB-Amp-Medium: vgl. 3.9
- ◆ Bakterienstamm *E. coli* Y1089 (Promega, SERVA, Heidelberg): vgl. 3.9

Durchführung:

*E. coli* Y 1089-Zellen wurden über Nacht in 50 ml LB-Amp-Medium im Schüttelinkubator (37° C) bis zur Sättigung angezchtet und bei 5.000 rpm (Minifuge RF, Heraeus) für 20 min bei RT sedimentiert. Nach Suspension des Bakterienpellets in 10 ml TBS wurde die Suspension im Eisbad beschallt (Branson-Sonifier B 12; Danburg; 20kHz; Gesamtbeschallungszeit etwa 3 min), bei 4°C für 30 min bei 13.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert und nach Bestimmung des Proteingehalts (spektrophotometrisch bei 280 nm) die Überstände aliquotiert und bis zur Verwendung in Aliquots bei -20° C aufbewahrt.

### 3.6.8 Bestimmung der Molekulargewichte

Das relative Molekulargewicht eines im SDS-PAGE aufgetrennten Moleküls wurde über den Vergleich seines Migrationsfaktors (MF; Quotient der Wanderungsstrecke des Moleküls und der Gesamtlaufstrecke) mit dem eines Probenmoleküls (Molekulargewichtsmarker) bestimmt. Die halblogarithmische Darstellung ergab eine Eichgerade, aus der die unbekannte Masse des Proteins bei bekannter Laufstrecke ermittelt werden konnte.

### 3.6.9 Chymotrypsinierung und Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) mit Mikrofilarien

Bei der indirekten Methode der Immunfluoreszenztechnik erfolgt der Nachweis der gebundenen Antikörper mittels eines fluoreszeinmarkierten Anti-Immunglobulinantikörpers. Somit konnten Antigene und fluorochrommarkierte Antikörper aufgrund ihrer Fluoreszenz erregt durch UV-Licht lokalisiert werden.

Um zu gewährleisten, dass möglichst alle Scheidenkomponenten der Mikrofilarien für die zu untersuchenden Antikörper zugänglich sind, wurden unbehandelte und unterschiedlich lange enzymatisch behandelte Mikrofilarien eingesetzt. Chymotrypsin A wurde - als die Mikrofilarienscheide aufschließendes Enzym - wie bei SCHÜTZLE (1994) beschrieben, verwendet.

#### Material:

- ◆ Evans Blue-Stammlösung: 0,2% (w/v) Evans-Blue (Serva, Heidelberg) in 1X PBS (vgl. 3.4.1)
- ◆ Formaldehyd (Merck, Darmstadt)-Lösung: 4% (v/v) in 1X PBS (vgl. 3.4.1)
- ◆ Konjugat: Anti-Rabbit IgG (whole molecule) FITC Conjugate (Sigma, Deisenhofen)
- ◆ Seren: Anti-p, Anti-s, Anti-Bp1, Prä-Bp1 (vgl. 3.5)
- ◆ 1X PBS (vgl. 3.4.1)
- ◆ Chymotrypsin A (ChyA; Boehringer, Mannheim)
- ◆ Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF; Sigma)

#### Durchführung:

Mikrofilarien von *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* wurden über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (3.4.1) isoliert und 3x mit 1X PBS gewaschen. Ein Teil der so gewonnenen Mikrofilarien wurde lebend im IIFT eingesetzt, ein Teil wurde Formaldehyd-fixiert und über Nacht bei 4° C gelagert. Ein anderer Teil wurde auf 1000 Mf/µl 1X PBS eingestellt und vor dem Einsatz im IIFT im Wasserbad (37° C) einer Enzymaktivität von 90 U/ml (ChyA) ausgesetzt. Die Reaktion wurde nach einer Dauer von 5, 10, 15 und 30 min durch Zusatz von 0,1 mM PMSF abgestoppt. Die Mikrofilarien wurden anschließend in 1X PBS gewaschen (300 U/min; Eppendorfszentrifuge 5415).

Alle Inkubationsschritte des IIFT wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Hierzu wurden jeweils etwa 2000 Mikrofilarien pro Ansatz eingesetzt. Die Antiseren wurden im Falle von Anti-Bp1 und Prä-Bp1 1:20 in 1X PBS vorverdünnt, die Antiseren Anti-s und Anti-p 1:50. Die Mikrofilarien wurden 1 h mit den Antiseren inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug je Reaktionsansatz 200 µl. Nach der Inkubation wurde nicht gebundener überschüssiger Antikörper durch drei Waschschriffe in je 500 µl 1X PBS entfernt. Die sedimentierten (10 min, 300 x g) Mikrofilarien wurden mit je 100 µl des 1:20 in 1X PBS und 0,02% Evans-Blue-Lösung vorverdünnten Konjugats (Anti-Rabbit IgG FITC Conjugate) versetzt und nach dem Mischen 1 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriffen in 1X PBS wurden die sedimentierten Mikrofilarien (10 min; 300 x g) auf Objektträger getropft unter dem Fluoreszenzmikroskop (Diaplan Fluoreszenz-Mikroskop, Leitz) bei Auflicht betrachtet, die Ergebnisse verglichen und fotografiert (Farbdias: Kodak Ektachrome Elite 400).

### 3.6.10 Peroxidase-Anti-Peroxidase-Test (PAP-Test)

#### Material:

- ◆ 1X TBS für PAP-Test: 6,057 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 8 g NaCl; mit HCl auf pH 7,65 eingestellt; H<sub>2</sub>O ad 1000 ml
- ◆ TBS-S: 20% (w/v) Schweineserum (DAKO, Hamburg) in 1X TBS
- ◆ Imidazol-HCl-Puffer: 0,1M Imidazol (Fluka, Buchs, Schweiz); mit HCl auf pH 7,1 eingestellt
- ◆ DAB-Lösung: 100 mg Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (Fluka); Imidazol-HCl-Puffer ad 200 ml; kurz vor Gebrauch Zusatz von 70 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- ◆ Alkoholreihe: 50, 70, 80, 96, 100% (v/v) Ethanol (Merck, Darmstadt)
- ◆ Isopropanol (Merck)
- ◆ Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung: 0,5% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (Merck)
- ◆ Methylbenzoat (Merck)
- ◆ Benzol (Merck)
- ◆ Bouin-Lösung: 15 ml gesättigte Pikrinsäure (Merck); 5 ml 40% (v/v) Formaldehyd (Merck); 1 ml Eisessig (Merck)
- ◆ Xylolersatz: Rotihistol<sup>®</sup> (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ Konjugate: Schwein-Anti-Rabbit-IgG (DAKO); PAP-Komplex entwickelt im Kaninchen (Sigma, Deisenhofen)
- ◆ Lösung nach Papanicolaou (Merck)
- ◆ Kanadabalsam (Merck)

#### Durchführung:

Die lebenden adulten Parasiten wurden 3x in phys. NaCl-Lösung gewaschen und 24 Stunden in frisch angesetzter Bouin-Lösung fixiert. Die Dehydrierung wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 80, 96, 100% (v/v) Ethanol, für je 5 min) vorgenommen. Anschließend wurde der Alkohol wieder durch das Überführen der Parasiten in die Zwischenlösung Methylbenzoat entfernt. Die Filarien wurden in mehrere Segmente unterteilt, die 2x für je 5 min in Benzol inkubiert und bei 60° C in Paraffin eingebettet wurden. Nach Aushärtung wurden mit einem Schlittenmikrotoms (Jung, Nußloch) 5 µm dicke Schnitte hergestellt, auf eiweißbeschichtete Objektträger aufgezogen und bei 40° C über Nacht getrocknet. Nach dem Entparaffinieren der Schnitte in dem organischen Lösungsmittel enthaltenden Rotihistol<sup>®</sup> (2x für je 10 min), und dem Überführen in Alkohol (je 3 min in Isopropanol, 100% (v/v) Ethanol, 96% (v/v) Ethanol), wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation in Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung inaktiviert. Nach dem Waschen in 1X TBS für 3 min und der Abgrenzung der einzelnen Felder mit Hilfe eines sogenannten PAP-Stiftes, erfolgte die Blockie-

rung der Schnitte durch Auftropfen von je 20 µl Schweineserum pro Feld und eine Inkubation für 30 min bei 37° C in einer feuchten Kammer im Brutschrank. Das Schweineserum wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entfernt und der zu testende Antikörper (1:100 und 1:500 in TBS-S) aufgetragen. Während einer weiteren Inkubation (30 min bei 37° C; feuchte Kammer) erfolgte die Bindung des Antikörpers an sein Antigen. Ungebundener Antikörper wurde durch 3x Waschen in 1X TBS entfernt. Anti-Rabbit-IgG als Sekundärantikörper wurde mit TBS-S 1:100 verdünnt und aufgetropft (je 20 µl pro Feld). Nach erneuter Inkubation bei gleichen Bedingungen und dreimaligem Waschen in 1X TBS, wurde der PAP-Komplex (1:100 in TBS-S) aufgetragen. Ein weiterer Inkubationsschritt schloss sich an. Anschließend wurden die Präparate dreimal mit 1X TBS gewaschen und in eine Glasküvette mit DAB-Lösung überführt. Die Farbreaktion wurde nach 10 min mit 1X TBS abgestoppt. Ein Teil der Präparate wurde nach Waschen mit Wasser 25 s in Papanicolaous Lösung gegengefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde dabei durch erneutes Waschen in Wasser entfernt. Gegengefärbte wie nicht gegengefärbte Präparate wurden nach Überführen in eine Alkoholreihe mit steigender Konzentration (50, 70, 80, 96% (v/v) Ethanol, 2x in Isopropanol p.a.; für je 3 min) und Rotihistol® (2x für je 5 min) in ein durchsichtiges, haltbares Einschlussmittel (Kanadabalsam) gebracht, durch ein Deckglas (24 x 60 mm) konserviert, nach dem Trocknen mikroskopisch (Olympus BH-2) untersucht und fotografiert (Kodak Ektachrom 64T).

### 3.7 *In vitro*-Versuche mit Mikrofilarien

#### 3.7.1 Mikrofilarien-*in vitro*-Agglutination (Mikrofilarien-Agglutinations-Assay, MAA)

Material:

- ◆ PBS-Puffer: vgl. 3.4.1
- ◆ Seren: Anti-Bp1, Anti-s, Anti-p, Prä-Bp1 (vgl. 3.5)

Durchführung:

*L. sigmodontis*-, *B. malayi*- und *B. pahangi*-Mikrofilarien wurden über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (3.4.1) isoliert und 3x in 1X PBS gewaschen. Etwa je 5000 Mikrofilarien (in 20 µl PBS) wurden mit einem gleichen Volumen unverdünntem Kaninchenserum Anti-Bp1 sowie Anti-s oder Anti-p als Positivkontrollseren bzw. Prä-Bp1 oder 1X PBS als Negativkontrollen über Nacht bei Raumtemperatur in 1,5 ml Eppendorfgefäßen inkubiert. Aliquots von je 5 µl wurden auf einen Objektträger aufgetragen und mikroskopisch durch Auszählung (vgl. 3.3.3) von je 3 x 100 Mikrofilarien (Prozentualer Anteil agglutiniertes und nicht agglutiniertes Mikrofilarien) bewertet.

### 3.7.2 Antikörpervermittelter Zytoadhärenztest an Mikrofilarien

Im Falle einer Bindung von Antikörpern an die Oberfläche von Mikrofilarien, kann es über den Fc-Teil des Antikörpers zur Anlagerung von Zellen an die Parasiten kommen.

Die Antikörper-vermittelte Zelladhäsion wurde, anstatt wie bei ZAHNER & WEGERHOF (1985) beschrieben, mit Milzzellen eines Kaninchens anstelle der Peritonealzellen der *M. coucha* durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 5000 Mikrofilarien (15 µl, in RPMI 1640; Gibco, Eggenstein) von *B. pahangi* und *L. sigmodontis* mit einer Zellsuspension (30 µl, Zellen in Medium RPMI 1640) von je 510 000 Zellen und je 40 µl Serum (Anti-s, Anti-p, Anti-Bp1 sowie das Serum des Milzzellspenders (P-Serum) und Präimmunserum (Prä-Bp1) als Negativkontrollseren) verwendet. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte frühestens nach einstündiger Inkubation bei 37° C. Es wurden jeweils 1000 Zellen pro Ansatz (je eingesetztes Serum) mit *B. pahangi* und 500 Zellen mit *L. sigmodontis* ausgezählt und der prozentuale Anteil der adhärierenden Zellen errechnet. Die Ergebnisse wurden verglichen und fotografiert.

### 3.8 Passive Immunisierung

Drei Gruppen von je fünf mit *L. sigmodontis*-, und drei Gruppen von je fünf mit *B. pahangi*-infizierte, mikrofilariämische *M. coucha* erhielten intravenös (Injektion in den retrobulbären Plexus) je 0,5 ml Kaninchenserum Anti-Bp1, ein Positivkontrollserum (Anti-s) oder das Präimmunserum (Prä-Bp1) als Negativkontrolle. Blutentnahmen erfolgten in regelmäßigen Zeitabständen bis zum 30. Tag nach der Behandlung. Die Mikrofilariendichte im Blut wurde nach der Methode von RAETHER & MEYERHÖFER (1967) bestimmt (vgl. 3.3.3). Die Untersuchungsergebnisse wurden in der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen statistisch analysiert. Die Datenerhaltung und -auswertung erfolgte auf der Rechenanlage Cyber 960 des Hochschulrechenzentrums der Justus-Liebig-Universität, Gießen unter Verwendung des Statistikprogrammes BMPD (Dixon, 1987).

Nach dem Ende des Versuchs erfolgte die Sektion der Tiere mit Bestimmung der Anzahl adulter Stadien in den Organen und der Pleurahöhle. Bei mit *B. pahangi*-infizierten Tieren wurden zusätzlich, jeweils für jede Gruppe ein Embryogramm nach WEGERHOF et al. (1979) erstellt.

### 3.9 Bakterienkulturen

Material:

- ◆ Bakterienstämme (Promega, SERVA, Heidelberg):
  - E. coli* Y1089: *araD139 ΔlacU169 proA<sup>+</sup> Δlon rpsL hflA150[chr.:Tn10(tet<sup>r</sup>)] pMC9*
  - E. coli* Y1090: *lacU169 proA<sup>+</sup> Δlon araD139 rpsL strA supF, hsdR<sup>+</sup> hsdM<sup>r</sup>*
  - E. coli* LE392: *supE44 supF58 hsdR514 galK2 galT22 metB1 trpR55 lacY1*
  - E. coli* JM109: F<sup>-</sup> [*traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>f</sup> lacZΔM15*] *recA1 endA1 gyrA96 hsdR17 supE44 relA1 thiΔ (lac-proAB)*
- ◆ Medien:
  - LB (Luria-Bertani)-Medium (MILLER, 1972):  
10 g NaCl (Merck, Darmstadt); 10 g Bacto-Trypton (GIBCO BRL GmbH, Eggenstein);  
5 g Hefeextrakt (GIBCO BRL GmbH); H<sub>2</sub>O ad 1000 ml; pH eingestellt mit NaOH auf 7,2
  - a. Bei Verwendung von Phagen: + 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck) + 0,2% (w/v) Maltose (Sigma, Deisenhf.)
  - b. Zum Gießen von Platten: + 10 g Agar (Bacteriological Grade; GIBCO BRL GmbH)
  - c. LB-Amp-Plattenagar/LB-Amp-Medium: + 100 µg/ml Ampicillin (Sigma, Deisenhofen)

#### 3.9.1 Vermehrung

Die Bakterien wurden entweder auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigkulturen bei 37° C vermehrt. Zur Selektion von transformierter Bakterien wurde LB-Amp-Medium bzw. -Agar verwendet (+100 µg Ampicillin/ml).

#### 3.9.2 Aufbewahrung („Stab Cultures“, SAMBROOK et al., 1989)

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Bakterienstämme wurden Glycerinkulturen angelegt.

0,85 ml einer Bakterienkultur wurde mit 0,15 ml (sterilem) Glycerin (Merck, Darmstadt) versetzt, gevortext und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80° C.

### 3.10 Vermehrung von Phagen-Zellen

Material:

- ◆ λ-Phagen (vgl. 3.11)
- ◆ Bakterienstämme: *E. coli* Y1089, *E. coli* Y1090, *E. coli* LE392 (vgl. 3.9)
- ◆ LB-Amp-Medium (vgl. 3.9) + 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Merck) + 0,2% (w/v) Maltose (Sigma, Deisenhofen)

Durchführung:

Die für die Vermehrung von λ-Phagen benötigten Bakterienzellen wurden wie in 3.9.1 in LB-Medium angezüchtet. Für die Stämme *E.coli* Y1089 und Y1090 war der Zusatz von 10 mM

MgSO<sub>4</sub> und 0,2% (w/v) Maltose im Medium nötig, da Magnesiumionen eine stabilisierende Wirkung auf die Phagenpartikel haben. Maltose ermöglicht die Adsorption der Phagen durch Expression von Maltoserezeptoren auf der Bakterienoberfläche, an die die Phagenpartikel binden.

### 3.11 Immunoscreening der $\lambda$ gt11/*B. pahangi*-cDNA-Bank

Das hier angewandte Verfahren zur Identifikation serologisch exprimierter Fusionsproteine ist eine Modifikation eines auf Erkennung viruspezifischen Antigens in Plaques beruhenden Zell-ELISA (PAULI et al., 1984).

Material:

- ◆  $\lambda$ gt11/*B. pahangi*-cDNA-Bank (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Selkirk, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London, Großbritannien)
- ◆ *E. coli* Y1090 (vgl. 3.9)
- ◆ Anti-p-Serum (vgl. 3.5.2)
- ◆ 10 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktopyranosid; Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ PBS/T-Puffer: 0,05% (v/v) Tween 20 in 1X PBS (vgl. 3.4.1)
- ◆ PBS/T-BSA-Lösung: 2% (w/v) Bovines Serumalbumin (Fraktion V; Carl Roth GmbH in PBS/T)
- ◆ SM-Puffer: 5,8 g NaCl; 2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 50 ml 1M TrisCl (pH 7,5); 5 ml 2% Gelatinelösung; H<sub>2</sub>O ad 1000 ml)
- ◆  $\lambda$ -Diluent: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- ◆ Chloroform (Carl Roth GmbH)
- ◆ Medien: LB-Medium bzw. -Platten (vgl. 3.9)  
Top-Agar: 0,5 % Agarose (Serva, Heidelberg); 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- ◆ Nitrocellulosefilter (S&S Nukleinsäure- und Proteintransfermedien, 0,45  $\mu$ m, 11 x 11 cm; Schleicher & Schüll, Dassel)

#### 3.11.1 Ausplattieren der cDNA-Genbank

300  $\mu$ l einer Übernachtskultur aus *E. coli* Y1090 (in LB-Medium für Phagenvermehrung; Inkubation im Schüttelinkubator bei 37° C über Nacht) wurden zur Transduktion mit ca. 20.000 Phagen versetzt und für 20 min zur Adsorption der Phagen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Vermischen mit 8 ml in der Mikrowelle aufgekochtem und im Wasserbad auf 50-55° C abgekühltem Top-Agar (vgl. 3.9), wurden die Bakterien/Phagen-Suspension über eine vorgewärmte, ampicillinhaltige (100  $\mu$ g/ml) LB-Agarplatte (vgl. 3.9) in einer quadratischen Petrischale (120 x 120 mm; Greiner, Solingen) geschichtet und die Platten nach Erstarren des Agars für 3 h bei

42° C im Brutschrank inkubiert. Zur Inaktivierung des lac-Repressors und zur Bindung exprimierten Proteins, wurden die mit 10 mM IPTG getränkten und danach bei Raumtemperatur getrockneten Nitrocellulosefilter luftblasenfrei auf den Bakterienrasen aufgelegt. Die Inkubation wurde 2 h bei 38° C fortgesetzt. Die Lage der Nitrocellulosefilter wurde über ein Muster mehrerer Einstiche (durch Filter und Agar) mit einer Kanüle markiert und die Konturen der Nitrocellulosefilter sowie die Lage der Einstiche auf der Rückseite der Platten nachgezeichnet. Anschließend wurden die Nitrocellulosemembranen vorsichtig vom Agar abgezogen und kurz (ca. 5 min) in PBS/T-Puffer gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Reaktionen wurden die Filter für 20 min bei Raumtemperatur in der PBS/T-BSA-Lösung inkubiert. Für die serologische Detektion antigener Fusionsproteine wurden die Nitrocellulosemembranen in einer Petrischale mit dem 1:1000 in PBS/T-Puffer verdünnten Anti-p-Serum über Nacht im Kühlraum unter Schwenken inkubiert. Weiter wurde verfahren wie in 3.6.6 (Immunfärbung) beschrieben.

### 3.11.2 Zuordnung positiver Signale, Plaquereinigung

Positive Signale wurden mittels der auf der Rückseite der Platten angebrachten Markierungen mit den korrespondierenden Plaques in Deckung gebracht, diese mit einer sterilen Pasteurpipette vorsichtig von der Kulturplatte entfernt und einzeln in je 1000 µl SM-Puffer und ca. 50 µl Chloroform (Carl Roth GmbH) überführt. Nach Lagerung bei 4° C über Nacht wurde der Titer der im Puffer enthaltenen λgt11-Phagen ermittelt (vgl. 3.11.3). Da die zur Identifikation eingebrachte Menge an Phagen eine Kontamination mit nicht rekombinanten Phagen, die andere als die gewünschten DNA-Fragmente tragen, nicht ausschließt, wurde eine sogenannte Plaquereinigung vorgenommen. Dazu wurde das unter 3.11.1 beschriebene Verfahren in der Regel dreimal mit kontinuierlich abnehmender Menge eingesetzter Phagen (vgl. 3.11.3) durchgeführt, bis ein Plaque isoliert werden konnte, der eindeutig einzeln anzusprechen war. Erst λgt11-Klone aus diesen Plaques wurde zur Isolierung der integrierten DNA verwendet.

### 3.11.3 Phagentitration („Spot-on“-Verfahren)

Zur Titerbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe der Phagen ( $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$ ) in SM-Puffer oder λ-Diluent hergestellt und Bakterienzellen (*E. coli* Y1090 oder LE392) wie in 3.9.1 beschrieben angezüchtet. 200 µl Bakteriensuspension wurden im Glasröhrchen mit 3-4 ml 50° C erwärmtem Top-Agar versetzt, gemischt und sofort auf eine LB-Agarplatte gegossen. Nach Aushärtung des Top-Agars wurden die Phagenverdünnungen (je 5 µl) als „Spots“ auf die Agaroberfläche getropft und die Platten ca. 8 Stunden im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Der

Phagentiter (pfu, plaque forming units) konnte anhand der Plaquezahl und der jeweiligen Verdünnungsstufe bestimmt werden.

#### 3.11.4 Plattenlysat-Amplifikation („Wet-Box“)

Um einen ausreichend hohen Phagentiter als Ausgangspunkt für die DNA-Isolierung zu erhalten wurden 0,2 ml einer *E. coli* Y1090-Übernachtskultur mit etwa  $10^5$  pfu der gereinigten Phagen transduziert und mit 3 ml 0,5% Top-Agar über eine frischgegossene LB-Platte gegeben. Die verschlossene Platte wurde mit Parafilm (Parafilm M, American Can Comp.) abgedichtet („Wet Box“) und mit dem Nährboden nach unten im Brutschrank bei 37° C über Nacht inkubiert. Der konfluente Lysis aufweisende Bakterienrasen wurde mit 5 ml SM-Puffer oder  $\lambda$ -Diluent von der Platte abgeschwemmt, in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und nach Zugabe von ca. 100  $\mu$ l Chloroform zur Abtötung bakterieller Keime unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur gehalten. Größere Zellbestandteile und Fest-Medium wurden durch Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm; Minifuge RF, Heraeus) sedimentiert und der Phagentiter im Überstand (vgl. 3.11.3) bestimmt.

### 3.12 Isolierung rekombinanter $\lambda$ -DNA

Material:

- ◆ UltraClear™-Zentrifugenröhrchen (Beckmann, Dreieich)
- ◆ 10 mg RNase A (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)-Stammlösung/ml in 10 mM TrisCl (pH 7,5) und 15 mM NaCl
- ◆ Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH)-Stammlösung: 10 mg/ml
- ◆ TE-Puffer (pH 8,0): 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- ◆ SM-Puffer (vgl. 3.11)
- ◆ 20%ige SDS (Serva, Deisenhofen)-Stammlösung, pH 7,2
- ◆ Medien: LB-Medium (vgl. 3.9)

Durchführung:

200  $\mu$ l einer *E. coli* Y1090-Übernachtskultur wurden mit  $1 \times 10^6$  Phagen infiziert, zu 10 ml LB-Medium (+10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% (w/v) Maltose) gegeben und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37° C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5.000 rpm, Minifuge RF, Heraeus) für 20 min bei Raumtemperatur wurde der phagenhaltige Überstand abgenommen, in UltraClear™-Zentrifugenröhrchen (Beckmann, Dreieich) überführt und in der Ultrazentrifuge (1 h,

100.000 x g, 4° C) zentrifugiert (Rotor SW 41). Das sich glasig darstellende Pellet wurde nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes in 200 µl TE-Puffer aufgenommen, mit 2 µl RNase A-Stammlösung versetzt und für 30 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach Zufügen von 8 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) auf 20 mM wurde dem Gemisch 100 µg/ml Proteinase K zugegeben sowie 5 µl SDS (aus einer 20 %igen Stocklösung). Nach einem Inkubationsschritt (1 h, 37° C, im Wasserbad) folgte die Phenol-Chloroformextraktion (vgl. 3.14.2) und Ethanolfällung (vgl. 3.13.1). Das Pellet wurde nach Trocknung im Vakuum in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Kontrolle der Präparation und Konzentrationsabschätzung diente ein 0,7%iges (w/v) Agarosegel (Auftrag von 1 µl DNA-Lösung). Nach restriktionsendonukleolytischer Spaltung mit *EcoR* I (vgl. 3.17) konnte die Größe des Inserts mit Hilfe eines 2%igen (w/v) Agarosegels abgeschätzt werden.

### 3.13 Präzipitation von Nukleinsäuren mittels alkoholischer Fällung (SAMBROOK et. al., 1989)

Die DNA wurde zur Konzentration und Reinigung mit Ethanol (unter Zusatz von Natrium- oder Ammoniumsalz) oder Isopropanol gefällt.

Material:

- ◆ Ethanol p. a. (Merck; Darmstadt)
- ◆ 70%iges und 80%iges (v/v) Ethanol (Merck)
- ◆ 3 M Natriumazetat pH 5,2 (pH 7,4; Merck)
- ◆ 7,5 M Ammoniumazetat (pH 7,5; Merck)
- ◆ TE-Puffer (pH 8,0): vgl. 3.12

#### 3.13.1 Ethanolfällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (abs. reinst) und 1/10 Vol. 3 M Natriumazetat (pH 5,2 bzw. pH 7,4 bei EDTA-haltigen Lösungen) oder 7,5 M Ammoniumazetat (pH 7,5) versetzt und über Nacht bei -20° C oder 10 min bei 0° C inkubiert. Die DNA wurde als Natrium- oder Ammoniumsalz sedimentiert (13.000 rpm, 30 min, 4° C; Eppendorf-Tischzentrifuge) und der Überstand dekantiert. Zur Entfernung überschüssiger Salze aus dem Präzipitat erfolgten zwei Waschschrte mit 80%igem Ethanol (10 min, 13 000 rpm; Eppendorf-Zentrifuge). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Präzipitat unter Vakuum getrocknet und in einem der DNA-Konzentration entsprechenden Volumen TE-Puffer (pH 8.0) oder H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen.

### 3.13.2 Isopropanolfällung von DNA

Material:

- ◆ Isopropanol (Isopropylalkohol; Merck, Darmstadt)
- ◆ 3 M Natriumazetat pH 5,0 (pH 7,4; Merck)
- ◆ 80%iges (v/v) Ethanol (Merck)

Die Fällung größerer Mengen DNA erfolgte nach Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumazetat (pH 5,2) über Nacht bei  $-20^{\circ}$  C. Weiter wurde verfahren wie in 3.13.1 beschrieben.

## 3.14 DNA-Aufreinigung

### 3.14.1 „Glasmilch-Verfahren“ (modifiziert nach VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979)

Das Glasmilchverfahren eignet sich außer zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen (vgl. 3.19.4) auch dazu, DNA-Lösungen (z.B.  $\lambda$ -DNA vor der Sequenzierung) von Salzen, Phenolresten, Proteinen etc. zu befreien.

Material:

- ◆ Natriumjodid-Lösung: 90,8 g NaJ, 1,5 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 100 ml
- ◆ Ethanol-Waschlösung ( $-20^{\circ}$  C): 50% (v/v) Ethanol, 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA
- ◆ Silica-Matrix-Suspension („Glasmilch“, freundlicherweise von Dr. J. Hirzmann zur Verfügung gestellt)
- ◆ Agarosegel/TAE-Puffer (50X; vgl. 3.18)

Durchführung:

Bei dieser Methode erfolgt die Isolierung durch Adsorption an Glaspartikel.

Die Elektrophorese eines präparativen Agarosegels wurde in 1X TAE-Puffer durchgeführt, das ausgeschnittene Gelstück in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 3 Vol. Natriumjodid-Lösung versetzt und 5 min bei  $60^{\circ}$  C im Wasserbad bis zur Gelauflösung erwärmt. Die Lösung wurde mit 5  $\mu\text{l}$  Silica-Matrix-Suspension („Glasmilch“) versetzt und gemischt. Zur Bindung der DNA an die Matrix wurde die Lösung für 20 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Die Sedimentation des DNA-Glasmilchkomplexes erfolgte durch kurzes

Anzentrifugieren (20 s) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Das Sediment wurde 3x mit je 800 µl Ethanol-Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig abgezogen und die DNA durch Resuspendieren mit 15 µl TE-Puffer (pH 8,0) und anschließender Zentrifugation (5 min, 10.000 rpm; Eppendorf-Tischzentrifuge) eluiert.

### 3.14.2 Phenol/Chloroformextraktion (SAMBROOK et al., 1989)

Material:

- ◆ TE-äquilibriertes Phenol (Roti®Phenol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ 8-Hydroxychinolin (Sigma, Deisenhofen)
- ◆ Chloroform (Carl Roth GmbH)

Zur Entfernung von Proteinen und Enzymen nach *in vitro* Reaktionen wurde, unter Ausnutzung der unterschiedlichen Hydrophobizität von DNA und Proteinen, die DNA-Lösung mit TE-äquilibriertem Phenol (+ 0,1% 8-Hydroxychinolin) ausgeschüttelt.

Gleiche Volumina von Phenol und DNA-Lösung wurden in einem Reaktionsgefäß mit Deckel gut gemischt und für 5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige obere (wässrige) Phase wurde abgezogen, die proteinhaltige gelbliche (phenolische) Phase verworfen. Die nukleinsäurehaltige Phase wurde mit 1 Vol. Chloroform und 1 Vol. Phenol gemischt bis sich eine Emulsion bildete und unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Die nun erhaltene obere Phase wurde abgenommen und mit 1 Vol. Chloroform ausgeschüttelt, um überschüssiges Phenol aus der DNA-haltigen Phase zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation (unter oben beschriebenen Bedingungen) und erneutem Abziehen der wässrigen Phase wurde die DNA gefällt (vgl. 3.13.1 und 3.13.2).

### 3.15 Spektrophotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäurekonzentration wurde mit einem Spektralphotometer (Pharmacia) bestimmt. Nach SAMBBROOK et al. (1989) erlaubt eine Messung bei 260 nm eine diesbezügliche Kalkulation, da die Absorptionsmaxima für Nukleinsäuren im UV-Bereich bei 260 nm liegen. Die Messungen erfolgten nach geeigneter Verdünnung in Wasser. Den Konzentrationsbestimmungen wurde zugrunde gelegt, dass eine  $OD_{260}=1.0$  bei doppelsträngigen Nukleinsäuren einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ , bei Einzelsträngen 40  $\mu\text{g/ml}$  und bei Oligonukleotiden 30  $\mu\text{g/ml}$  entspricht und das Verhältnis der Absorptionsquotienten (A),  $A_{260}:A_{280}$ , bei reinen Nukleinsäurepräparationen im Bereich von 1,8 bis 2,0 liegt (SAMBBROOK et al., 1989).

### 3.16 Isolierung von Plasmid-DNA

#### 3.16.1 Isolierung von Plasmid-DNA über „Minipräparation“ („Lysis by boiling“; HOLMES & QUIGLEY, 1981)

Material:

- ◆ M-stet-Puffer: 5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCL (pH 8,0), 5% Sucrose, 50 mM EDTA
- ◆ 25% (w/v) Sucrose-Lösung
- ◆ LB-Amp-Medium: vgl. 3.9
- ◆ Lysozym (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; 10 mg/ml; in Wasser aufgelöst, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  vorrätig gehalten)
- ◆ RNase A (Boehringer Mannheim GmbH; vgl. 3.12)
- ◆ Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH; vgl. 3.12)

Durchführung:

Die plasmidhaltigen Bakterien wurden in 2 ml LB-Amp-Medium im Schüttelinkubator über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  vermehrt. Von den Übernachtskulturen wurden 1 ml in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (5 min, 13.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend dekantiert und die Sedimente getrocknet. Die Bakterienpellets wurden in 50  $\mu\text{l}$  eisgekühlter 25%iger (w/v) Sucrose-Lösung im Eiswasserbad resuspendiert, anschließend mit 300  $\mu\text{l}$  eisgekühltem M-stet-Puffer versetzt, gründlich gevortext, 25  $\mu\text{l}$  Lysozym (10 mg/ml) zugesetzt, kurz gemischt und nach Kochen im siedenden Wasser (40 s) sofort (20 min, 13.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ; Eppendorf-Tischzentrifuge) sedimentiert. Die Überstände wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit je 10  $\mu\text{l}$  RNase A (1 mg/ml) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad, erfolgten der Zusatz von 15  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10 mg/ml) je Ansatz und eine weitere Inkubation im Was-

serbad (30 min, 37° C). Eine Phenolextraktion (vgl. 3.14.2) und eine Ethanol-fällung schlossen sich an (vgl. 3.13.1). Anschließend wurde zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung eine Agarosegelelektrophorese (0,7 % Agarose) durchgeführt. Durch eine restriktionsendonukleolytische Spaltung und erneute Agarosegelelektrophorese (1%iges Agarosegel) konnte die Größe des Inserts bestimmt werden.

### 3.16.2 „Midipräparation“ von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe eines Kits gewonnen. Nach Lyse der Zellen in Anwesenheit von SDS, Denaturierung der Plasmid- und chromosomalen DNA unter alkalischen Bedingungen und Renaturierung der Plasmid-DNA durch Neutralisierung erfolgte die Reinigung der DNA über im Kit enthaltene Anionenaustauschersäulen.

Material:

- ◆ Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- ◆ LB-Medium (vgl. 3.9)
- ◆ Ampicillin (Sigma, Deisenhofen)

Aus 60 ml einer Übernachtskultur plasmidhaltiger Zellen (LB-Medium +50 µg Ampicillin/ml) wurde Plasmid-DNA mit dem Plasmid Midi Kit isoliert. Es wurde nach der Anleitung des Herstellers verfahren.

### 3.17 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die Aktivität eines Enzyms wird in Units (U) angegeben, wobei 1 Unit eines Enzyms 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei 37° C vollständig verdaut. Die Restriktionsenzymmenge, die für einen vollständigen Verdau von DNA benötigt wird, ist abhängig von der Anzahl der potentiellen Schnittstellen und der Menge der zu verdauenden DNA. Plasmid-DNA wurde mit 5-10 U/µg für 1 h und genomische DNA mit 10-20 U/µg über Nacht (Stabilisierung mit 0,1 mg/ml BSA; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) behandelt. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten müssen sowohl Vektor wie auch das entsprechende DNA-Fragment in größerer Menge gespalten werden. Das Volumen eines präparativen Spaltungsansatzes betrug 20-50 µl (bis 100 µl). Die Inkubationstemperatur zur restriktionsendonukleolytischen Spaltung betrug für die meisten Restriktionsenzyme 37° C, in jedem Fall wurde der Empfehlung des Herstellers Folge geleistet.

Die Vollständigkeit des Verdauens konnte mittels Agarosegelelektrophorese (Analytisches Gel, vgl. 3.18) im Anschluß an die Spaltung überprüft werden.

### 3.18 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Die Auftrennung von DNA-Molekülen entsprechend ihrer Größe - DNA in wässriger Lösung wandert im Gel bei angelegter Spannung aufgrund des negativ geladenen Zucker-Phosphatgerüsts in Richtung Anode – wurde zwecks Konzentrationsabschätzung (SAMBROOK et al., 1989) oder Kontrolle der nach enzymatischer Spaltung entstandenen Fragmente angewandt. Die Detektion der DNA erfolgte über UV-Licht nach Inkubation des Gels in Ethidiumbromid (Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffes in die Doppelhelix).

#### Material:

- ◆ Agarose für DNA-Elektrophorese (Serva, Heidelberg)
- ◆ Low Melting Gel Agarose (Biozym, Hameln)
- ◆ Puffer:
  - TAE (50X): 242 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt),  
57,1 ml Eisessig (Merck),  
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0; Sigma, Deisenhofen) ad 1l Aqua dest.
  - TPE: (10X): 108 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck),  
15,5 ml 85 % Phosphorsäure (1,679 g/ml; Merck),  
40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0; Sigma) ad 1l Aqua dest.
  - TBE: (5X): 54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck),  
27,5 g Borsäure (Serva, Heidelberg),  
20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0; Sigma) ad 1l Aqua dest.
- ◆ DNA-Ladepuffer (6X): 1mM EDTA (Sigma), 30% Glycerin (Merck),  
0,25% Bromphenolblau (Merck)
- ◆ Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen)-Stammlösung: 10 mg/ml
- ◆ Ethidiumbromid-Färbebad: 0,5-1 µl Stammlösung pro 10 ml des Puffers,  
in dem die Elektrophorese gefahren wird  
(=0,5 µg-1,0 µg Ethidiumbromid/ml Puffer)
- ◆ Längenstandards:
  - λ dv1 Octamer-DNA (partielle *EcoR* I-Spaltung):  
25224, 22071, 18918, 12612, 9459, 6306, 3153 bp
  - λ dv1-DNA (*Hae* III gespalten):  
1713, 1310, 890, 534, 460, 362, 352, 272, 223, 213, 212,  
178, 142, 131, 83, 40, 36, 18, 13 bp
  - DNA molecular-weight marker II  
(λ-DNA; *Hind* III gespalten; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim):  
23130, 9416, 6682, 4361, 2322, 2027, 564 bp
  - DNA molecular-weight marker VI  
(pBR 328 DNA; *Bgl* I und *Hinf* I gespalten; Boehringer Mannheim):  
2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154

**Durchführung:**

Die entsprechend der gewünschten Konzentration (0,7% bis 2% (w/v)) in 1X Elektrophoresepuffer eingewogene Agarose wurde in einem Mikrowellengerät aufgekocht und in Flachbettformen gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/6 Vol. Ladepuffer gemischt und in die Auftragstaschen gefüllt. Für die horizontale Elektrophorese wurde je nach Schmelzpunkt der Agarose sowie Dimensionen des Gels und in Abhängigkeit der Zeit eine Spannung von 30 bis 100 V angelegt. Zur Sichtbarmachung der Banden wurden die Agarosegele nach der Elektrophorese für 20-40 min bei Raumtemperatur im Ethidiumbromid-Färbegrad (SHARP et al., 1973) gefärbt, anschließend auf einem UV-Transilluminator (312 nm, 8000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ; Renner GmbH, Darmstadt) betrachtet und ggf. fotografiert (Polaroid Typ 667 Schwarzweiß Land Film, unter Vorschaltung eines Orangefilters).

**3.19 Isolierung von DNA aus Agarosegelen****3.19.1 Gelase-Verfahren****Material:**

- ◆ Gelase™-Kit (Biozym Diagnostik GmbH, Hameln): Gelase und Gelase-Puffer (50X)
- ◆ Biozym Low Melt DNA Agarose (Biozym)
- ◆ TAE-Puffer (50X): vgl. 3.18
- ◆ 3 M Natriumazetat (pH 5,2; Merck, Darmstadt)
- ◆ Ethanol p.a. (Merck)
- ◆ TE-Puffer (pH 8,0; vgl. 3.12)

**Durchführung:**

Das Enzym Gelase™ spaltet das Kohlenwasserstoffgerüst geliertes Agarose in lösliche Oligosaccharide, so dass eine klare Lösung entsteht, aus der Nucleinsäuren über eine Ethanolfällung mit 3 M Natriumazetat (zur Verhinderung des Mitfällens eventueller Proteinkontaminanten) gewonnen werden können.

Die DNA wurde nach Anleitung des Herstellers isoliert. Hierzu wurden 1%ige Agarosegele (Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt) „frisch“ hergestellt, da das Enzym nach Angaben des Herstellers die Vernetzungen der bei regulierter Agarose vorliegenden Helixstruktur aus sterischen Gründen nicht vollständig aufspalten kann. Als Elektrophoresepuffer diente 1-fach konzentrierter TAE-Puffer, der erst kurz vor Gebrauch angesetzt wurde. Auf eine Phenol-und/oder Chloroformextraktion wurde verzichtet. Das lyophilisierte DNA-Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

### 3.19.2 „Squeeze-Freeze“-Verfahren

#### Material:

- ◆ Äquilibriertes Phenol (Roti®Phenol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ Chloroform (Carl Roth GmbH)
- ◆ Ethanol p.a. (Merck, Darmstadt)
- ◆ 3 M Natriumazetat (pH 5,2; Merck)
- ◆ TE-Puffer (pH 8,0; vgl. 3.12)
- ◆ Agarosegel/Puffer (vgl. 3.18)

#### Durchführung:

Die Agarosestreifen mit der darin enthaltenen DNA wurden durch den Nadelansatzstutzen einer 1- oder 2-ml Spritze in ein 1,5 ml- Eppendorf-Reaktionsgefäß gepresst und dadurch zerkleinert. Das Volumen wurde abgeschätzt und das doppelte Volumen Phenol zugegeben. Nach gründlichem Vortexen (30 s) wurde die Probe für 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und danach sofort 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 2 Vol. Chloroform versetzt. Nach gründlichem Vortexen erfolgte eine kurze Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, RT; Eppendorf-Tischzentrifuge). Die DNA im Überstand wurde mit Ethanol gefällt (vgl. 3.13.1). Das vakuumgetrocknete Pellet wurde in einer der DNA-Konzentration entsprechenden Menge TE-Puffer (pH 8,0) aufgelöst und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.19.3 „Spin-N-Freeze“

#### Material:

- ◆ Freeze-N-Spin™ Filter Cups (Stratagene, La Jolla, USA)
- ◆ Ethanol p.a. (Merck, Darmstadt)
- ◆ 3 M Natriumazetat (pH 5,2; Merck)
- ◆ TE-Puffer (pH 8,0; vgl. 3.12.)
- ◆ TAE-Puffer (50X; vgl. 3.18.)
- ◆ Agarosegel (vgl. 3.18)

**Durchführung:**

Die Methode nutzt insbesondere eine zentrifugale Filtration zur Isolierung der DNA aus Agarose (HEERY et al., 1990). Die aus einem 1%igen präparativen Agarosegel (1X TAE-Puffer) isolierte, das entsprechende DNA-Fragment enthaltende Bande, wurde in ein Freeze-N-Spin™ Filter Cup (Stratagene, La Jolla, USA) gegeben, dieses in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (Deckel vorher entfernt) platziert und für 5 min bei -80° C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 5.000 rpm; Eppendorf-Tischzentrifuge), wodurch die Trennung der Agarose (blieb im Filter Cup) von der DNA-Lösung erreicht wurde. Die DNA-Lösung konnte durch Zusatz von 0,1 Vol. 3 M Natriumazetat (pH 5,5) und 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol präzipitiert werden. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm (4° C) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge, wurden der Alkohol abgezogen, die DNA durch Vakuum lyophilisiert, in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer (pH 8,0) aufgelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

**3.19.4 „Glasmilch-Verfahren“**

Das Glasmilchverfahren wurde durchgeführt wie in 3.14.1 beschrieben, es eignet sich insbesondere zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen.

**3.19.5 Elektroelution aus Agarosegelen (McDONNELL et al., 1977)****Material:**

- ◆ Dialyseschlauch (Stärke 0,02 mm; Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ Agarosegel/TAE-Puffer (50X): vgl. 3.18
- ◆ Chloroform (Carl Roth GmbH)
- ◆ Ethanol p.a. (Merck, Darmstadt)
- ◆ 3 M Natriumazetat (pH 5,2; Merck)

**Durchführung:**

Das aus einem präparativen Agarosegel isolierte, das entsprechende DNA-Fragment enthaltende Gelblöckchen wurde mittels einer Pinzette in einen mit 0,5X TAE-Puffer gefüllten Dialyseschlauch luftblasenfrei eingeschlossen und in 0,5X TAE in einer Flachbettapparatur quer zum Feldlinienverlauf platziert. Nach 2 Stunden bei 30 mA wurde für 2 min umgepolt, um die während der Elektrophorese aus dem Puffer in die innere Wand des Schlauchs gewanderte

DNA abzulösen. Der flüssige Inhalt des Schlauchs wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen. Nach Phenol-/Chloroformextraktion (vgl. 3.14.2) konnte die DNA mittels einer Ethanol-fällung (vgl. 3.13.1) gewonnen werden.

### 3.20 Subklonierung von DNA in Plasmidvektoren

#### 3.20.1 Vorbereitung des Plasmidvektors

Material:

- ◆ Vektoren: pUC19 und pNGS21 (New England Biolabs®, Schwalbach)
- ◆ Enzyme: Alkalische Phosphatase (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
- ◆ *EcoR* I (New England Biolabs®)
- ◆ Puffer: 10X CIP-Dephosphorylierungspuffer (Boehringer Mannheim GmbH)
- ◆ *EcoR* I-Puffer (New England Biolabs®)
- ◆ EDTA (Sigma, Deisenhofen)
- ◆ Phenol
- ◆ Chloroform (Carl Roth GmbH)
- ◆ 70% Ethanol (Merck, Darmstadt)
- ◆ Ethanol p.a. (Merck)
- ◆ 3 M Natriumazetat (pH 5,2; Merck)
- ◆ TE-Puffer (pH 8,0; vgl. 3.12)

Durchführung:

Zum Zweck der späteren Klonierung von DNA-Fragmenten in pNGS21 oder pUC19 wurde 1 µg Vektor-DNA über eine Spaltung (vgl. 3.17) mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I (20 U) in einem 10 µl Ansatz in der multiplen Klonierungsregion linearisiert. Anschließend wurden 8 µl des Ansatzes mit alkalischer Phosphatase (2 U/µl) dephosphoryliert, um eine Selbstligation des Vektors weitgehend auszuschließen und die Klonierungseffizienz zu erhöhen. Nach einer Inkubation (30 min, 37° C, im Wasserbad) wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (pH 7,5; Endkonzentration 20 mM) und Inkubation bei 65° C (5 min) gestoppt. Nach einer Phenol/Chloroformextraktion (3.14.2), einer Ethanol-fällung (vgl. 3.13.1) und 1x Waschen in 70% Ethanol (10 min, 13.000 rpm; Eppendorf Tischzentrifuge) wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration wurde mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 3.18) abgeschätzt.

### 3.20.2 Vektor-Insert-Ligation

Material:

- ◆ T4-DNA-Ligase (40.000 U/ml; Stratagene GmbH, Heidelberg)
- ◆ 10X Ligase-Puffer (Stratagene)
- ◆ ATP (10mM; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

Durchführung:

Über eine Veresterung (unter ATP-Verbrauch) wurde die Verknüpfung der kompatiblen überstehenden Enden („sticky-ends“) der Doppelstrang-DNA mittels des Enzyms T4-DNA-Ligase erzielt. Um einen optimalen Klonierungserfolg zu erreichen, wurde nach Anweisung des Herstellers die Vektor- und zu klonierende Fremd-DNA in einem molaren Verhältnis von 2:1 eingesetzt.

Die „Sticky-end“-Ligationen wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 µl (mit 2 U T4-Ligase und 2,5 mM ATP) durchgeführt und über Nacht bei 16° C inkubiert.

### 3.20.3 Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen (modifiziert nach LEDERBERG & COHEN, 1974)

Unter dem Begriff „Transformation“ versteht man die Aufnahme „nackter“ Fremd-DNA (meist Plasmid-DNA) in („kompetente“) Bakterienzellen. Kompetente Bakterienzellen werden in die Lage versetzt, größere Mengen DNA aufzunehmen und nach Aufnahme, Replikation und Expression derselben, andere phänotypische Eigenschaften zu entwickeln (z.B. Antibiotikaresistenz).

Die Farbselektion von rekombinanten Phagen auf IPTG-X-Gal-behandelten Platten beruht auf der Zerstörung eines funktionellen  $\beta$ -Galaktosidase-Gens durch Insertionen in der Polylinker-Region des lac Z-Cistrons. Bei intakter  $\beta$ -Galaktosidase wird X-Gal (farblos) in den Farbstoff Indigo (blau) umgewandelt, wobei IPTG zur Induktion des lac-Operons dient.

## Material:

- ◆ Transformationspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM CaCl<sub>2</sub>
- ◆ 1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid; Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid; 50 mg/ml; Carl Roth GmbH)
- ◆ Medien:     LB-Medium: vgl. 3.9  
              LB-Amp-Platten: vgl. 3.9  
              SOC-Medium: LB-Medium + 10 mM MgSO<sub>4</sub> + 10 mM Glukose
- ◆ Zellen: *E. coli* JM109 (Promega, SERVA, Heidelberg; vgl. 3.9)

## Durchführung:

Zur Erzeugung kompetenter Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E. coli* JM109-Übernachtskultur beimpft und im Schüttelinkubator bei 37° C inkubiert, bis eine Extinktion von 0,3 bis 0,4, gemessen im Spektralphotometer (Pharmacia) bei 660 nm, erreicht wurde (logarithmische Wachstumsphase). Die Zellen wurden für einige Minuten auf Eis gestellt und für 10 min bei 5.000 rpm (Minifuge RF, Heraeus) und 4° C zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren des Bakterienpellets in 25 ml kaltem Transformationspuffer erfolgte eine Inkubation im Eisbad (20 min). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt - unter den gleichen Bedingungen - wurde das Sediment in 2,5 ml Transformationspuffer im Eisbad resuspendiert und inkubiert (30 min). Nach dem Aliquotieren (300 µl Aliquots) der nun kompetenten Zellen in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, wurde je 10 µl vorgekühltes „Ligationsprodukt“ (vgl. 3.20.2) zugegeben und gemischt. Das Zellen-/DNA-Gemisch wurde einem wiederholten Temperaturwechsel unterzogen: 30 min Inkubation im Eisbad, 120 Sekunden im 42° C warmen Wasserbad (Hitzeschock/unter Schütteln), danach sofort für 1-2 min auf Eis abgekühlt und je zu 800 µl SOC-Medium in ein Reagenzglas gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 1 Stunde bei 37° C im Schüttelinkubator (zur Replikation und Expression des aufgenommenen Plasmids), wurden von jedem Reagenzglas 50 µl und 200 µl der transformierten Klone auf je eine LB-Amp-Agarplatte (Durchmesser: 90 mm) getropft, auf die zur Farbselektion je 20 µl 1M IPTG und 20 µl X-Gal aufgebracht worden waren. Die aufgetragene Flüssigkeit wurde ausgespatelt und die Platten bei 37° C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Selektion transformierter Klone wurde anhand der Blau-/Weiß-Reaktion vorgenommen. Zur Analyse der Transformanten wurden Plasmid-DNA wie in 3.16 beschrieben isoliert und eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

### 3.21 Herstellung des $\beta$ -Galaktosidase-Bp1-Fusionsproteins (HUYNH et. al., 1985)

#### 3.21.1 Transduktion rekombinanter $\lambda$ gt11-Phagen in *E. coli* Y1089

Material:

- ◆ *E. coli* Y1089 (vgl. 3.9)
- ◆ Rekombinante  $\lambda$ gt11-Phagen (vgl. 3.11)
- ◆ LB-Amp-Medium (vgl. 3.9)
- ◆ 1 M IPTG (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ X-Gal (Carl Roth GmbH)-Stammlösung: 40 mg X-Gal/ml in Dimethylformamid (Sigma, Deisenhofen)

Durchführung:

Die Bakterienzellen (ca.  $10^9$  Zellen/ml) wurden mit den Phagen im Verhältnis 1:5 auf einer LB-Amp-Agarplatte (90 x 90 mm) mit 40  $\mu$ l X-Gal Stammlösung und 20  $\mu$ l 1 M IPTG ausplattiert und bei 32° C über Nacht inkubiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden der Platte entnommen und auf je zwei LB-Amp-Agarplatten überführt, von denen parallel eine Platte über Nacht bei 32° C und eine Platte bei 42° C bebrütet wurde. Die Selektion erfolgte anhand eines Vergleichs des Wachstums, da das ausbleibende Wachstum bei 42° C Inaktivierung des temperatursensitiven Repressors (Lytischer Phagenzyklus) bedeutet. Die selektierten Kolonien wurden wie in 3.9.1 (bei 32° C) vermehrt und als „Stab cultures“ (vgl. 3.9.2) aufbewahrt.

#### 3.21.2 Expression des $\beta$ -Galaktosidase-Bp1-Fusionsproteins

Material:

- ◆ Rekombinanten Klon enthaltende Übernachtskultur aus 3.21.1
- ◆ LB-Amp-Medium (vgl. 3.9)
- ◆ 1 M IPTG (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ 1X PBS (vgl. 3.4.1)

Durchführung:

50 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer Übernachtskultur aus 3.21.2 (Verhältnis 1:100) beimpft und bei 30° C bis zur  $OD_{600}=0,5-0,6$  inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des temperatursensitiven Repressors und Exzision des Prophagen aus dem Wirtszellgenom wurde durch eine plötzliche

Temperaturerhöhung und Inkubation bei 42° C (20 min) vorgenommen. Ein nicht-induzierter Kontrollansatz wurde entnommen, die restliche Kultur mit IPTG (Endkonzentration: 10 mM; zur Induktion des lacZ-Gens, was Transkription und Translation des Fusionsproteins ermöglicht) versetzt und bei 37-38° C (1-3 h) inkubiert. Induzierter und nicht-induzierter Ansatz wurden zentrifugiert (20-30 min, 4000 x g, 30° C), das Pellet in 1X PBS gelöst und einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 10.000 x g) wurde der Überstand über eine SDS-PAGE (vgl. 3.6.1) analysiert.

### 3.22 Herstellung einer Genombibliothek von *B. pahangi* im Phagenvektor $\lambda$ EMBL3

Zur Verifizierung der cDNA-Sequenz und weiterer Analyse wurden genomische DNA isoliert und eine Genombibliothek von *B. pahangi* im Phagenvektor  $\lambda$ EMBL3 hergestellt. Die genomische Bibliothek stellt einen Satz rekombinanter Klone dar, die – im Idealfall – die gesamte DNA eines Organismus in überlappenden Fragmenten enthalten. Mit geeigneten Methoden ist es möglich, jedes gewünschte Gen zu isolieren und zu untersuchen.

#### 3.22.1 Isolierung von genomischer DNA aus adulten *B. pahangi* (modifiziert nach SAMBROOK et al., 1989)

Material:

- ◆ Adulte *B. pahangi*-Weibchen (vgl. 3.4.2)
- ◆ Extraktionspuffer: 10 mM Tris-Cl (pH 8,0); 0,1 M EDTA; 0,5% SDS
- ◆ RNase A (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
- ◆ Proteinase K (Merck, Darmstadt)
- ◆ Phenol (Roti®Phenol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ Chloroform (Carl Roth GmbH)
- ◆ 3 M Natriumazetat (pH 7,0; Merck)
- ◆ Ethanol p.a. (Merck, Darmstadt)
- ◆ TE Puffer (pH 8,0; vgl. 3.12)

Durchführung:

Adulte *B. pahangi*-Weibchen wurden wie in 3.4.2 beschrieben isoliert und aufbewahrt. Die tiefgefrorenen Filarien wurden mit etwas flüssigem Stickstoff im Mörser (10 min) homogenisiert. Das Material wurde in Extraktionspuffer (bis 0,1 g Filarien/ml) aufgenommen und bei

37° C eine Stunde inkubiert. Die Gewebesuspension wurde mit RNase A (1 h bei 37° C; Endkonzentration 20 µg/ml) und Proteinase K (5 h bei 50° C; Endkonzentration 100 µg/ml) behandelt. Nach 3x Phenol- und 1x Chloroformextraktion wurde die DNA gefällt (0.3 M NaAc, 2.5 Vol Ethanol p.a.) und in TE-Puffer gelöst.

Die DNA Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt und mit TE-Puffer auf 0,5 µg/µl eingestellt.

### 3.22.2 Vorbereitung des Phagenvektors (nach FRISCHAUF et al., 1983)

Bei den Vektoren des EMBL3-Systems handelt es sich um sogenannte „Replacement“-Vektoren. Das zentrale Fragment enthält u.a. die viruseigenen Rekombinationsgene *red* und *gam*, die durch Fremd-DNA (9-23 kb) ersetzt werden können. (*gam*<sup>+</sup>)-Phagen ist es nicht möglich, sich in Bakterien zu vermehren, die mit dem Phagen P2 lysogenisiert (z.B. *E. coli* P2392) sind („sensitive to P2 Inhibition“; **spi**-Selektion). Rekombinante (*gam*<sup>-</sup>)-Phagen können jedoch auf P2-lysogenen *E. coli*-Zellen Plaques bilden.

Material:

- ◆ λ-Vektor: λEMBL3 (*Bam*H I/*Eco*R I; Genofit)
- ◆ Restriktionsenzyme: *Bam*H I, *Eco*R I (New England Biolabs®, Schwalbach)
- ◆ Natriumazetat (pH 6,0; Merck, Darmstadt)
- ◆ Isopropanol (Merck, Darmstadt)
- ◆ 70% Ethanol (Merck)
- ◆ TE-Puffer (pH 8,0; vgl. 3.12)

Durchführung:

Das zentrale Fragment des λ-Vektors wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*H I herausgespalten, im zweiten Schritt wurden mit *Eco*R I die *Bam*H I-Enden abgespalten, um eine Rückligation zu vermeiden. Eine selektive Isopropanolfällung (0.7 Vol. Isopropanol, 0.3 M NaAc pH 6.0, 2x Waschen mit 70% EtOH) entfernte die wenige Nukleotide großen Fragmente. Die DNA Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt und mit TE-Puffer auf 0,5 µg/µl eingestellt.

### 3.22.3 Partielle Spaltung genomischer DNA

#### Material:

- ◆ *Mbo* I (New England Biolabs®, Schwalbach)
- ◆ Alkalische Phosphatase (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
- ◆ 10X CIP-Dephosphorylierungspuffer (Boehringer Mannheim GmbH)
- ◆ EDTA (Sigma, Deisenhofen)
- ◆ Phenol (Roti®Phenol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ Chloroform (Carl Roth GmbH)
- ◆ TE-Puffer (pH 8,0; vgl. 3.12)

Um überlappende Fragmente zu erhalten und damit das sogenannte „Chromosome walking“ zu ermöglichen, wurden niedrige Enzymkonzentrationen (*Mbo* I) eingesetzt, so dass keine vollständige Spaltung erzielt wurde. Auf diese Weise wurden zufallsmäßig verschiedene Fragmente im Größenbereich von 9-23 kb erhalten.

Die präparative Spaltung wurde mit 0,03 U und 0,06 U *Mbo* I pro 0,5 µg (Reaktionsvolumen 30 µl; Inkubation bei 37° C für 1 h) durchgeführt und nach Agarosegelelektrophorese der Bereich von 9-23 kb aus dem 0,4%igem Agarosegel durch Elektroelution (vgl. 3.19.5) isoliert. Die Konzentration der DNA wurde nach einem Dephosphorylierungsschritt (1U CIP/5 µg DNA; Inkubation 1 h bei 37° C, anschließende Inaktivierung mit 1/10 Vol 0.2 M EDTA für 5 min und 65° C) und Phenol/Chloroform-Extraktion (vgl. 3.14.2) mit TE-Puffer auf 0,5 µg/µl eingestellt.

### 3.22.4 Ligation, *in vitro*-Verpackung und Amplifikation

#### Material:

- ◆ Gigapack® II Gold Packaging-Extract (Stratagene, Heidelberg)
- ◆ *E. coli*: P2392: LE392 (P2) (EDGERTON, M.D., unpublished; Stratagene, SERVA, Heidelberg)
- ◆ T4-Ligase (12 U/µl; Fermentas, bts, St. Leon-Rot)
- ◆ ATP (10mM; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
- ◆ 10X Ligase-Puffer („Sticky ends“): 0.2 M Tris-HCl (pH 7,5); 0.1 M MgCl<sub>2</sub>; 0.1 M DTE; 6 mM ATP (ATP wird aufgrund der Instabilität getrennt zur Reaktion zugegeben)
- ◆ Chloroform (Carl Roth GmbH)
- ◆ SM (Sinsheimer Medium): 0.1 M NaCl; 8mM MgSO<sub>4</sub>; 20mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,01% Gelatine
- ◆ LB-Agarplatten (vgl. 3.9)
- ◆ Top-Agar (vgl. 3.9)

### Durchführung:

Zur Vermehrung rekombinanter  $\lambda$ -DNA wird diese zunächst in Phagenpartikel verpackt. Die Verpackungsextrakte bestehen aus zwei unterschiedlichen Lysaten, die gemeinsam alle Hüllproteine des Phagen enthalten. Durch Mischen der Extrakte und Zugabe der concatemeren  $\lambda$ -DNA wird die DNA eingebaut und die Viren aus Köpfen und Schwänzen *in vitro* zusammengesetzt.

Der Reaktionsansatz aus 2  $\mu$ l vorbereiteter  $\lambda$ -Phagen-DNA (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l genomischer DNA (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 0,5  $\mu$ l 10 mM ATP, 0,5  $\mu$ l 10X Ligase-Puffer und 1  $\mu$ l T4-Ligase (4 U/ $\mu$ l) wurde über Nacht zur Ligation bei 4° C inkubiert.

Die Verpackungsreaktion mit dem Gigapack<sup>®</sup> II Gold Packaging Extract wurde nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt: Je 1  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurde im Eisbad dem „Freeze-Thaw“-Extrakt zugegeben und mit 15  $\mu$ l des „Sonic“-Extrakts versetzt. Nach Mischen und kurzem Anzentrifugieren (5 s; Eppendorf-Tischzentrifuge) erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 22° C im Wasserbad. Nach Hinzufügen von 500  $\mu$ l SM-Puffer und 20  $\mu$ l Chloroform wurde gemischt und 1 min zentrifugiert (13.000 rpm; Eppendorf-Tischzentrifuge). Ein Aliquot des nunmehr komplette Phagen enthaltenden Überstandes wurde titriert.

Die Titration erfolgte mit unterschiedlichen Phagenverdünnungen (je 100  $\mu$ l), die in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen zur Adsorption mit je 200  $\mu$ l Bakteriensuspension von *E. coli* LE 392 (OD<sub>600</sub>: Extinktion von 0,1; Vorbereitung der Zellen nach Anweisung des Herstellers) für 20 min bei 37° C inkubiert und anschließend in flüssigem Top-Agar (3 ml, 48° C) auf vorgewärmte LB-Agarplatten ausplattiert wurden. Nach Inkubation im Brutschrank (37° C, über Nacht) waren die Phagenplaques zu erkennen. Anhand der Plaquezahl und unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung konnte der Phagentiter bestimmt werden.

Die Primärphagen wurden über die Methode der Plattenlysate-Amplifikation vermehrt (Ausplattieren der Verpackungen mit dem P2 lysogenen *E. coli*-Stamm P 2392; Dichte 12.000 Plaques auf einer 12 x12 cm großen LB-Agarplatte; Inkubation ca. 8 Stunden). Einige Platten wurden mit 10 ml SM und 0,5 ml Chloroform überschichtet und über Nacht bei 4° C bewegt. Der Überstand wurde zwecks Titererhöhung auf weitere Agarplatten verteilt. Die Überstände wurden vereinigt, zur Entfernung von Bakterienresten zentrifugiert (10 min, 5 000 rpm) und die Suspension auf 0,3% Chloroform eingestellt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4° C oder in 7% DMSO bei -80° C zur Langzeitaufbewahrung.

### 3.23 Screening der genomischen Bank (Klon-Analyse)

#### 3.23.1 Markierungsreaktion („Random-Priming“; modifiziert nach SAMBROOK et al.,1989)

An den aufgeschmolzenen Doppelstrang der zu markierenden Probe (cDNA-Klon Bp1) wurden kurze DNA-Hexamere hybridisiert, die als Primer für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I dienten. Bei der danach ablaufenden Synthese eines neuen Strangs wurde die Markierung durch den Einbau radioaktiver Desoxyribonukleotide erreicht.

#### Material:

- ◆ Hexanukleotid-Primer (20 µg/µl; Boehringer, Mannheim)
- ◆ Klenow-Polymerase (5 U/µl; Klenow Fill-in Kit, Stratagene, Heidelberg)
- ◆ 10X Klenow-Puffer: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,6), 0,1 M MgCl<sub>2</sub>
- ◆ Radioaktives Desoxyribonukleotid: α-<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mM; Amersham, Braunschweig)
- ◆ TE-4-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0); 0.1mM EDTA (pH 8.0)
- ◆ Bovines Serumalbumin (New England Biolabs®, Schwalbach)
- ◆ 96% Ethanol (Merck, Darmstadt)
- ◆ 7,5 M Ammoniumazetat pH 7.5

#### Durchführung:

100 bis 200 ng der über das Glasmilchverfahren (vgl. 3.19.4) isolierten und gereinigten (vgl. 3.14.1) cDNA wurden mit 2 µl Hexanukleotidgemisch und H<sub>2</sub>O ad 10 µl durch Erhitzen (10 min im siedenden Wasserbad) denaturiert und im flüssigen Stickstoff und anschließend im Eisbad abgekühlt. Nach Zusatz von 2 µl 10x Klenow-Puffer, 0,5 µl 10 mg/ml BSA, 0,5 µl 0.1 µM dCTP, 2 µl 0,5 M Lösung übriger dNTPs (je 500 µM), 5 µl α<sup>32</sup>P-dCTP (50 µCi, 3.000 Ci/mM), 5 U Klenow-Polymerase und H<sub>2</sub>O ad 20 µl wurde der Ansatz für 90 min im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Die Fällung erfolgte mit 0,5 Vol. Ammoniumazetat und 3 Vol. 96% Ethanol. Das nach Zentrifugation (20 min, 13.000 rpm; Eppendorf-Tischzentrifuge) gewonnene Pellet wurde 2x mit 80% Ethanol gewaschen, in 100 µl TE-4-Puffer aufgenommen und die Ausbeute der eingesetzten Radioaktivität durch Messung im Szintillationszähler überprüft.

### 3.23.2 Transfer von Plaques auf Nylonmembranen („Plaques lift“)

Analog zur Southern-Blot-Technik lässt sich die Phagen-DNA der Plaques im Topagar auf Spezialpapier übertragen, um sie für markierte Sonden zugänglich zu machen. Auf diese Weise können rekombinante Phagen identifiziert werden.

Material:

- ◆ Nylonmembran QIABRANE (Qiagen, Hilden; zugeschnitten auf 11 x 11 cm)
- ◆ Tinte: India Ink (Pelikan, Hannover); 1:5 in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
- ◆ Injektions-Kanüle (20 G)
- ◆ Filterpapierzuschnitte 3MM (Whatman, Maidstone England)
- ◆ Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 N NaOH
- ◆ Neutralisierungslösung: 1 M Tris (pH 7,4); 1,5 M NaCl
- ◆ 20X SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat (pH 7,0; mit 1 M HCl)

Durchführung:

Auf die ausplattierten Phagen (vgl. 3.21.4) wurden Nylonmembranzuschnitte aufgelegt. Durch mehrere Einstiche in Membran und Agar mit der mit Tinte getränkten Spitze der Kanüle wurde die Orientierung festgehalten. Nach 2 min wurden die Membranen abgenommen und mit der DNA-Seite nach oben für weitere 2 min auf die mit Denaturierungslösung bzw. anschließend Neutralisierungslösung getränkten Filterpapierzuschnitte gelegt. Die Membranen wurden kurz in 2X SSC gewaschen, luftgetrocknet und für 1 h bei 80° C fixiert. Es wurden zur besseren Kontrolle von jeder Platte zwei Filter gezogen.

### 3.23.3 Hybridisierung

Material:

- ◆ 50X Denhardt's: 5 g Ficoll (Type 400, Sigma, Deisenhofen), 5 g Polyvinylpyrrolidon (Serva, Heidelberg); 5 g Bovines Serumalbumin (Fraktion V; Carl Roth GmbH, Karlsruhe); H<sub>2</sub>O ad 500 ml
- ◆ (Prä)hybridisierungslösung: 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.5); 0.1% (w/v) SDS; 5X Denhardt's, 5X SSC; 200 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
- ◆ Waschlösung I: 2X SSC; 0,5% (w/v) SDS
- ◆ Waschlösung II: 0,2X SSC; 0,5% (w/v) SDS
- ◆ Radioaktiv markierte Probe (cDNA des Klons Bp1, 100-200 ng/ml; vgl. 3.23.1)
- ◆ Nylonmembranen aus 3.22.2
- ◆ Blottingpapier (GB 003; Schleicher & Schüll, Dassel)

**Durchführung:**

Die Nylonmembranen (vgl. 3.23.2) wurden in 2X SSC angefeuchtet und mit 40 ml Prähybridisierungslösung in einer Hybridisierungsröhre 30 min bei 45° C im Hybridisierungssofen (Bachhofer, Ebersberg) prähybridisiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung dekantiert. Die radioaktiv markierte DNA-Probe (cDNA-Klon Bp1, 100-200 ng/ml; vgl. 3.23.1) wurde 10 min im siedenden Wasser denaturiert, im flüssigen Stickstoff und anschließendem Eisbad abgekühlt und vermischt mit ca. 8 ml Prähybridisierungslösung zu den in der Hybridisierungsröhre befindlichen Membranen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Hybridisierungssofen bei 45° C. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen in Waschlösung I (RT) und II (ca. 50° C) unter Schwenken gewaschen, anschließend auf Blottingpapier (GB 003, Schleicher und Schüll, Dassel) getrocknet und feucht in Schlauchfolie eingeschweißt. An die Hybridisierung schloss sich die Autoradiografie an.

**3.23.4 Autoradiografie**

Durch Autoradiografie konnte das durch Random-Priming (vgl. 3.23.1) in die Probe eingebaute  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP nachgewiesen werden.

**Material:**

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>◆ Intensifying Screens (Amersham, Braunschweig)</li><li>◆ Kodak scientific Imaging Film X-Omat™ LS-Film (Kodak, New York)</li></ul> |
|---|

**Durchführung:**

Die Membranen (vgl. 3.23.2 und 3.23.3) wurden feucht in Frischhaltefolie eingeschlagen oder in Schlauchfolie eingeschweißt und zusammen mit einem für Autoradiografie geeigneten Film in Röntgenfilmkassetten mit Verstärkerfolien (Intensifying Screens) bei -70° C mehrere Tage lang exponiert. Nach der Entwicklung des Films konnten nach „Plaques lift“ positive Phagen bzw. nach Southern-Blot-Analyse markierte Banden identifiziert werden.

### 3.23.5 Isolierung der mit der markierten Probe hybridisierenden genomischen Klone

#### Material:

- ◆ LE 392 kompetente Zellen (vgl. 3.21.4)
- ◆  $\lambda$ -Diluent: vgl. 3.11
- ◆ Chloroform (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ Pasteurpipetten

Plaques, die in der Autoradiografie positive Signale gezeigt haben, wurden mit dem weiten Teil einer Pasteurpipette aus dem Agar ausgestanzt, in je 500  $\mu$ l  $\lambda$ -Diluent (einen Tropfen Chloroform enthaltend) überführt und über Nacht bei 4° C aufbewahrt. Der Titer wurde bestimmt wie in 3.11.3 beschrieben.

### 3.23.6 Spaltung genomischer DNA mit Restriktionsenzymen und gelelektrophoretische Auftrennung

#### Material:

- ◆ Restriktionsenzyme: *EcoR* I, *Sal* I, *Hind* III, *Pst* I, *EcoR* V, *Nsi* I (New England Biolabs®, Schwalbach)
- ◆ 0.8%iges Agarosegel (vgl. 3.18)
- ◆ 1X TBE (vgl. 3.18)
- ◆ Ethidiumbromidlösung (3.18)

#### Durchführung:

Zur weiteren Analyse wurde genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*EcoR* I, *EcoR* I/*Sal* I, *Sal* I, *Hind* III, *Hind* III/*Sal* I, *Pst* I/*Sal* I, *EcoR* V, *Nsi* I, *Pst* I) wie in 3.17 beschrieben gespalten und mit Molekulargewichtsmarkern zur Koelektrophorese auf einem 0.8%igen Agarosegel (Gelgröße 18 x 11 x 0.4 cm) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1X TBE-Puffer für 5 h bei 100 V. Das Gel wurde anschließend für mehrere Minuten in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und unter UV 312 nm fotografiert (Polaroid-Dokumentation, vgl. 3.18).

### 3.23.7 DNA-Transfer durch Kapillarblotting (Genomischer Southern-Blot; nach SOUTHERN, 1975)

Die sogenannte „Southern-Blot“ -Technik (SOUTHERN, 1975) ermöglicht den Transfer der zu untersuchenden DNA (nach Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen) aus einem Agarosegel auf eine geeignete Membran. Bei der hier angewandten Technik erfolgte der Transfer durch Nutzung der Kapillarkräfte. An den Southern-Blot schloss sich die Hybridisierung (3.23.3) und Autoradiografie (3.23.4) an.

#### Material:

- ◆ 0.25 M HCl (Merck, Darmstadt)
- ◆ Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl (Merck)
- ◆ 20X SSC (vgl. 3.23.2)
- ◆ Filterpapier 3MM (Whatman, Maidstone England)
- ◆ Nylonmembran QIABRANE (Qiagen, Hilden)
- ◆ Parafilm M (American Can Comp.)
- ◆ Zellstofftücher (Einmal-Papierhandtücher, haushaltsübliche Ware)

#### Durchführung:

Das Agarosegel (vgl. 3.18) wurde mit den darin nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmenten vor dem Transfer zur partiellen Depurinisierung (Einzelstrangbrüche werden erzeugt, wodurch auch größere Fragmente effizient gebロットet werden können) in einer 0,25 M HCl-Lösung für 2x 10 min und anschließend zur Denaturierung und Hydrolyse der DNA in Alkali (Denaturierungslösung) 2x 15 min geschwenkt. Die Filterpapiere wurden in 20X SSC und die Nylonmembran in H<sub>2</sub>O und 2X SSC angefeuchtet. Eine Glasplatte wurde auf eine mit 20X SSC gefüllte Schale gelegt, über deren Rand zwei Filterpapiere als Saugdocht in die Pufferlösung ragten. Darauf wurden ein Filterpapier in Gelgröße, das Agarosegel (mit Parafilm um den Gelrand), die Nylonmembran, ein weiteres Filterpapier und ein Papierhandtuchstapel platziert. Der Aufbau wurde mit einem Gewicht beschwert. Nach dem Transfer über Nacht wurden die Lage der Auftragstaschen mit Bleistift auf der Membran markiert, die Membran in 2X SSC gewaschen und die DNA durch UV-Crosslinking (30 s; Stratalinker, Stratagene, Heidelberg) fixiert.

### 3.24 Sequenzierung der DNA nach der Kettenabbruchmethode (SANGER et al., 1977)

#### 3.24.1 Sequenzierung der cDNA

Das verwendete Sequenzier-Kit (CircumVent™ Phototope™ Kit, New England Biolabs®) nutzt für die Sequenzierungsreaktion die Methode nach SANGER et al. (1977), die auf der Fähigkeit der DNA- Polymerase beruht, zur Primer-Extension bis zur Inkorporation eines terminierenden Didesoxyribonukleotids zu führen. 2',3'-Didesoxyribonukleotide dienen hierbei als Substrat-analoga der 2'- Desoxyribonukleotide und werden in den elongierten DNA-Strang zufällig eingebaut. An den Stellen der Inkorporation der Didesoxyribonukleotide terminiert die DNA-Synthese aufgrund des Fehlens der für die Knüpfung der nächsten Phosphodiesterbrücke nötigen 3'- Hydroxylgruppe. Die gesuchte Sequenz konnte nach Auftrennung der Oligomere in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und DNA Transfer auf die Membran (NY 13N Nytran, Schleicher & Schüll, Dassel) aus dem resultierenden Bandenmuster abgeleitet werden. Das Bandenmuster wurde nach Durchführung einer Chemolumineszenzreaktion durch die Emission von Licht auf einem Röntgenfilm (X-Omat™ LS; Kodak) sichtbar gemacht.

##### 3.24.1.1 Sequenzierungsreaktion/PCR (Polymerase Chain Reaction)

Material:

- ◆ CircumVent™ Phototope™ DNA Sequencing Kit (New England Biolabs®, Schwalbach/Ts.)
- ◆ Biotinylierte  $\lambda$ gt11-Primer („forward“ und „reverse“; New England Biolabs®), mit TE- Puffer (pH 8,0; vgl. 3.12) auf 1,2 pM/ $\mu$ l, vorrätig gehalten bei  $-20^{\circ}$  C.
- ◆ DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis* (Vent® (exo-) DNA Polymerase, New England Biolabs®)
- ◆ Mineralöl (Sigma, Deisenhofen)

In der Sequenzierungsreaktion wurden biotinylierte  $\lambda$ gt11-Primer („forward“ und „reverse“) des Herstellers (New England Biolabs®, Schwalbach/Ts.) und die exonukleasefreie DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis* (Vent® (exo-) DNA Polymerase) eingesetzt. Durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden nach Denaturierung, Annealing und Extension in Gegenwart von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTP) und Didesoxyribonukleotid-Triphosphaten (ddNTP) Reaktionsprodukte linear amplifiziert.

**Durchführung:**

Die Reaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit vier verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Als Template diente der cDNA-Klon Bp1 (vgl. 3.11 und 3.12). Je 1 µg DNA wurde mit 2,4 pM biotinyliertem Primer, 1 µl 30X Triton X-100, 1,5 µl 10X Vent Puffer und 2 U Vent®(exo) DNA-Polymerase versetzt (Gesamtvolumen 15 µl). Jedes der vier Aliquots von je 3,2 µl wurde mit vier dNTPs sowie einem ddNTP versehen. Die Reaktion fand im Thermal Cycler (Hybaid Thermal Reactor, Model No. HB-TR1, Hybaid Limited, Middlesex, USA) unter folgenden Bedingungen statt:

1. Denaturierung (95° C, 20 s)
2. Annealing (55° C, 20 s)
3. Extension (72° C, 20 s).

Die Reaktion wurden nach 20 Zyklen durch Zugabe des im Kit enthaltenen Lade-/Stop-puffers (4 µl je Ansatz) abgestoppt.

### 3.24.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

**Material:**

- ◆ Rotiphorese® DNA-Sequenzier-Kit (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- ◆ Laufpuffer: 1X TBE-Puffer (vgl. 3.18)
- ◆ Sequenzierereinrichtung: „Model S2 Sequencing Gel Electrophoresis System“ (BRL Life Technologies, Eggenstein) für Gele mit den Maßen 30 x 40 x 0,04 cm.

**Durchführung:**

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 8%igen Polyacrylamidgelen, die mit dem Rotiphorese® DNA-Sequenzier-Kit (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers vorbereitet wurden. Die Pufferkammern der Sequenziervorrichtung (Vertikal-Elektrophoresekammer der Fa. BRL Life Technologies, Berlin) wurden mit 1X TBE-Puffer gefüllt. Vor dem Beladen für den 1. Lauf wurden die Proben im Thermal Cycler 2 min bei 94° C denaturiert. Von jedem Reaktionsgemisch wurden je 3 µl pro Geltasche aufgetragen. Vor dem Probenauftrag fand eine Präelektrophorese von ca. 15-30 min Dauer statt, um Nicht-Puffer-Ionen aus dem Gel zu entfernen. Die Auftrennung erfolgte bei 1500-1900 Volt (30-45 mA/ 60 Watt). Als Spannungsquelle diente ein Gerät der Firma BRL Life Technologies, Eggenstein.

### 3.24.1.3 DNA-Transfer durch Kapillarblotting

#### Material:

- ◆ Nylon Membran (NY 13N Nytran, Nukleinsäure- und Transfermedium 0,45 mm, Schleicher & Schüll, Dassel)
- ◆ Blottingpapier: 3MM Filterpapier (vgl. 3.23.7)
- ◆ Transferpuffer: 0,5X TBE (vgl. 3.18)
- ◆ Parafilm M (vgl. 3.23.7)
- ◆ Zellstofftücher (vgl. 3.23.7)

Nach Beendigung des letzten Laufs wurde ein Kapillarblot durchgeführt wie in 3.23.7 beschrieben. Allerdings wurden abweichend die vom Hersteller des Kits (vgl. 3.24.1.1) vorgegebenen Materialien benutzt.

### 3.24.1.4 Crosslinking

Nach dem Abbau des Blots wurde die Membran bei 45° C für 30 min getrocknet und die DNA durch Crosslinking unter Benutzung eines Transilluminators als UV-Lichtquelle (254 nm; 20 s) an die Membran fixiert.

### 3.24.1.5 Chemolumineszenzreaktion

#### Material:

- ◆ CircumVent™ Phototope™ DNA Sequencing Kit (New England Biolabs®, Schwalbach/Ts.)
- ◆ Phototope™ Detection Kit 30K (New England Biolabs®, Schwalbach/Ts.)
- ◆ Blocking Solution (5% SDS/Phosphatlösung, pH 7,2): 125 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 173 mM SDS
- ◆ Waschlösung I (0,5% SDS/Phosphatlösung): 1:10 verdünnte Blocking Solution in ddH<sub>2</sub>O
- ◆ Waschlösung II (10X), pH 9,5: 100 mM Tris-HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- ◆ Röntgenfilm: Kodak Scientific Imaging Film X-Omat™ SL (Kodak, New York)

#### Durchführung:

Die Membran wurde in einer Plastikwanne in ca. 150 ml Blocking Solution (0,1 ml pro cm<sup>2</sup>) 5 min bei 37° C unter Schwenken inkubiert. Die Streptavidin-Stocklösung (Phototope™ Detection Kit 30K) wurde in Blocking Solution auf 1 µg/ml verdünnt (Gesamtvolumen 60 µl) und nach Abgießen der Flüssigkeit aus dem 1. Schritt zur Membran gegeben. Nach erneuter Inkubation

- unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben - folgten zwei Waschschr tte in je 500 ml 1:10 verdünnter Blocking Solution (Waschlösung I; 0,5 ml pro cm<sup>2</sup>) für jeweils ebenfalls 5 min. Biotinylierte Alkalische Phosphatase (Phototope<sup>TM</sup> Detection Kit 30K) wurde mit Blockierungslösung auf eine Konzentration von 0,5 µg/ml eingestellt und mit der Membran (0,05 ml pro cm<sup>2</sup>) 5 min inkubiert. Nach zwei Waschschr tten in je 500 ml 1:10 verdünnter Waschlösung II (0,5 ml pro cm<sup>2</sup>) wurde die Membran 5 min in 25 ml 1:100 verdünntem Lumigen-PPD-Reagenz (Phototope<sup>TM</sup> Detection Kit 30K) getränkt und in Folie luftblasenfrei eingeschweißt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms und zweistündiger Exposition bei RT in einer Autoradiografiekassette konnte die Sequenz anhand des Bandenmusters ermittelt werden.

### 3.24.2 Computerunterstützte Sequenzanalyse der genomischen DNA

Die DNA-Sequenzen wurden unter Benutzung des ABI PRISM<sup>TM</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer Corp.) ermittelt. In der Sequenzierungsreaktion wurden jeweils 376 ng DNA und 3,2 pM spezifischer Primer (MWG-Biotech GmbH, Ebersberg) pro Ansatz (Gesamtvolumen 20 µl) eingesetzt. Es wurde Schritt für Schritt von beiden Enden die 6,0 kb und 3,8 kb großen Fragmente überlappend sequenziert. Zusätzlich wurden interne spezifische Primer (aus der cDNA-Sequenz) eingesetzt.

### 3.25 Computergestützte Homologiesuche

Die ermittelten DNA-Sequenzen wurden zum Vergleich mit bekannten Sequenzen auf DNA- und Aminosäure-Ebene einer Homologiesuche unter Verwendung der Programme Fasta (PEARSON & LIPMAN, 1988) und BLAST-Algorithm (Basic Alignment Search Tool, ALTSCHUL et al., 1990) unterzogen. Auf die EMBL/GenBank-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk>) wurde zur Analyse zurückgegriffen. Eine Genkarte wurde mit Hilfe des Programms Clone Manager for Windows (Version 4.0; Scientific & Educational Software) erstellt. Zur weiteren Analyse wurde auf GENSCAN 1.0 (BURGE & KARLIN, 1997; <http://genome.dkfz-heidelberg.de/cgi-bin/GENSCAN>) und GENE-FINDER (SOLOVYEV & SALAMOV, 1999; <http://genomic.sanger.ac.uk/qf/qfb.html>) zurückgegriffen. Die Proteinsequenz wurde ferner über den CBS-Server (Signalpeptid-Vorhersage) <http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP> und PROSITE analysiert (<http://www.ebi.ac.uk/htbin/prosite>).

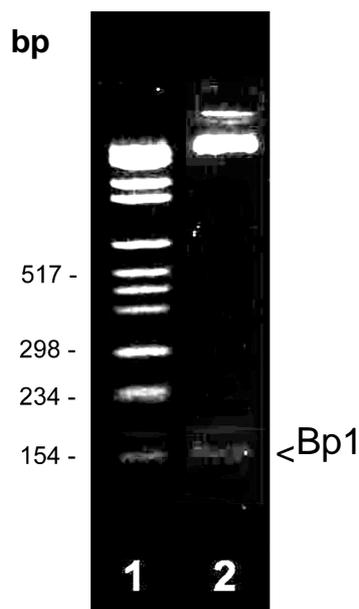
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Immunoscreening der $\lambda$ gt11/*B. pahangi*-cDNA Bank

Die cDNA Bank aus adulten *B. pahangi* wies einen Titer von  $0,8 \times 10^6$  pfu/ml auf. Beim Screening von insgesamt 140.000 Phagen mit dem Serum Anti-p fanden sich 33 reaktive Klone, die über „Rescreenings“ aufgereinigt wurden. Bei 16 handelte es sich um falsch positive Klone. Von den verbliebenen 17 – mit positiven Signalen auch nach mehreren Aufreinigungsschritten - wurde ein cDNA-Klon (Bp1) aufgrund der eindeutigen Reaktion mit dem Serum zur Charakterisierung mit molekularbiologischen und immunologischen Standardtechniken ausgewählt. Die Rescreenings wurden so oft wiederholt, bis Kontaminationen durch benachbarte Bakteriophagen ausgeschlossen werden konnten.

### 4.2 Größenbestimmung, Subklonierung und Sequenzierung des cDNA-Klons Bp1

Die isolierte  $\lambda$ -DNA des cDNA-Klons Bp1 wurde einer restriktionsendonukleolytischen Spaltung mit dem Enzym *EcoR* I unterzogen. Der Restriktionsansatz wurde mittels analytischer Agarosegelelektrophorese untersucht (vgl. Abb. 3). Anhand des gleichzeitig aufgetragenen Längenstandards wurde die Größe des  $\lambda$ gt11-Inserts bestimmt. Die cDNA von Bp1 wies eine Größe von 156 bp auf (vgl. Abb. 3). Bp1 wurde in den Vektor pNGS subkloniert und von beiden Enden ausgehend sequenziert. Die cDNA- und die daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz von 52 Aminosäuren sind aus Abb. 5B (AS 5754-6104) ersichtlich.



**Abb. 3: Restriktionsanalyse des  $\lambda$ gt11 Klons Bp1**

Auftrennung des Spaltungsansatzes über ein 2%iges Agarosegel mit nachfolgender Ethidiumbromidfärbung.

(1) DNA-Längenstandard VI,

(2) *EcoR* I-Verdau des cDNA-Klons Bp1

Die cDNA von Bp1 weist eine Größe von 156 bp auf.

### 4.3 Screening der genomischen *B. pahangi*-Bank

Die aus *B. pahangi*-Weibchen hergestellte genomische Bibliothek (im Phagenvektor  $\lambda$ EMBL3) wies einen Primärtiter rekombinanter Phagen von  $1,0 \times 10^6$  auf. Nach der Amplifikation (in *E. coli* P2392) wurde ein Titer von  $1,6 \times 10^9$  erreicht.

Für das Screening wurde die  $^{32}\text{P}$ -markierte cDNA (Bp1) als Probe ( $2 \times 10^4$  counts nach „Random-Priming“) eingesetzt. Mit der Probe hybridisierende Klone wurden über Rescreening aufgereinigt und deren Phagen-DNA isoliert. Zur weiteren Analyse wurde die Phagen-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (s. Abb. 3A).

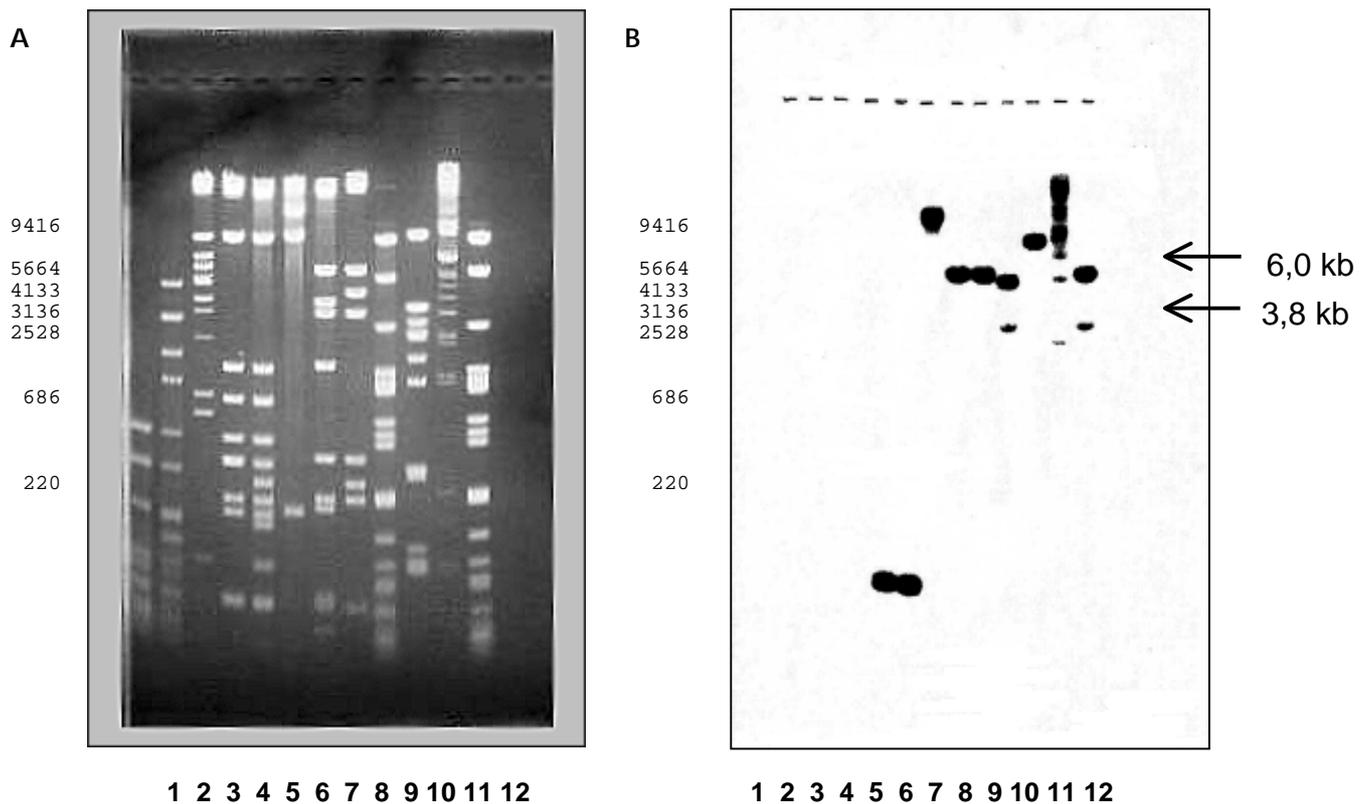
### 4.4 Southern-Blot-Analyse der rekombinanten Phagen-Klone

Bei den Restriktionsspaltungen *EcoR* I, *Hind* III, und *EcoR* V hybridisierte je nur ein Fragment mit der radioaktiv markierten Probe (vgl. Abb. 4B). Die als Probe dienende cDNA (Bp1) verfügt über keine interne Schnittstelle für diese Enzyme.

Aus der Restriktionsspaltung mit dem Enzym *Pst* I resultierten zwei mit der Probe hybridisierende Fragmente (6,0 und 3,8 kb), die zur weiteren Untersuchung aus einem präparativen Agarosegel (0,8%) isoliert wurden.

### 4.5 Subklonierung und Sequenzierung der *Pst* I-Fragmente (gBp1)

Die mit der radioaktiv markierten Probe hybridisierenden 6,0 und 3,8 kb-Fragmente wurden in den Plasmidvektor pUC19 subkloniert und die DNA-Sequenz ermittelt. Die Sequenzierung wurde von beiden Enden ausgehend und mit internen spezifischen Primern aus der Bp1-cDNA-Sequenz überlappend durchgeführt. Insgesamt wurde ein genomischer Abschnitt von 10110 bp sequenziert, der das vollständige Bp1-Gen enthält. In Abb. 5A sind die genomische Organisation und das Ergebnis des Homologievergleichs mit der „GenBank“-Datenbank (vgl. 3.25) schematisch dargestellt; in Abb. 5B die genomische Sequenz. Aufgrund der Vorhersage der Exon/Intron-Grenzen und Kodierregionen mit den Programmen GENSCAN und GENE-FINDER (vgl. 3.25) ergaben sich für das Bp1-Gen fünf potentielle Exons. Die der isolierten partiellen cDNA-Sequenz entsprechende genomische Sequenz überspannt zwei Introns,



**Abb. 4 A/B: Southern-Blot-Analyse von gBp1**

**A:** Gelelektrophorese in einem 0,8%igem Agarosegel nach Restriktionsspaltungen. Die Fragmente wurden durch Färbung in Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Spur Nr: ..... Auftrag:

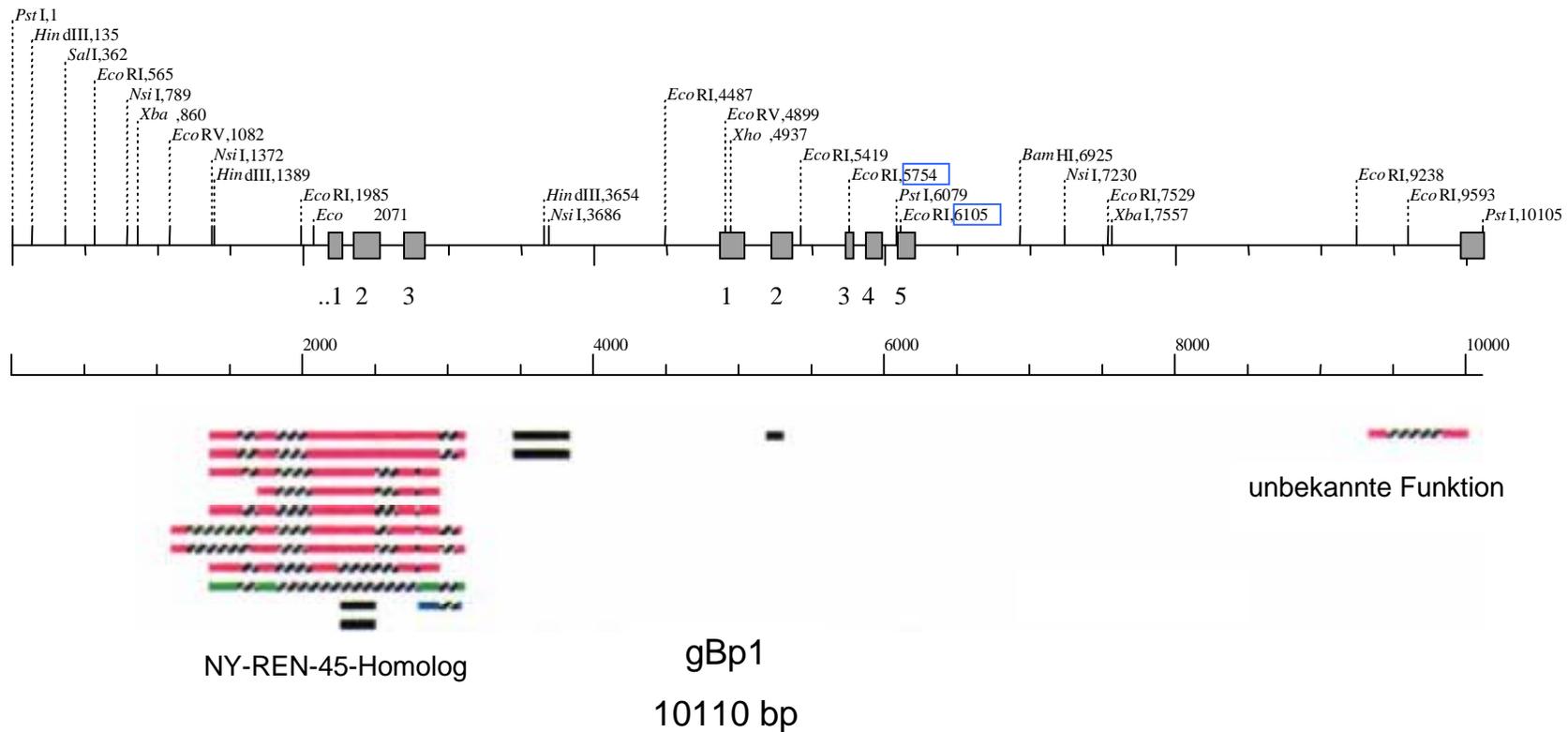
- (1)  $\lambda$  dv1-DNA-Längenstandard
- (2)  $\lambda$  dv1 Octamer-DNA-Längenstandard
- (3) DNA-Längenstandard II
- (4) Bp1-Phagen-DNA verdaut mit *EcoR* I
- (5) Bp1-Phagen-DNA verdaut mit *EcoR* I/*SalI*
- (6) Bp1-Phagen-DNA verdaut mit *SalI*
- (7) Bp1-Phagen-DNA verdaut mit *Hind* III/*SalI*
- (8) Bp1-Phagen-DNA verdaut mit *Hind* III
- (9) Bp1-Phagen-DNA verdaut mit *Pst* I/*SalI*
- (10) Bp1-Phagen-DNA verdaut mit *EcoR* V
- (11) Bp1-Phagen-DNA verdaut mit *Nsi* I
- (12) Bp1-Phagen-DNA verdaut mit *Pst* I

**B:** Autoradiografie nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Probe (cDNA-Klon). Die Pfeile zeigen die 6,0 und 3,8 kb Fragmente in Spur 12.

beginnend mit der *EcoR* I-Restriktionsschnittstelle im Exon 3 (Position 5754 der genomischen Sequenz) bis zur *EcoR* I-Restriktionsschnittstelle im Exon 5 (Position 6110 der genomischen Sequenz). Die abgeleitete cDNA dieses genomischen Abschnitts ist mit der Sequenz der isolierten cDNA identisch. Vor dem ersten potentiellen Exon liegt eine Spleiß-Akzeptor-Sequenz, die vermutlich als *Trans*-Spleiß-Akzeptor dient (Position 4874-4879 in Abb. 5B). Eine Konsensus-Polyadenylierungssequenz (AATAAA) fehlt in der potentiellen 3' nicht translatierten Region. Die abgeleitete cDNA der fünf Exons kodiert für ein Polypeptid von 185 Aminosäuren.

#### 4.6 Homologiesuche

Die computerunterstützte Homologiesuche in den Datenbanken ergab signifikante Homologien in der sequenzierten genomischen Sequenz. Insbesondere fanden sich Homologien in der Region zwischen 2 und 3 kb und bei 10 kb (Verteilung vgl. Abb. 5A). Signifikant war insbesondere die Homologie (90% Identität, Position 2171-2266, 2351-2570, 2690-2825) mit dem „GenBank“-Eintrag AA 842051, ein Klon aus einer cDNA-Bank adulter *B. malayi*-Weibchen. Signifikante Homologien fanden sich auch mit AZ515383 *B. malayi* Genomic Bac Library 1 & 2 *B. malayi* genomic, DNA sequence (Position 3661-3875; Identität von 92%) und mit AW114883 *Pristionchus pacificus* cDNA (Position 2118-2270, 2246-2533) mit einer Übereinstimmung von 69%. Zusätzlich fand sich hier eine Homologie auf Aminosäureebene mit *C. elegans* T23B12 (Position 2295-2528, Exon 3; Identität von 86%). Alle genannten Sequenzen mit Homologie zu der Region zwischen 2-3 kb sind auf Aminosäureebene zu 40% identisch mit dem humanen Nierenzelltumor-Antigen NY-REN-45. Eine weitere signifikante Übereinstimmung wurde zu AW562153 *Onchocerca volvulus* adult female cDNA (Position 10110-9956) mit einer Identität von 79% (auf Aminosäure-Ebene von 90%) und in diesem Bereich auch zu einem *C. elegans*-Klon C13C12/960628 gefunden. In der Region der Bp1-cDNA-Sequenz (Position 5754-6104) fanden sich keine hochgradig homologen Sequenzen und auf Aminosäure-Ebene keine signifikanten Homologien, die einen Rückschluss auf die mögliche Funktion des Bp1-Proteins ermöglichen würden (vgl. Abb. 5A). Eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (N-Glykosylierungs-Potential von 0,7 bei einem Schwellenwert von 0,5) findet sich für Asparaginsäure (AS 83; vgl. Abb. 5B).



**Abb. 5A: Genomische Organisation des Bp1-Gens**

graue Kästchen: vorhergesagte Exons nach GENSCAN-Analyse; farbliche Bereiche: Verteilung von 57 Treffern aus der BLAST-Homologiesuche in der „GenBank“-Datenbank (abnehmende Homologie von rot nach grün, blau, schwarz). In der Region der Bp1-cDNA-Sequenz (Position 5754–6104, blaue Kästchen) fand sich keine signifikante Homologie.

**Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Gens gBp1**

1 ctgcagtggaagtcattatgaatggttctccattcaaagcatcgcaacagccacgtttgc  
61 ttccaagcatggaagctaaatttcaagtgaggattagaattatgtgcataagttacttat  
121 tattacaaccaattaagcttgattgtatcattgattcttcccgattttgtctttccttat  
181 gcaaaagttcgatgtgggaagtgaaacattttaagatttgattaatgaataggcttaaac  
241 gatagcttaaatTTAAGAAAAGTGGTATATTTTTTTCATACATATTTACTGAGTGGACG  
301 atcaaaagtttactgaaattaatTTTTTTTTTTCAGGTTCCACATGCCGTCGAAGTATT  
361 ggtcgacaaaactgtaaatatgtctttattagagaaaaatTTTtagatgcttctatagat  
421 attgTTTTatattaatTTTactgaataatTTTctacgcatagctatTTcagagcacac  
481 acaatgTTTgcagtaacctTTTtaaaatTTactcaaaccttatgaagaagagctcgtctg  
541 aattaactcgtcaggtaatcacctgaattcgtttcgtgatacacatcgatacaactgct  
601 tatcacaaccagttgcattacaaatgacacttatctcactagcttactTTTTtactctga  
661 acctTTTgTgtagtattTctactTTTctTTcagctgaaaggcgagttatcactgTtgatg  
721 cgttactcTgcacgggtatctgatcgtgggtaccctcaagttTggcaacaaaacaccgct  
781 tgaagccatgcatcattTgcaaatgaaggtaattcttgactcggTTTgtatattTtcat  
841 ttcaaacacattTTTcattTTctagatccaaaatatccagtcagTaccggaaaaatcggaag  
901 cagcaaaccttatcagTggaaagtagcagcaatacgtcaaggaaacacatcacagaattTg  
961 cttcacatctcccagtagatagTtttagattTTtatgatatgtaattTctcctTctcaagga  
1021 aattgctcattTctgcaattaaacactTtgactacataaaaatatcaaggcttaactTTTT  
1081 tgatatcctTcaggTtatgtatccctagtaaatTgtcggaaaccactaagagTtcgagTg  
1141 attcagacacattataatgcagTtgccgtaggTtatgcaaatTTTgTgTgTgTtacagg  
1201 taattgTTTattTTTactaccatcattagctTTTcctTTTcacgaagTtTctTgcatgcact  
1261 aagaagaaacaccactactaaaatgatccagTatcctactTTaaatctTcacctTcacct  
1321 accagcaaaaggagaaaagTttTtaaaatTctggataaattcttaattTcatgcataga  
1381 atgaaggaaagctTgggtTggcaacagctgtatatatcgccacgTatggatgctgTtgtt  
1441 cgtcatgtagcgtTgtatgcaaaatTggcgaaaaaatgctggctgTtTcattaactaat  
1501 aatgctatacattTatggaatattTcagaaggagatgctaaattTcgggaccaaaaatTggt  
1561 gattTTTTctTTTctTTTTtaataaaatTattgaaTTTTggtgTcggcgaaacaacaca  
1621 gaagtgatagTtTgcaataagattataaatctctaacaatTtTggaataagccatattT  
1681 tgaatattTcgagaaaattTccgTgcaggaacgTtTcactctctTggtTgctgTtgataagT  
1741 tgtctTTTatTgggagccagTtTggtgagcgtTaaagTaaaatTggaaagTtTggaatctggc  
1801 atccaatgactcataattTggcaagTccaagTcagTaaatgTtctcatgctgTtgctgaa  
1861 aatcaggaaagTtTcttattactgctataagTatccattTaacaccaaaaataagctcatg  
1921 cTTtaatgaaataagatcatggtTtcatTctgctgatataaaacacaaaagctcattTtag  
1981 tcatgaaTtctgacgcaattTtgcataTtcatataattTTTTtaagTcctTtgggaaTca  
2041 tagTgctTccctcatcgtagatgTtTgTcgcgatatcatgTtatgatacggTcggTcgggT  
2101 cattTTTgctTctcggatgcactaatggatctattTattatattgatatgcaaaaatccc  
2161 cTTTgcgatgaaagataacgattTgctaattacggaaactTTatcgaaatccaaacgctg  
2221 atgttaacactgctataagcgtctattTgacaccgaaaacaattatattTTTgcatgTtT  
2281 gaactgTtcaaaaatTTaaatcatgaaaaacagaatctTgctTTTctcactgcacaact  
2341 tgaatTTTTtagatctTcgtggaaatTggattgaaatTgcttatgggactTcaagTggtg  
2401 gtgtccgagTaatcgtgcagcatccaaaacagTtTggtcatggccacaactattccaaa  
2461 catacactgtgcatacatctccagTtacacgagTcgtctcactaccaaccatcttatca  
2521 gcggtgaggatgaagtgaagttagTtataccTTTcatggtTcagTttTgattTTtatcc  
2581 atctactcataagaacactTTTTcaattTaaatgtaagataaaaatctTctgagatattca  
2641 tccagTtctcactgTttatgtaccagTtTgaaagTttTatcgcactTTtagTgtgcagTga  
2701 atataatcatgTtTcgtTcctggggTgtaaacagTttTcgtggcatgattTcgcagcagcc  
2761 aggaagtacatctTtggcatctTtcaagTgctTaccattaaatTgtaaaatgctatag  
2821 gTtattgattTgTgTgctTgcaagTtTgtactattcgaaccgTtTggtgattcagcaataa  
2881 ctgcctTTTTggtTcacgaatgTgaagTtTcacgcgTaaatTcaagaccgacgagattTt  
2941 tgtTcactggaactTccaatggtTccattcgaagTgagatattTgtTccgaccttattgct  
3001 aggactgaaTcattTTaaatcagTaaTtTggtTccaggagTtTgaaTgctactagTgaaga  
3061 tgattTaaTatctctTctgTtTgaaTtTccgcattTattTcagatgTgggactTaaacaaca  
3121 gctTtTggaccagTatcacgctagTtatcattcccaatTTTTctTtaagTaatcaaacaa  
3181 gtgcagctcagaaaacagctggtactgtatctTcgactactacagcatctattaacgcca  
3241 atgctatactTTTTgcaagTcagaccagTggtatcatacggcaagTcagTattTcattTta  
3301 tTaaagTttTaatagTtTgtatattTaaatcgtTaaTactTTtatctataacgTaaTaaag  
3361 TaaagTttTatctaaaacgTaaTaaTaaTaaTaaTaaTaaTaaTaaTaaTaaTaaTaa  
3421 atacattactgTaaTtTgggTgctgcactaaacattTtaggctggtTtTggtgacattTatt

3481 aagggttgggtattgtggtttttatgtcggttgggttagaagtcgagttctaaaaaattcga  
 3541 gatttcagtcacatctttaagtggttaattcccataagatttaaagtttggtttttaggga  
 3601 ccaactcctgatgaacttctccggttgattgatgactgtgagatttgggtgtacaagcctg  
 3661 agcacaacaccgtaaaatacaccgcatgcacctccgtacatttatccgaactggattgt  
 3721 caacgccactactagaagcaatcttcttatttatgaatagatgtacagaaaagtatatatt  
 3781 tttcattcttctgtgataaattatgtatattaattgaataaaactctttccctatggg  
 3841 ttctgtagtttaggtttttattgatttttcatcgaaaaaattttctgtatttgtaaat  
 3901 aatataatgcgaaaaatctctacaatgttgcggttgcgcgcgcttcaatggaatgccaaat  
 3961 aaacttggtgattgcattttgaaatgacacaaaagcaatcgattgaatgaagttaacagc  
 4021 atatgtttttctaggtggttatttggttccgaaaatgtgtatattgacatacggtttggtg  
 4081 tgaattcagtcactcatagtggaagccaatgatgattagaaggataattatcgtgaaaaat  
 4141 atgtggaacagtaatgtagacttcaggacttcatcgcactattttatttgattatcgt  
 4201 gtaacttcagtggtgcatcctggttgacatgtctttatagattttctttttcactt  
 4261 tttcaaagttttttgattggactgtgacaacagtaaaataaacatcagtttcattcat  
 4321 aatgtttaatgtttgtagttcgttgcataaatgtatccacggtgttctttcttatttcc  
 4381 aaatttcagtggtttttgggtgatcatataactcgtttgctggttctgacctgtcgaaaat  
 4441 attatgagtttaatttatgaagcctttcttttccaaataaaacatttgaattcttaaaacg  
 4501 ttatcagagcaaaaatctgtagcacaagtcatactttatgatagattttatgcttctgtg  
 4561 cttggtaaccagaatctgtggaatcttcattgggtggtttggttagagcaatctgctatta  
 4621 attgaaattctaattattgttttatcagatttagagtatggctggcaactccttgataga  
 4681 tttcgatccatgatgattgtagatttgaaccggactgcacggatacgaattgtaaa  
 4741 agcattcagggaaagctgctctgaagtggtcataaagaccaaaatcccgatcgtaaacaaa  
 4801 gcaggtaatctatttctgtttattcaatcacgattttttaaaccggttcttcccacata  
 1 M F L K I S K A F E L  
 4861 gtgcgttcattaattttagCACAAAGAAATGTTTCCTGAAGATATCCAAGGCTTTTGAGTTG  
 12 L S D A A A R A A Y V L A A R T A H T I  
 4921 TTATCGGATGCAGCGGCTCGAGCTGCTTATGTAAGTGGCTGCTAGAACAGCACATACCATT  
 32 Y V R R R N N E G E K R R K L R  
 4981 TATGTACGAAGACGAAATAATGAAGGCGAGAAAACGACGAAATTACgtgaggaacttgaa  
 5041 aggcgaggctaattgtgtaaacgttcaacacgagaaaagaaaaggccaaaaggagcttga  
 5101 gaaagaggtattttcaaatttgcccattcttgtaattggcttgaatttacttaatatg  
 48 L I  
 5161 gctccattttatgatattttataaaatgggtcaaagtcagttcataactcacagGTCTTA  
 50 L F E K E K F Q I Q R L R K E G S K L L  
 5221 TTTTATTTGAGAAAGAAAAGTTTCAGATTCAACGCTCTGCGGAAGGAAGGTTCCAACTGC  
 70 Q R E S E N I E Q Q I R K N A T V E E Q  
 5281 TACAACGTGAAAGTGAAAATATTGAACAACAAATTCGTAAAAATGCGACTGTGGAAGAGC  
 90 N G D K P  
 5341 AGAACGGTGATAAACgtaacttttgaaagccttcttctggttttaggttttaactcactttac  
 5401 actttatttaaggaaattgaattctccaagaaatctatttgatttccagggttattagc  
 5461 ctgttataaattaagatggaagtgtggaactggtaaatgaattatgatgaagatgattt  
 5521 aaggaaattattctctaggtgaatttttttaaattatttgcgtggaatttctaaattac  
 5581 tcaaataagaggaaggttgttttcttttccactcaggatggttacctccaatgcagtc  
 5641 agcttagtggtggtttgaccctcgaaaacggtgaaatattgttacatggttattcagtatgg  
 95 I T K A W Q I L E F D  
 5701 acacatttccgatgtaatcgtttcaagCAATAACCAAGGCATGGCAAATTTTGAATTCG  
 106 E L L D V ↑ EcoR1  
 5761 ATGAATTGTTGGATGTAgtaagatttgggtgaaaacgtttgcataattcgaaaattt  
 111 D G I E K E  
 5821 gtttggtttccaaaaaatttcatatggttgcctttatttttagGATGGGATTGAAAAAGA  
 117 T G K P D V P I A T T C L R K P S S R L  
 5881 AACGGGAAACCTGATGTTCCAATTGCTACGACATGTTTGCGAAAACCGTCTTCCAGGTT  
 137 R S S E I Q R S R P V E  
 5941 GAGAAGTTTCGAAATACAACGAAGTAGACCAGTAGgtaagattatttcttttgcgtaaat  
 6001 tttcgataaaaacactttttggtctacaaataaatttttataattgaccagaaaatgaga  
 149 R P M T S V E F A D F E ↓ EcoR1  
 6061 tcatcatgaaatactgcactgcagAACGGCCGATGACATCTGTTGAATTCGCTGATTTTG  
 161 A E V L A T M M A G G S K R K A D K G E S  
 6121 AAGCTGAAGTTTGGCGACGATGATGGCTCAAAGCGGAAAGCTGATAAAGCGGAAA

181 K F D N L \*

6181 GCAAAATTTGATAATTTGTAAAttcgaatTTTTtagctgataatTTTTTtgcTgtagcaatt  
6241 tttcaatagaatacaatggaaaaaaaaattaagactgaaaaaaaaagaaaaaaaaactag  
6301 aactgaatcattttgttgttaccagagtcgaaaaaaaaatTTTTTTTTTTTTTcagttctc  
6361 taaaaatcgcaattagtaaaactgaagtacttcagatTTTTtaaaaatttaaactctccagc  
6421 tagatTTTTTTTTtgcagatTTTTtgcacactaaactTTTggcgggtatttagacaagtggaa  
6481 ctctcactgctttgcttcattgaaatTTTgtaatgtattTTTgtaaatattTTTTTTta  
6541 tgtgattaatgTTTTcatttccatacctcgcctgcagctattcagtaacctcaatataaaaatc  
6601 tttcattcgtgttacatcaaatgcaacaagattacatcattatatgtTTaagcaaatc  
6661 ttcattgTTTTTTatagctcgtgcattcattaatgatattgattgTTTTgggaaacggggc  
6721 ctaatttggTTTTacactgaaaataatgcttggTgTgggatgatgTgTTTTcatgaaatt  
6781 cttattatTTTTTatttccatgtattagTTtaagatttcaggcagaaggattgTtctctc  
6841 tcattatatttaagtctTTTTaattttacttctgTtTgTtccaaatgTtcaaatttagctg  
6901 taacggattggatcgctTTtaataggatcctacaagaagTTtaaaaattctgaaaactgTt  
6961 cgtagTtgcactgaaatcgtacaatcaaaaatcttagacggaaatattactctaaatataac  
7021 atcgaataattgTggaataacttactgcactcactcttcagaaattattttatattggtt  
7081 tacacaactatatccaatatTTTTaatgTtaacagtagTttatttcttattcattagTcat  
7141 cagtattgaagaaatgatgatgTctcctccatcagTactacgattagataactaagTctca  
7201 taggagaatgTTTTtagacagTcatgaaaatgcatgagcagagatttaagtagcgtactt  
7261 caagTtaaaacacatacgtattttgattgTcattttaaagagcttataactacattagt  
7321 atttctgTtaaggTtagcaggttcaattcagTcaattaacggTtctattcaatatgTgca  
7381 catctcgaagatgtagtattcagctgattaacattatttcaaaaaagtaatatcattc  
7441 gTtagTcagatcaaaaatgagctgaagcaagtagtagaaaataccaattgaaatacttt  
7501 aatttatttctattccctaaacggatgatgaaatcagTttagctgaaTTgTtctattcta  
7561 gaatgaaatggaatgaaactTTataatatatgTgatccaaacagcttaattctatattagct  
7621 taatggagaatggTTTTcagTcattttaaatttctctcagTtcaatataatctgaataaaaa  
7681 actTTTTTtgcTtaagTactTTcttagaggacatctTTTTccttatagacatatacgaac  
7741 aagtagcttcttcaaatcttctTTTTtatacctctcggTTTTaaactagcatttgggaaca  
7801 ttaaaataaaaacacagTtaattttatggggcgaaacgcaatccttatgaagTtatcaaa  
7861 aacgattTTTTcctatcagaaagagcaatTTTTtggTgTgcatcacaactgagTgTcgagag  
7921 attgacaatagTatgTtatgTcgttactcagccattaattagcacaagcaaaaatccgaaat  
7981 gatcatcagTtgatataaaatctatcttaacaatttacactgggTTTTatttagaaatgat  
8041 tacttctgTaaaggTaaattggTgaataaaactcgtcaaggctTTgccagTgaaagaatgaca  
8101 atTTTTtctcagctTTctgatcagTtagctgTgttacgataggcatgagccactttatcact  
8161 aaatgatagaattatcaaattaaaaaatctttacagTgcatttctctttctctctgag  
8221 ctattccatttccagTaaagacatttataatttttacaacatttacaatttctcaaaaa  
8281 cgcgaacgacacagctcctcattccacttaatagaaaccatttatggagaaagaaactgt  
8341 aaataggaagtagaacccaatcgaatgcaatcattccgTcccgaagcaattgTcattctc  
8401 tcaagctattatcatttgtataccacagcaaaaaatgtagaacggaaatcgcatagTTTT  
8461 aaaacatgctTTTTtaatcgatTTTTctaaataactgaatgatttaaaaaagtgtaatat  
8521 cttcttgaaggatttatctgatcttTgaacattctcacatttccaataaaggaaagcta  
8581 aaaagtaattctctacagTatgacttctcgtataatccattatgTgTacttttaccagTt  
8641 actatgTactgTattcgtTgaagTtaaactatTTaaagTcataatattgTtacaacaata  
8701 atgaaatacaaatgcaaaaatatttctTTTTattTTggggTgacacaaacaactTgcacgat  
8761 atttcatattcaaatTgctacgTaatTTaaattactTTTTatcttctctctctagTgaat  
8821 aagataaaggaggatcgcagTatgTaaatgcaacgTtaaggattaaTTcaaattaaa  
8881 ttactcttcaattcgttataatataacagaactTtggTtattgacacatatTgcacggT  
8941 attcaagTgaattaaaaataacaaggTtaactgTactgagagaagTtaatcaaacaaaaaa  
9001 taaattcaactggaagTtcatctctgaatttcatTTctTTTTctTTTTaaagcgagcaact  
9061 ttctTTTTtgtTgcagaataaaaacttcccaaagcatatcgtcagTtaatacaaaactTTtac  
9121 tgatttcttaataatgagaaatcgttTaaagTcgtatattTgataattgatattataaggc  
9181 tctctctacatagaaaacgatataggaaagaatccatggTggagagcagTaaagagcgga  
9241 ttcgtataagaacatctgttatcaggaagcatcgaagagagagcagTggactgggtTgt  
9301 cttgatgatactgTgtatcactcgtatgcgatttatctccatatcaagTtccaaatcaaaa  
9361 tatatatgTgatggaccctcgtTaatggaaggaaattctgTtaaaacttaggaacatgg  
9421 aaaaccccaaattaacatacatcaggacgatgccccccacataactTgtcattccaggag  
9481 attgTtcaataacgTcgtTaaatgggtcagTctTTgaggcattTTTTccacacatcttctg  
9541 gctagagattgggcaatatcctTgacttcaacagTaccggTggatgTggTggaattcgt  
9601 ctgaaaaataaatccgTgaggTtaaaagaaaactTgcaatgcgatgatattatacaaatTg  
9661 atgacattcaaatTTTTccaataatctttagTgTgaggTcgattTgaaatcatagataggt  
9721 cacatgatctTgggaatgatggaatgaatgaatagattTaaagTgaaTTTgctgacaaa

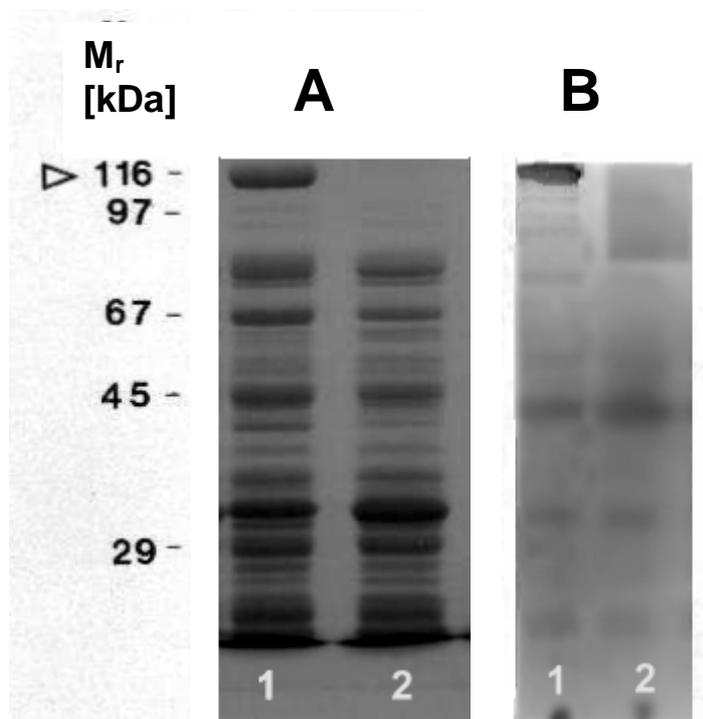
```
9781 aattatagagccagaagaaatcgacttaccagctttcacagttgagtaatttggtgatat
9841 acatatgcacattacaaatatgttaaactcactgaaatttaaattccaatataatttaacc
9901 aaaaatthttcaagtagaaactcgctgtattatcggtagtgaagtaataagcttcctgattt
9961 ggataattgttttctttcaagaagtgaataacgtctgcatatgatgttgctcgtgcgataa
10021 ttaaattcaactgtatagcatgcaacgatgcgtgctgtatgatgcaaacagcgccgtgcc
10081 cagttattcttgcactcttctttactgcag
```

**Abb. 5B: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des Gens gBp1**

Die flankierenden *EcoR*I-Restriktionsschnittstellen des partiellen cDNA-Klons (Bp1) sind hervorgehoben. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist schwarz hinterlegt (AS 103 bis 154).

#### 4.7 Expression des $\beta$ -Galaktosidase-Bp1-Fusionsproteins

Der rekombinante Klon Bp1 wurde im *E. coli*-Stamm Y1089 exprimiert. Die Bakterienlysate wurden in einer SDS-PAGE mit einem 10%igen Trenngel analysiert. IPTG-induzierte und nicht-induzierte Bakterienlysate wurden zum direkten Vergleich nebeneinander aufgetragen (vgl. Abb. 6A). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein-Banden konnten über die Reaktion der Fusionsproteine mit einem monoklonalen Antikörper aus der Maus gegen  $\beta$ -Galaktosidase identifiziert werden (vgl. Abb. 6B). Das Fusionsprotein konnte in größeren Mengen exprimiert werden.



**Abb. 6 A/B: Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteins Bp1**

**A:** Westernblot nach SDS-PAGE der rekombinanten und nicht-rekombinanten Y1089-Bakterienlysate; 10%iges Coomassie-Blue gefärbtes Polyacrylamidgel.

- (1) Y1089/Bp1-Bakterienlysate induziert
- (2) Y1089/Bp1-Bakterienlysate nicht-induziert

**B:** Immunoblot nach SDS-PAGE der rekombinanten und nicht-rekombinanten Y1089-Bakterienlysate;

Reaktion der Bakterienlysate mit einem monoklonalen Antikörper gegen  $\beta$ -Galaktosidase aus der Maus (1:500).

- (1) Y1089/Bp1-Bakterienlysate induziert
- (2) Y1089/Bp1-Bakterienlysate nicht-induziert

#### 4.8 Herstellung eines Antiserums gegen das rekombinante Protein

Ein Y1089/Bp1-Bakterienlysat wurde in einer SDS-PAGE mit 10%igem Trenngel präparativ aufgetrennt. Nach der Färbung (Coomassie-Brillant-Blue) wurde die Bp1-Fusionsprotein-Bande ausgeschnitten und zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Das aus dem Kaninchen gewonnene polyklonale Serum wurde als Anti-Bp1 bezeichnet.

#### 4.9 Reaktionen des Antiserums gegen das rekombinante Protein im Immunoblot

In Immunoblots (vgl. Abb. 7A/B) reagierte das Antiserum gegen das  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein (Anti-Bp1) mit Antigenen in Extrakten aus *B. pahangi*-Mikrofilarien von 35-39 (Doppelbande), 51, 56 und 59 kDa, mit Antigenen in Extrakten aus *B. malayi*-Mikrofilarien von 66-68 kDa (Doppelbande) und 70 kDa sowie aus *L. sigmodontis*-Mikrofilarien von 68 kDa (vgl. Tab. 2).

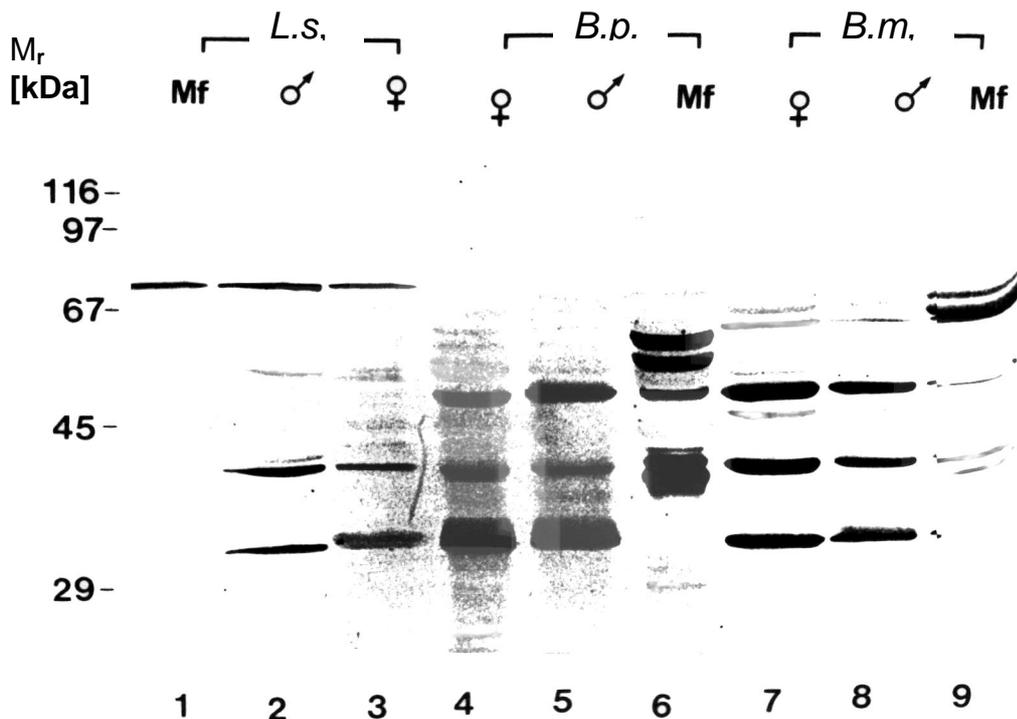
**Tab. 2:** Molekulargewichte der Filarien-Antigene, die im Immunoblot von Anti-Bp1 erkannt wurden

Extrahierte Stadien		Molekulargewichte [kDa]				
<i>B. pahangi</i>	♂	<b>30</b>	<b>39</b>	<b>51</b>		
	♀	<b>30</b>	<b>39</b>	<b>51</b>		
	Mf		<b>35-39<sup>1</sup></b>	<b>51</b>	<b>56</b>	<b>59</b>
<i>B. malayi</i>	♂	<b>30</b>	<b>39</b>	<b>51</b>		
	♀	<b>30</b>	<b>39</b>	<b>51</b>		
	Mf				<b>66-68<sup>1</sup></b>	<b>70</b>
	Mf-Scheide		41		<b>58</b>	
	L3	<b>30</b>			78-81 <sup>1</sup>	94-99 <sup>1</sup>
<i>L. sigmodontis</i>	♂	<b>30</b>	<b>39</b>		<b>68</b>	
	♀	<b>30</b>	<b>39</b>		<b>68</b>	
	Mf				<b>68</b>	

<sup>1</sup> Doppelbanden

In Antigenpräparationen von adulten *B. malayi* und *B. pahangi* reagierte das Serum mit Antigenen von 30, 39 und 51 kDa. Bei adulten *L. sigmodontis* waren Banden bei 30, 39 und 68 kDa sichtbar.

A

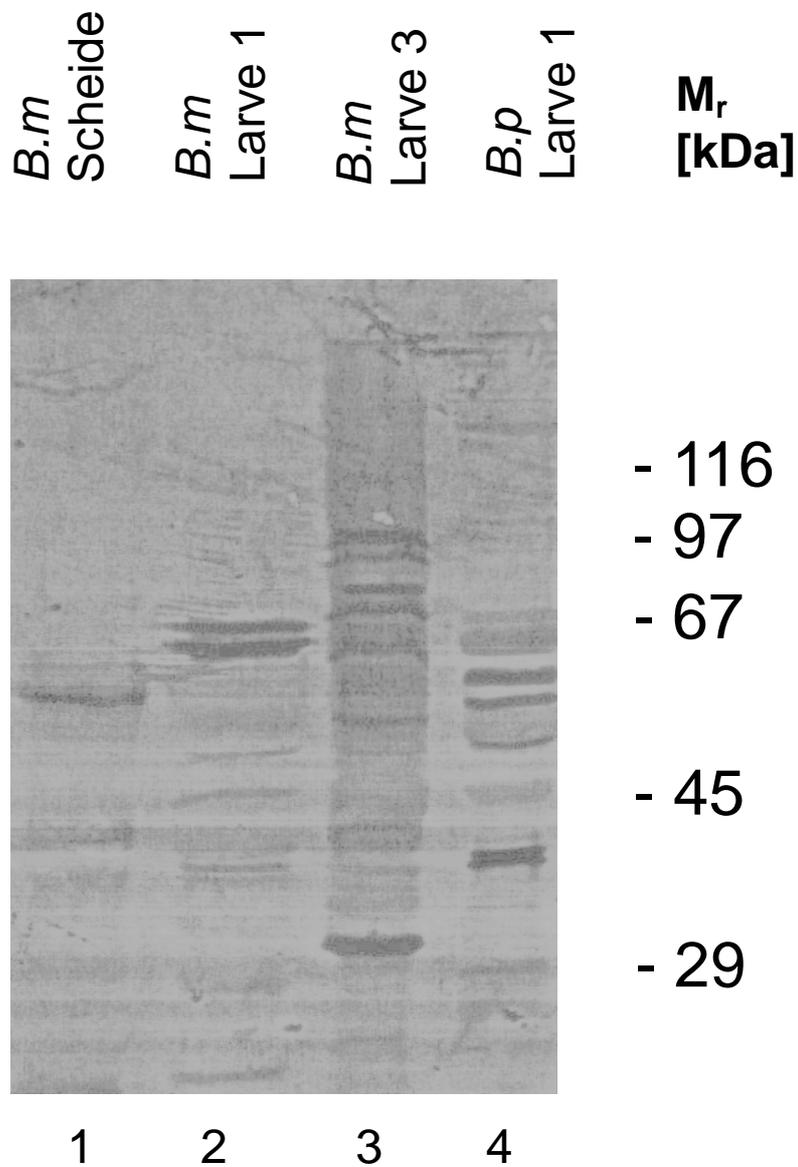


**Abb. 7A/B: Immunoblots mit Anti-Bp1 nach SDS-PAGE verschiedener Filarienantigene**

Reaktion mit Anti-Bp1 (1:200). Nachweis gebundener Antikörper mittels Peroxidasegekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG-Konjugat.

**A: Immunoblot mit Antigenpräparationen verschiedener Filarienspezies und -stadien**

(1) Extrakt aus *L. sigmodontis*-Mikrofilarien, (2) Extrakt aus *L. sigmodontis*-Männchen, (3) Extrakt aus *L. sigmodontis*-Weibchen, (4) Extrakt aus *B. pahangi*-Weibchen, (5) Extrakt aus *B. pahangi*-Männchen, (6) Extrakt aus *B. pahangi*-Mikrofilarien, (7) Extrakt aus *B. malayi*-Weibchen, (8) Extrakt aus *B. malayi*-Männchen, (9) Extrakt aus *B. pahangi*-Mikrofilarien

**B****B: Immunoblot mit Antigenpräparationen von *Brugia*-Larven und Mikrofilarien-scheiden**

(1) Material aus aufgereinigten *B. malayi*-Scheiden, (2) Extrakt aus *B. malayi*- Mikrofilarien, (3) Extrakt aus *B. malayi*-L3, (4) Extrakt aus *B. pahangi*- Mikrofilarien

Bei Antigenpräparationen aus *B. malayi*-L3 wurde eine Bande von 30 kDa beobachtet, zusätzlich fanden sich noch schwächere Banden von 78, 81, 94 und 99 kDa (vgl. Abb. 7B).

Aus Materialgründen konnte für den Immunoblot nur Scheidenmaterial von *B. malayi* verwendet werden, das aufgrund der engen Verwandtschaft zu *B. pahangi* herangezogen wurde. Das Antiserum Anti-Bp1 reagierte mit einem Antigen der Scheide von 58 kDa. Eine schwächere Bande war bei 41 kDa zu erkennen (vgl. Abb. 7B).

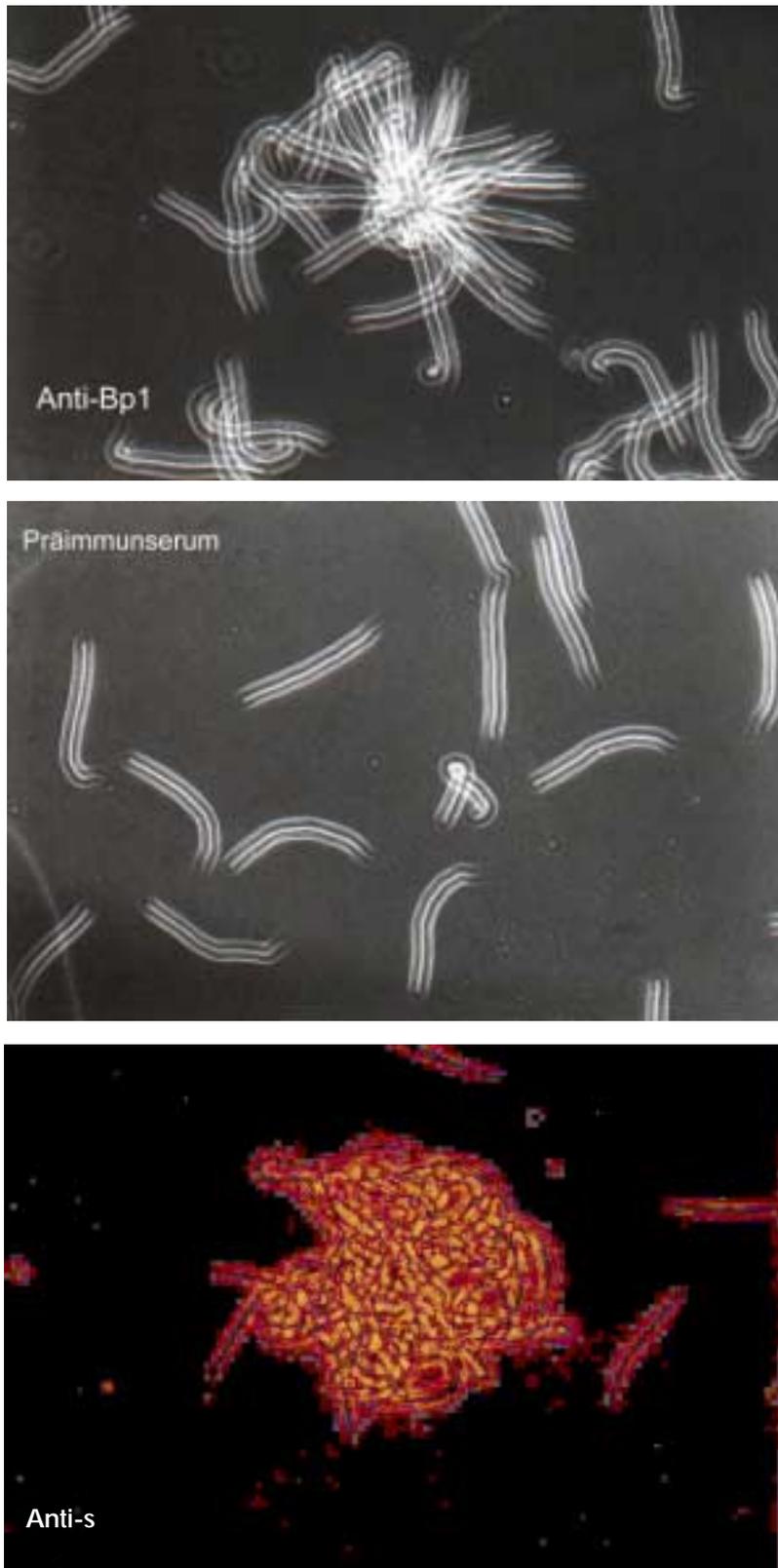
#### 4.10 Mikrofilarien-Agglutinationsassay

Das Antiserum gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1) war in der Lage, Mikrofilarien von *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* zu agglutinieren. Die Mikrofilarien agglutinierten sternförmig (vgl. Abb. 8). Während die Mikrofilarien in Gegenwart von Anti-s „haufenähnlich“ agglutinierten (vgl. Abb. 8; im IIFT zeigt sich eine homogene Fluoreszenz über die gesamte Scheide), zeigte sich beim Einsatz des Serums Anti-p ein eher als netzartig zu bezeichnendes Bild (im IIFT ist eine fleckige Fluoreszenz über die gesamte Scheide zu erkennen).

Bei *B. pahangi*- und *L. sigmodontis*-Mikrofilarien wurde bei der Agglutination eine Effizienz von maximal 30% erreicht. Zum Vergleich wurden Anti-s und Anti-p (Positivkontrollen, Effizienz zwischen 60 und 100%) sowie Prä-Bp1 als Negativkontrolle eingesetzt (vgl. Abb. 9A/B).

#### 4.11 Antikörpervermittelte Zytoadhärenz an Mikrofilarien

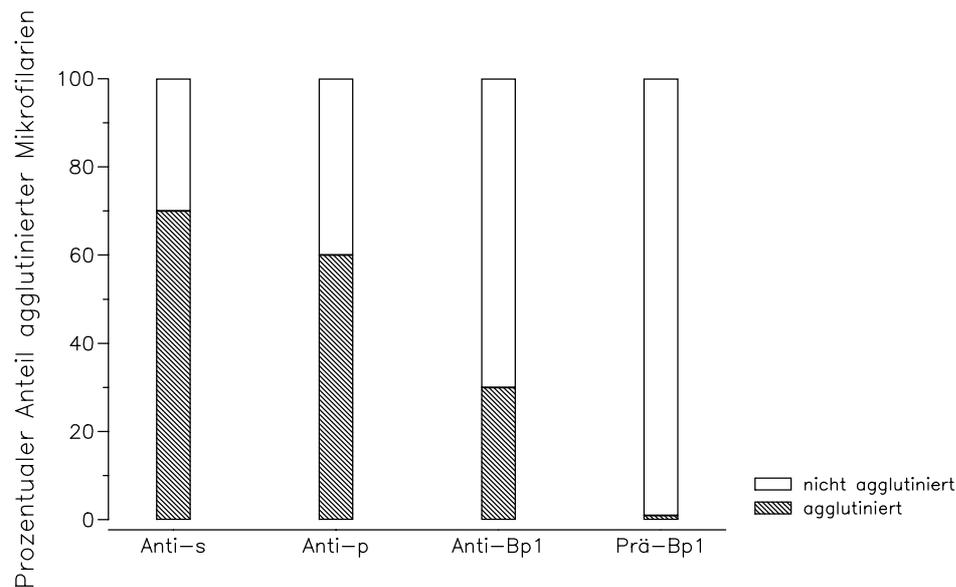
Die Fähigkeit an Mikrofilarien die Adhärenz von Milzzellen aus Kaninchen zu induzieren, wurde für Anti-Bp1, Anti-s, Anti-p sowie für das Anti-Bp1 zugehörige Prä-Bp1 und das Serum des Milzzellspenders (P-Serum) untersucht. Verwendet wurden Mikrofilarien von *L. sigmodontis* und *B. pahangi*. Abb. 10 zeigt typische Beispiele für *B. pahangi* bei Verwendung des Anti-Bp1-Serums, des zugehörigen Präimmuserums (Prä-Bp1) sowie des Anti-s-Serums. Wie aus Abb. 11A ersichtlich, existieren im Durchschnitt der Werte Unterschiede zwischen den Antiseren und den beiden normalen Seren, doch waren sie gering. Deutliche Unterschiede ergaben sich dagegen bei *L. sigmodontis*-Mikrofilarien, bei denen die Normalseren nur in einem sehr niedrigen Prozentsatz der Larven zur Zellanlagerung führten, während Antiseren massive Zellanlagerungen bewirkten. Dies galt insbesondere für die „homologen“ Antiseren gegen *L. sigmodontis*-Scheiden, bei denen praktisch alle Mikrofilarien betroffen waren. Im Falle des Anti-Bp1 wurden zwar nur ca. 55% der Larven erfasst, doch war der Unterschied zu Prä-Bp1 eindeutig.



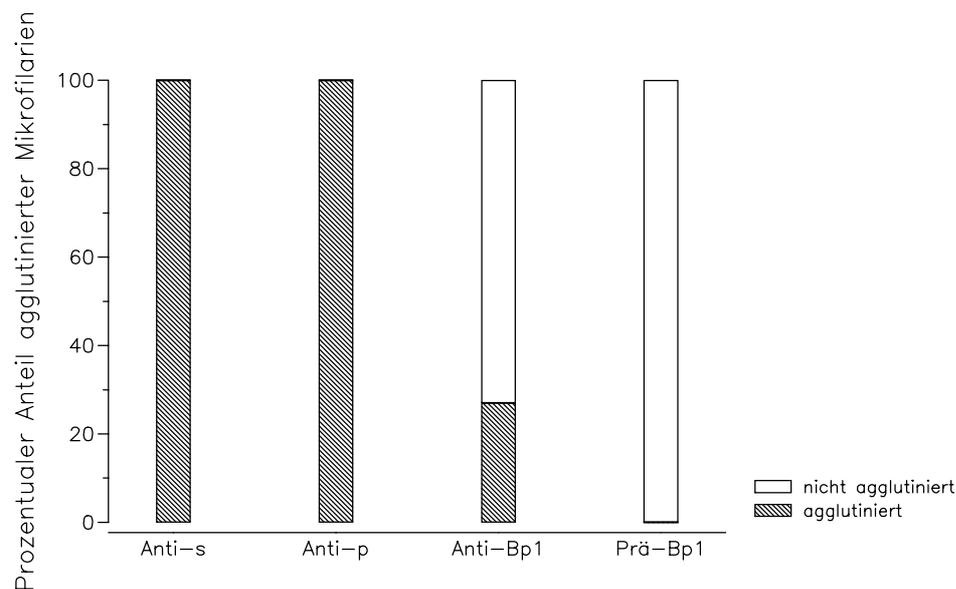
**Abb. 8: Agglutination von *B. pahangi*-Mikrofilarien**

Lebende Mikrofilarien wurden in Antiserum gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1; oben), im zugehörigen Präimmunserum (Prä-Bp1; Mitte) und in einem Antiserum gegen den SDS/2ME-löslichen Anteil von *L. sigmodontis*-Scheiden (Anti-s; unten) inkubiert und das Agglutinationsverhalten verglichen. Die Antiseren wurden unverdünnt eingesetzt. (Phasenkontrast x290)

### A) *B. pahangi*

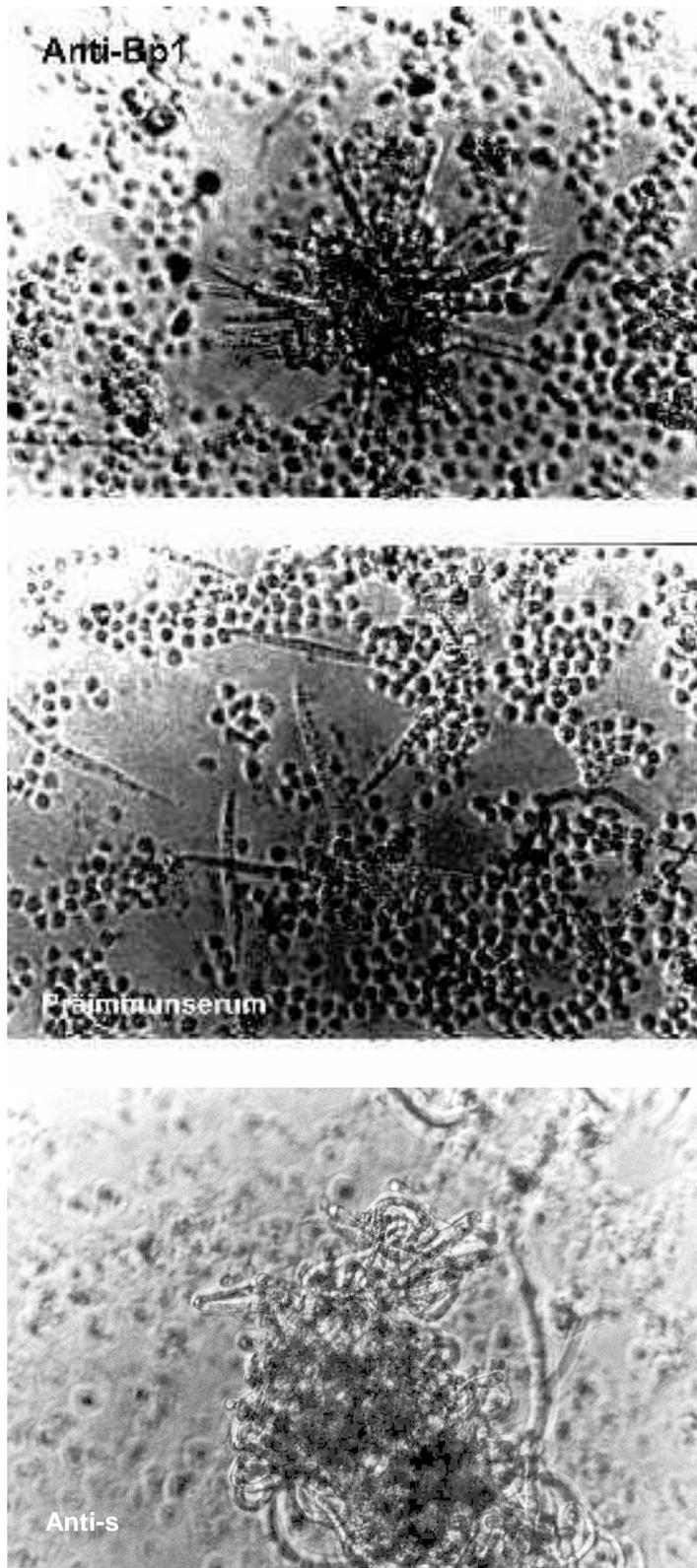


### B) *L. sigmodontis*



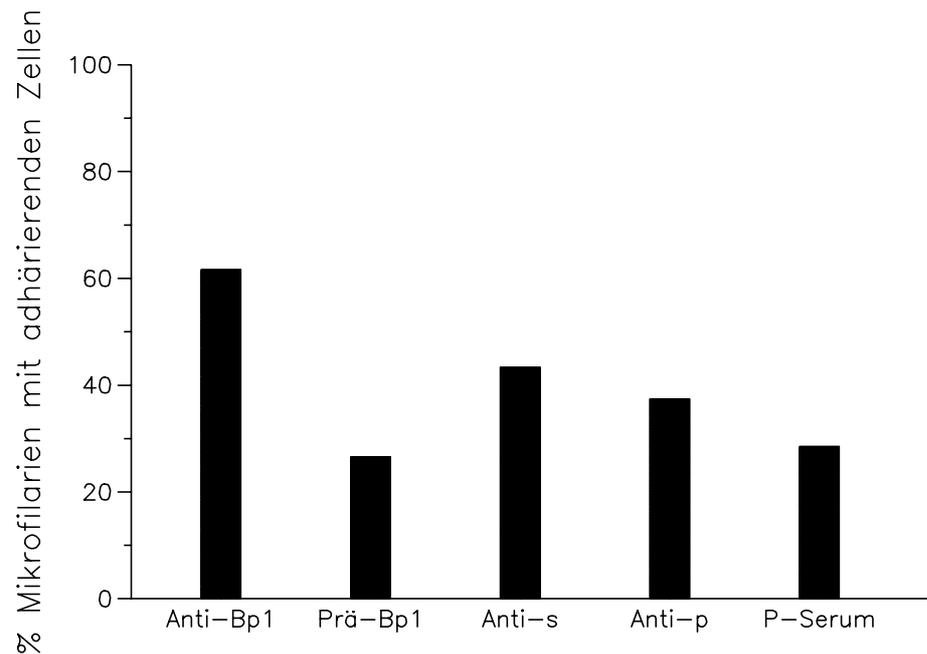
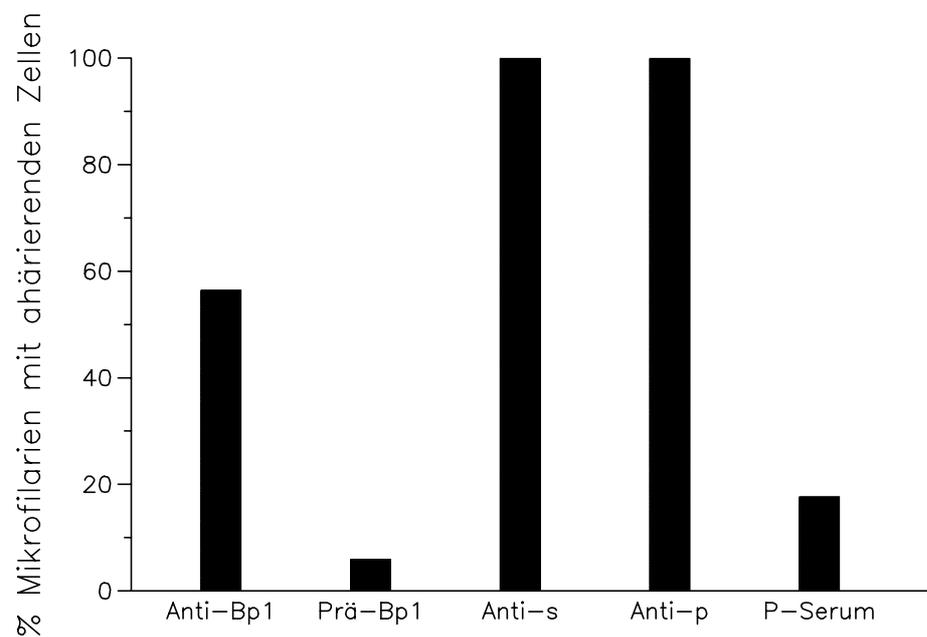
**Abb. 9: Vergleich der Agglutinationsrate der Mikrofilarien von *B. pahangi* (A) und *L. sigmodontis* (B) nach Inkubation in verschiedenen Antiseren**

Lebende Mikrofilarien wurden in Antiserum gegen Bp1 (Anti-Bp1), im zugehörigen Prä-immunserum (Prä-Bp1) sowie in einem Antiserum gegen den SDS/2ME-löslichen (Anti-s) und SDS/2ME-unlöslichen Anteil (Anti-p) von *L. sigmodontis*-Scheiden inkubiert und das Agglutinationsverhalten verglichen. Der prozentuale Anteil der agglutinierten Mikrofilarien in Relation zu dem nicht agglutinierten Anteil wurde berechnet und grafisch wiedergegeben.



**Abb. 10: Antikörpervermittelte Anlagerung von Kaninchenmilzzellen an Mikrofilarien von *B. pahangi***

Mikrofilarien wurden im Antiserum gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1), im zugehörigen Präimmunserum (Prä-Bp1) sowie im Antiserum gegen den SDS/2ME-löslichen Anteil von *L. sigmodontis*-Scheiden (Anti-s) inkubiert. Die Anlagerung der Milzzellen an die Mikrofilarien wurde beobachtet und verglichen.

A) *B. pahangi*B) *L. sigmodontis*

**Abb. 11: Antikörpervermittelte Anlagerung von Milzzellen aus Kaninchen an Mikrofilarien von *B. pahangi* (A) und *L. sigmodontis* (B)**

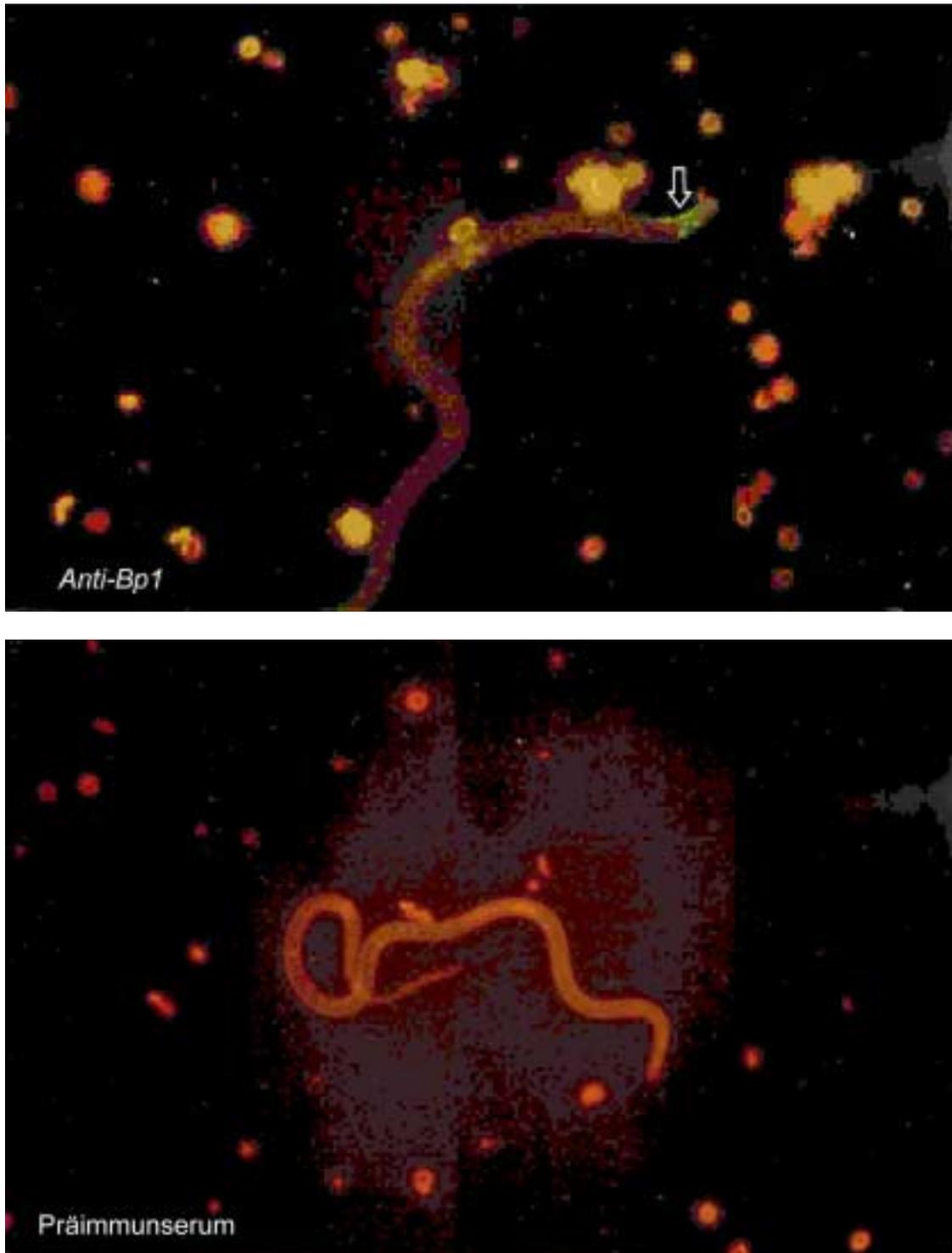
Mikrofilarien wurden im Antiserum gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1), im zugehörigen Präimmunsrum (Prä-Bp1), in Antiseren gegen den SDS/2ME-löslichen (Anti-s) und -unlöslichen Anteil (Anti-p) von *L. sigmodontis*-Scheiden sowie dem Serum des Milzzellspenders (P-Serum) inkubiert. Der prozentuale Anteil der sich an die Mikrofilarien anlagernden (adhärierenden) Zellen wurde ermittelt und grafisch dargestellt.

#### 4.12 Antigennachweis auf Mikrofilarienscheiden im IIFT

Der Indirekte Immunfluoreszenztest wurde an lebenden *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* sowie Embryonalstadien mit den Seren Anti-Bp1 sowie Anti-s, Anti-p (Positivkontrollseren) und Prä-Bp1 (Negativkontrollserum) durchgeführt. Es wurden lebende Larven eingesetzt, um fixierungsbedingte Veränderungen auszuschließen. Die Mikrofilarienscheiden aller 3 Arten reagierten mit den Antiseren Anti-Bp1, Anti-s und Anti-p. Das Normalserum Prä-Bp1 erkannte in keinem Fall die Scheidenoberfläche. Die Antiseren führten zu unterschiedlichen Reaktionsbildern. Anti-s führte zu einer intensiv leuchtenden homogenen Oberflächenfluoreszenz bei *L. sigmodontis* und einer als diffus über die Oberfläche verbreiteten Fluoreszenz bei den *Brugia*-Arten. Anti-p erkannte die Scheidenoberfläche ungleichmäßig, was in einer eher fleckigen Fluoreszenz bei *L. sigmodontis* und den beiden *Brugia*-Spezies resultierte. Anti-Bp1 reagierte mit einer eng umschriebenen Region im proximalen Abschnitt der Mikrofilarienscheide der *Brugia*-Arten (vgl. Abb. 12). Bei *L. sigmodontis*-Mikrofilarien ließ sich keine Lokalisation zuordnen, es fand sich eine unregelmäßige, fleckige Verteilung der Fluoreszenz über die gesamte Scheidenoberfläche. Auf der Eihüllenoberfläche von Embryonalstadien reagierte nur Anti-s, das an die Eihülle aller untersuchten Arten band. Anti-Bp1 erkannte derartige Antigene in keinem Fall (vgl. Abb. 13). Eine Behandlung der Mikrofilarien der untersuchten Filarienspezies mit Chymotrypsin bewirkte eine verstärkte Bindung des Antiserums Bp1 an die Scheidenoberfläche. Der Effekt war bereits nach 5 minütigem Verdau erkennbar und steigerte sich mit verlängerter Behandlung (vgl. Abb. 14). Insbesondere war mit zunehmender Dauer der Behandlung eine intensiver werdende homogene Fluoreszenz über die gesamte Oberfläche der *Brugia*-Mikrofilarien zu beobachten. Bei *L. sigmodontis*-Mikrofilarien blieb das unregelmäßig fleckige Erscheinungsbild bestehen, bei längerem Verdau wurde dies noch intensiviert.

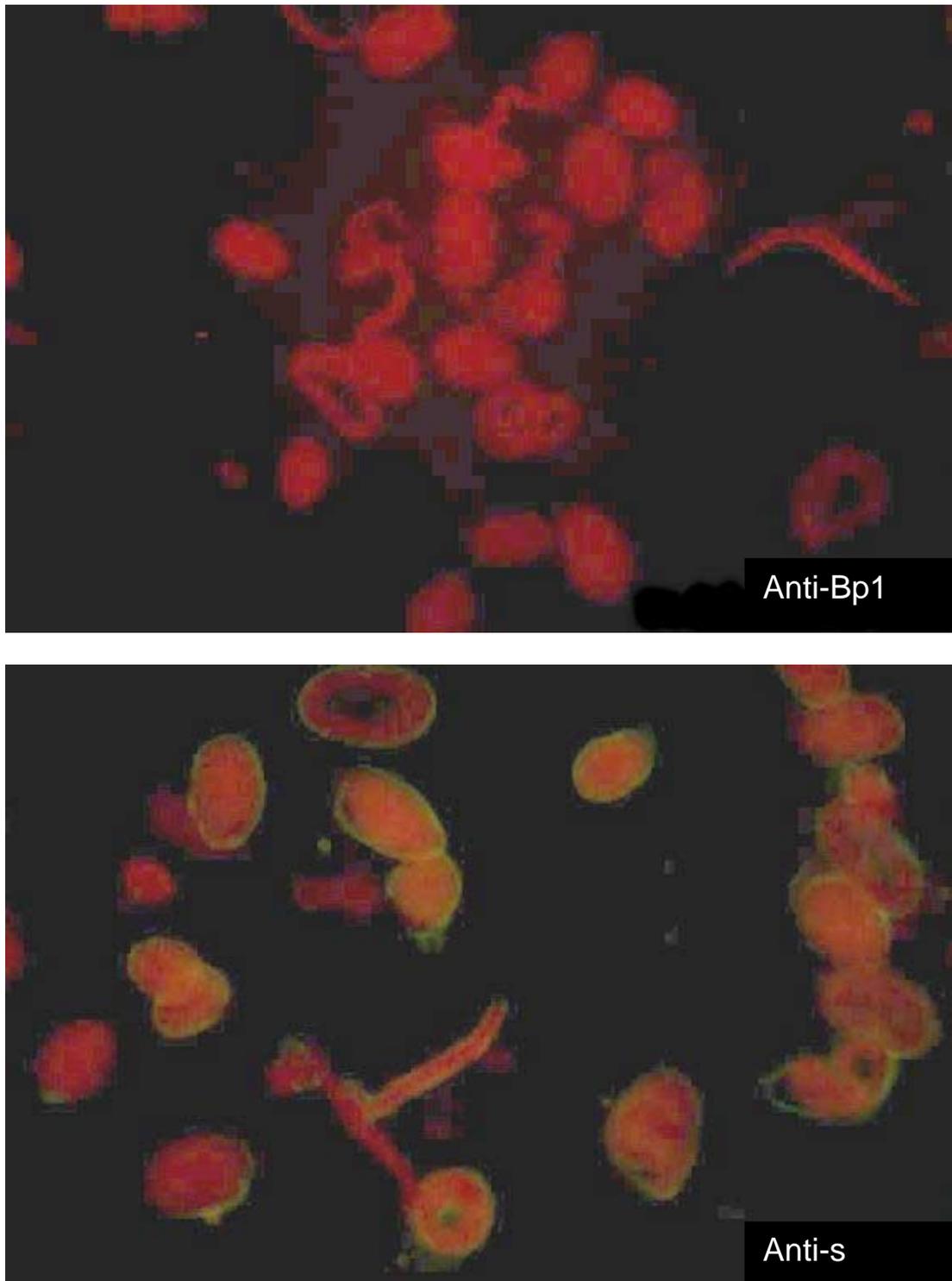
#### 4.13 Reaktionen gegen das rekombinante Protein im PAP-Test

Immunhistologische Untersuchungen an Schnitten adulter weiblicher *L. sigmodontis* zeigten eine Bindung von (Anti-Bp1) in epithelialen und subepithelialen Zellen des distalen Uterus (vgl. Abb. 15), woraus geschlossen werden kann, dass die Expression des Proteins hier stattfindet. Das vergleichsweise eingesetzte Anti-s erkannte Zellen des Uterusepithels. Für das zu Anti-Bp1 gehörige Präimmunserum (Prä-Bp1) ließ sich keine Bindung an Parasitengewebe aufzeigen.



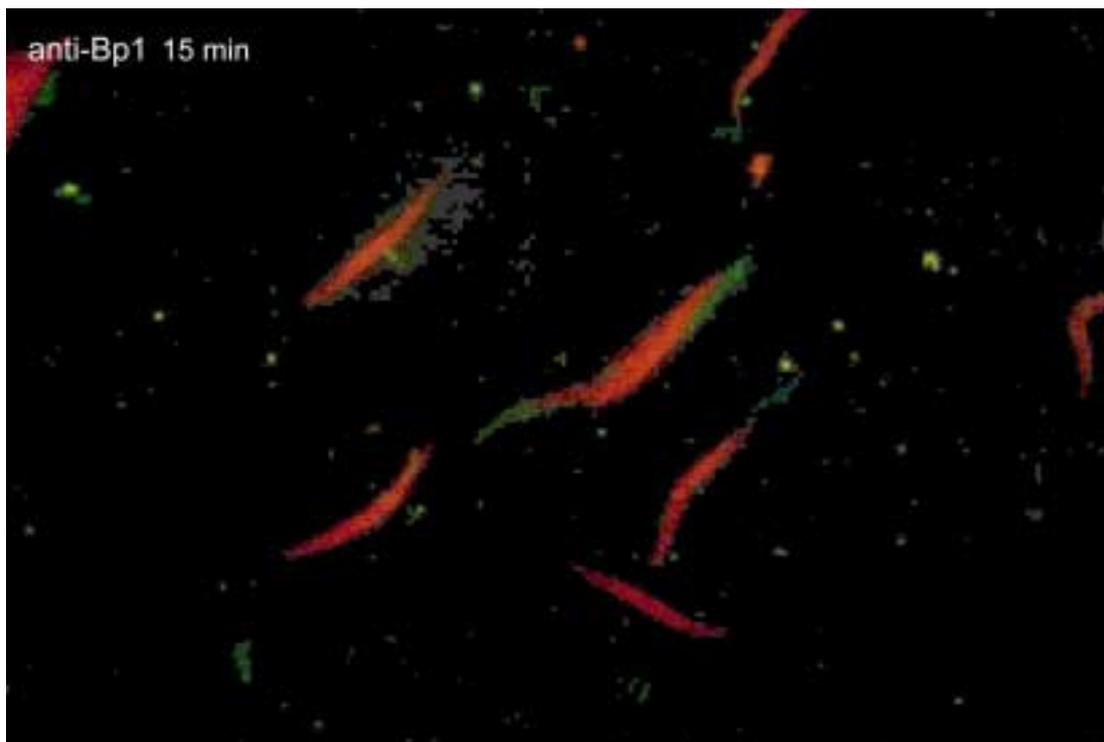
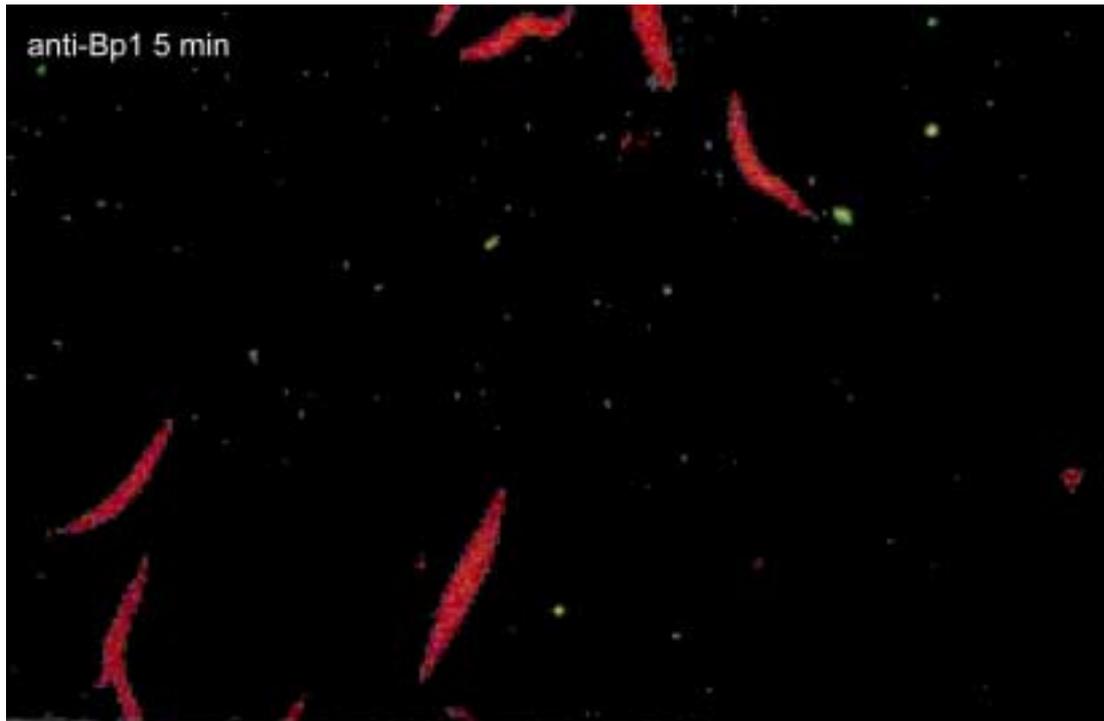
**Abb. 12: Antigennachweis auf Mikrofilarienscheiden von *B. pahangi***

Reaktion von lebenden *B. pahangi*-Mikrofilarien mit dem Antiserum gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1; oben) und dem dazugehörigen Präimmunserum (Prä-Bp1; unten). (IIFT; x 900 bzw. x 740)



**Abb. 13: Antigennachweis auf der Scheide von *B. pahangi*-Embryonalstadien**

Reaktion von intrauterinen Stadien von *B. pahangi* mit dem Antiserum gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1; oben) und dem Antiserum gegen den 2ME/SDS-löslichen Anteil aus *L. sigmodontis*-Mikrofilarienscheiden (Anti-s; unten). (IIFT; x 740 bzw. x 900)



**Abb. 14: Antigennachweis auf der Scheide von *B. pahangi*-Mikrofilaren nach Verdau mit Chymotrypsin**

Reaktion des Antiserums gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1) mit der Scheide von *B. pahangi*-Mikrofilarien nach deren Hydrolyse mit Chymotrypsin A. Reaktionsbilder nach 5 minütiger (oben) und 15 minütiger (unten) Hydrolyse. (IIFT; x 480)



**Abb. 15: Immunhistologische Untersuchungen adulter *L. sigmodontis*-Weibchen**

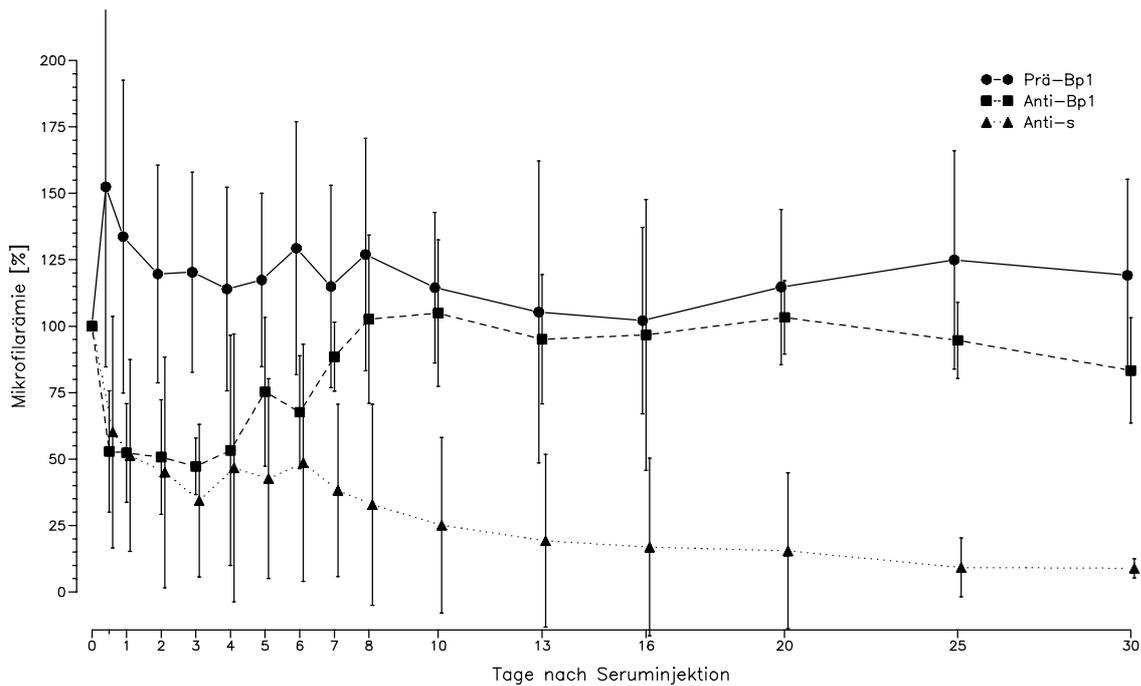
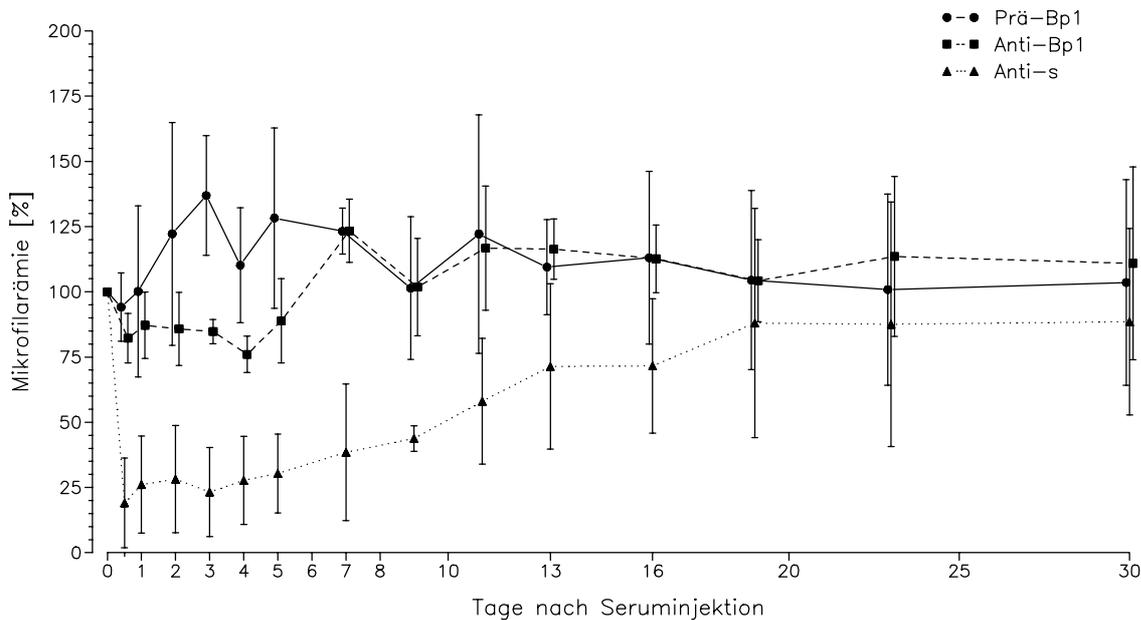
Bindung von Antikörpern (Pfeile) gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1, oben), dem zugehörigen Präimmunserum (Prä-Bp1, Mitte) sowie gegen den 2ME/SDS-löslichen Anteil aus *L. sigmodontis*-Mikrofilarienscheiden (Anti-s; unten) an innere Strukturen von weiblichen *L. sigmodontis*. PAP-Test (oben, x 320; Mitte und unten, x360) (ut) Uterus



#### 4.14 Einfluss der Antiseren gegen das rekombinante Bp1 und gegen den SDS/2ME-löslichen Anteil der Mikrofilarienscheide (Anti-s) auf die Mikrofilariämie *in vivo* und intrauterine Stadien

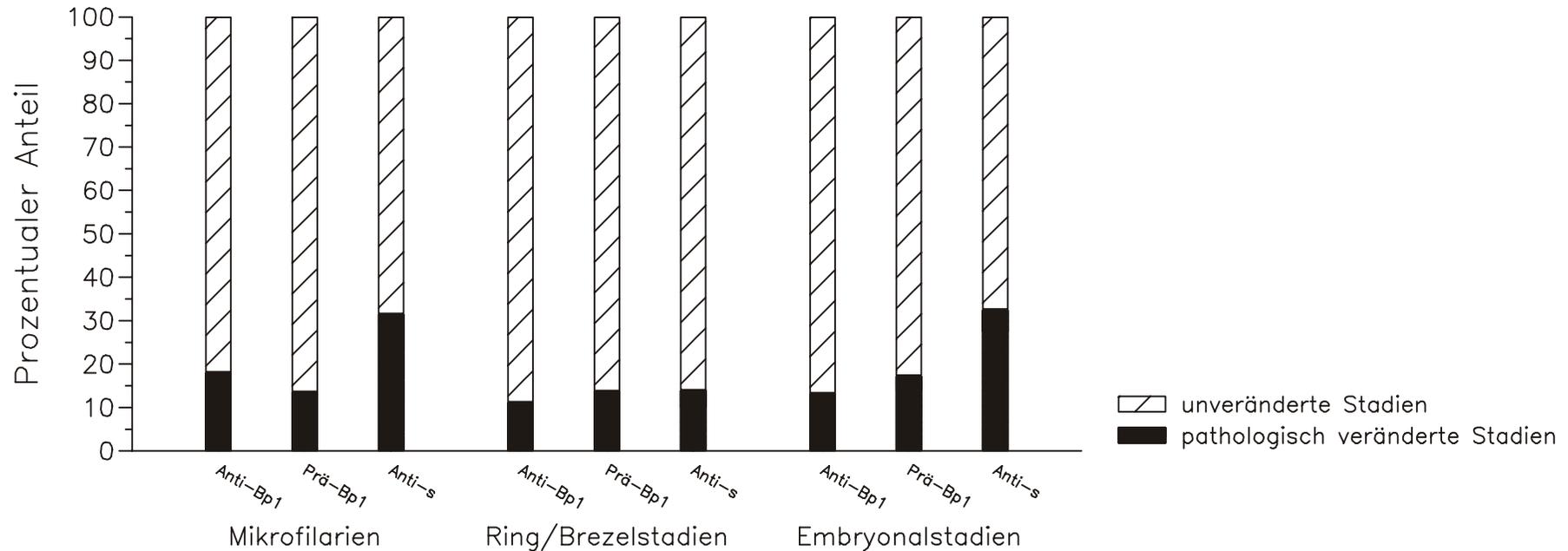
Die einmalige intravenöse Applikation von Anti-Bp1 bewirkte in *B. pahangi*-infizierten *M. coucha* einen raschen signifikanten ( $p < 0.01$ ) Abfall der Parasitämie um ca. 50% (Abb. 16A). Nach etwa 7 Tagen kam es zu einem Wiederanstieg auf Kontrollwerte. Auch in *L. sigmodontis*-infizierten Tieren zeigte sich ein vorübergehender, allerdings nicht signifikanter Abfall der Mikrofilariämie. Anti-s wirkte in *B. pahangi*-infizierten Tieren anfangs ähnlich wie Anti-Bp1, doch blieben die Mikrofilariämiewerte über den gesamten Untersuchungszeitraum von 30 Tagen signifikant um mehr als 70% gegenüber dem Ausgangswert reduziert. Bei *L. sigmodontis*-infizierten *M. coucha* (vgl. Abb. 16B) hatte dieses Serum innerhalb eines halben Tages einen hochsignifikanten ( $p < 0,01$ ) reduzierenden Effekt auf die Mikrofilarienzahlen im peripheren Blut. Im Gegensatz zu *B. pahangi*-infizierten Tieren ergab sich jedoch nach dem 5. Tag ein kontinuierlicher Anstieg der Parasitämie über den nach ca. 3 Wochen wieder Kontrollwerte erreicht wurden. Über die Injektion des Präimmunserums (Prä-Bp1) ließ sich die Mikrofilariämie in keinem Fall beeinflussen.

Das im Anschluss an den Versuch erstellte Embryogramm (Anteil pathologisch veränderter intrauteriner Embryonalstadien) der isolierten Filarien aus den *B. pahangi*-infizierten *M. coucha* ergab keine Unterschiede zwischen den *Mastomys* denen Antiserum injiziert wurde und den Kontrolltieren denen Präimmunserum injiziert wurde (vgl. Abb. 17).

A) *B. pahangi*B) *L. sigmodontis*

**Abb. 16: Parasitämieverlauf bei *B. pahangi*- (A) und *L. sigmodontis*-infizierten (B) *M. coucha* nach einmaliger intravenöser Seruminjektion**

Es wurden jeweils 0,5 ml des Normalserums (Prä-Bp1) sowie der Antiseren gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1) und den SDS/2ME-löslichen Teil von *L. sigmodontis*-Scheiden (Anti-s) eingesetzt. Die Mikrofilariämie wird jeweils als prozentualer Anteil bezogen auf die Werte am Tag 0 (=100%) dargestellt.



**Abb. 17: Verteilung unveränderter und pathologisch veränderter intrauteriner Stadien von *B. pahangi* 30 Tage nach Seruminjektion in *M. coucha***

Es wurden jeweils 0,5 ml des Normalserums (Prä-Bp1) sowie der Antiseren gegen das rekombinante Protein Bp1 (Anti-Bp1) und den SDS/2ME-löslichen Teil von *L. sigmodontis*-Scheiden (Anti-s) eingesetzt. Für jede Gruppe wurde anschließend ein Embryogramm nach WEGERHOF et al. (1979) erstellt und der prozentuale Anteil pathologisch veränderter Stadien ermittelt.

## 5. Diskussion

Die Scheide von Mikrofilarien ist eine biochemisch komplexe Struktur (KLONISCH et al., 1991; BARDEHLE et al., 1992a) mit komplizierter Genese (SCHRAERMEYER et al., 1987b; CONRATHS et al., 1993; ZAHNER et al., 1995). Sie besteht vorwiegend aus Proteinen (KLONISCH et al., 1991; BARDEHLE et al., 1992b), von denen eine begrenzte Anzahl inzwischen auf molekularer Ebene charakterisiert und hinsichtlich ihres Syntheseorts und Lokalisation in der Scheide beschrieben wurden (vgl. Tab. 3).

Am besten sind die Verhältnisse bisher bei *L. sigmodontis* untersucht (ZAHNER et al., 1995). Bekannt sind bisher die als Scheidenproteine benannten Shp1 (BARDEHLE, 1990; SELKIRK et al., 1991), Shp1a (HINTZ et al., 1994), Shp2 (HINTZ et al., 1994), Shp3/3a (HINTZ et al., 1994; 1996, HIRZMANN 1997) und Shp4 (HINTZ et al., 1994). Ein weiteres Protein, Ls110, ist zwar offensichtlich bei der Morpho- und Biosynthese der Scheide beteiligt, findet sich jedoch nicht mehr in der reifen Scheide. DAFA'ALLA et al. (2000) diskutieren eine Chaperonfunktion.

Für Shp1 (SELKIRK et al., 1991, CHRIST et al., 1992), Shp1a (HIRZMANN, 1997), Shp2 (HIRZMANN et al., 1995), Shp3/3a (HIRZMANN, 1997) wurden homologe Polypeptide/Gene bei *B. malayi* und *B. pahangi* gefunden (vgl. Tab. 3). ZAHNER et al. (1995) folgerten daraus in Übereinstimmung mit den morphologischen (SCHRAERMEYER et al., 1987b) und biochemischen Untersuchungen (KLONISCH et al., 1991; BARDEHLE et al., 1992a), dass Genese und Struktur der Scheide gattungsübergreifend hoch konserviert sind.

Mit den vorliegenden Untersuchungen wurde ein weiteres als Shp6 einzuordnendes Polypeptid der Mikrofilarienscheide erfasst und beschrieben (vgl. Tab. 3). Anders als bei den meisten der bisher bekannten Scheidenproteine, die anhand von biochemisch erarbeiteten Aminosäure-Sequenzen über abgeleitete Oligonukleotide als cDNA isoliert worden waren (Shp1-4; CHRIST et al., 1992, HIRZMANN et al., 1995, HIRZMANN 1997), wurde der Ausgangsklon Bp1 im vorliegenden Fall über den Immunoscreen einer *B. pahangi*-Expressionsbank identifiziert. Hierfür wurde ein polyklonales Antiserum gegen den SDS/2ME-unlöslichen Anteil der Mikrofilarienscheide benutzt.

Die partielle Bp1-cDNA-Sequenz besitzt einen durchgehenden Leseraster (als Fusionsprotein mit dem Leseraster der  $\beta$ -Galaktosidase) der für ein Polypeptid von 52 Aminosäuren kodiert. Unter Verwendung des Klons als Sonde gelang die Isolierung eines genomischen Klons, der das vollständige Bp1-Gen enthält. Aus der computergestützten Vorhersage ergaben sich 5 potentielle Exons. Die isolierte partielle cDNA-Sequenz überspannt zwei Introns.

**Tab. 3: Polypeptide der Mikrofilarienscheiden**

Scheidenprotein	Vorkommen bei		Transkriptionsort	Lokalisation und Bedeutung	Untersuchungen
	<i>L.s.</i>	<i>B.m./B.p.</i>			
Shp1	x	x	Weibchen	Oocyten und intrauterine Embryonalstadien	Matrixprotein BARDEHLE, 1990 SELKIRK et al., 1991 CHRIST et al., 1992
Shp1a	x	x	Weibchen	Oocyten und intrauterine Embryonalstadien	Matrixprotein HINTZ et al., 1994 HIRZMANN, 1997
Shp2	x	x	Weibchen	intrauterine Embryonalstadien und Uterusepithel	Haupt-Matrixprotein (50% des Proteinbestandteils) HINTZ et al., 1994 HIRZMANN et al., 1995 CONRATHS et al., 1997
Shp3	x	x	Weibchen	terminales Uterusepithel	Muzin-ähnliches Oberflächenprotein (75% Modifikation u.a. DMAE) HINTZ et al., 1994 SCHARES et al., 1994 HINTZ et al., 1996 HIRZMANN, 1997
Shp3a	x	x	Weibchen	terminales Uterusepithel	Muzin-ähnliches Oberflächenprotein (75% Modifikation u.a. DMAE) HINTZ et al., 1994 SCHARES et al., 1994 HINTZ et al., 1996
Shp4	x	- <sup>2</sup>	Weibchen	anteriore Wurmsegmente mit reifen Embryonalstadien	n.b. HINTZ et al., 1994 HIRZMANN, 1997
Shp5	x <sup>1</sup>	n.b.	.	n.b.	n.b. HINTZ, 1995 HIRZMANN, 1997
Shp6	x	x <sup>3</sup>		n.b.	anteriorer Bereich auf der MF-Scheide entspricht Bp1
(Ls110)	x	n.b.	Weibchen	Embryonalzellen	auf der Eihülle- und der Scheide unreifer Mikrofilarien (Chaperonfunktion) DAFA`ALLA, 1997 DAFA`ALLA et al., 2000

n.b. nicht bekannt,  
<sup>1</sup> Hypothetisch auf der Basis einer abundanten Aminosäuresequenz in der Scheide  
<sup>2</sup> Keine mit *L.s.* Shp 4-homologen Sequenzen gefunden  
<sup>3</sup> Kreuzreagierende Antigene bekannt

Die abgeleitete cDNA aller Exons kodiert für ein Polypeptid von 185 Aminosäuren mit einer molaren Masse von 21.311 kDa.

Das Vorhandensein einer Spleiß-Akzeptor-Sequenz vor dem ersten potentiellen Exon von Shp6 ist ein Hinweis auf eine Prozessierung der mRNA durch *Trans*-Spleißen oder ein weiteres 5' gelegenes Exon. *Trans*-Spleißen wird für ~80% aller Nematodengene (NILSEN, 1989, DONELSON & ZENG, 1990) und die Mehrzahl der Scheidenproteingene (HIRZMANN, 1997) beschrieben.

Shp6 zeigt keine Homologie zu den bisher bekannten Scheidenproteinen. Die weitere computerunterstützte Homologiesuche führte zu keinen Aufschlüssen über eine eventuelle Funktion. Nur in den zu Shp6 benachbarten genomischen Sequenzen wurden ausgeprägte Homologien zu EST-Sequenzen aus *B. malayi* und *O. volvolus* sowie zu *C. elegans*-Sequenzen unbekannter Funktion und einem menschlichen Nierentumorantigen gefunden.

Das Bp1-Peptid ließ sich rekombinant in für eine Immunisierung ausreichendem Umfang herstellen. Das Antiserum aus Kaninchen erkannte eine Reihe von Polypeptiden in Extrakten aus adulten männlichen und weiblichen *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis*, Mikrofilarien von *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis*, der *B. malayi*-Mikrofilarienscheide aber auch *B. malayi*-L3.

Möglicherweise wird Shp6 gattungsübergreifend exprimiert und kommt anders als bei den bisher bekannten Scheidenproteinen (vgl. Tab. 3) auch in anderen Stadien als Mikrofilarien und adulten Weibchen zur Synthese. Soweit hier getestet, scheinen Shp6 oder immunologisch kreuzreagierende Proteine zumindest auch in Larven 3 synthetisiert zu werden. Die letztere Beobachtung entspricht einer Reihe von früheren Berichten. So fanden THOMPSON et al. (1981), dass Antikörper aus mit *B. pahangi*-Mikrofilarien immunisierten Mäusen an die Oberfläche von Larven 3 binden. MAIZELS et al. (1983) bestätigten diese Ergebnisse für alle drei bekannten *Brugia*-Arten. In Anbetracht der anschließend zu diskutierenden Untersuchungen zur passiven Immunisierung von infizierten Tieren mit Anti-Bp1 können solche Kreuzreaktionen antigene Bedeutung haben, denn Reinfektionen von Katzen mit *B. pahangi*-Larven 3 führen zu reduzierten Wurmbürden (DENHAM et al., 1992; GRENFELL et al., 1991).

Die Molekulargewichte aller vom Anti-Bp1-Serum erkannten Komponenten liegen deutlich über dem aus der cDNA errechneten (21.3 kDa) Gewicht. Ob diese Unterschiede auf posttranslationalen Modifikationen beruhen, kann hier nicht beantwortet werden. Computeranalysen ließen keine potentiellen N-Glykosilierungsstellen erkennen. Möglich ist auch, dass vom Antiserum nur mit Bp1 verwandte Proteine erkannt werden.

Die Zuordnung der hier beobachteten mit Anti-Bp1 reaktiven Antigene zu in der Literatur beschriebenen Scheidenoberflächenantigenen ist nicht eindeutig möglich. MAIZELS et al.

(1987) fanden auf *B. malayi*-Mikrofilarienscheiden über Oberflächenjodierung drei Antikörper mit Massen von 65, 70 bzw. 75 kDa, die in unterschiedlicher Weise von Seren aus Patienten mit verschiedener Symptomatik erkannt wurden und verweisen in diesem Zusammenhang auf monoklonale Antikörper, die mit *B. malayi*-Scheidenantigenen von 70-75 kDa reagieren (CANLAS et al., 1984) und in mit *B. malayi* infizierten Gerbils eine Reduktion der Mikrofilariämie bewirken. KURNIAWAN et al. (1990) konnten anhand von Westernblots zeigen, dass Seren von Personen, die in einem endemischen Gebiet für *B. malayi* mehrere Jahre amikrofilariämisch blieben, präferentiell mit einem 70-75 kDa Mikrofilarienantigen reagierten. Seren von mit *B. pahangi* infizierten Katzen, die amikrofilariämisch wurden, reagierten stark mit Antigenen von 61-81 kDa (DENHAM & FLETCHER, 1987; FLETCHER et al. 1986, 1992).

Im Gegensatz zu *W. bancrofti*-Mikrofilarien, die einfach zu identifizierendes menschliches Serumalbumin mit einer Masse von 67 kDa auf der Oberfläche aufweisen (MAIZELS et al., 1984), existieren auf der Oberfläche von *Brugia*-Mikrofilarien Moleküle von 67 kDa, die mit Maus-Antikörpern gegen aus Mücken isolierten Larven 3 reagieren und somit kein Säugetier-Albumin darstellen können (MAIZELS et al., 1983).

Unabhängig von solchen Fragen zeigten die Immunofluoreszenz-Untersuchungen, dass das/die Antigen/e auf der Scheidenoberfläche zugänglich ist/sind. Dabei ergaben sich allerdings Unterschiede für die Spezies und ein Bindungsverhalten, das sich deutlich von dem unterschied, das für Antiseren gegen *L. sigmodontis*-Scheiden beobachtet wurde. Letztere banden bei allen Spezies homogen bzw. fleckig auf der Scheidenoberfläche. Die homogene Bindung, die über das Antiserum gegen SDS/2ME-lösliche Scheidenkomponenten zustande kam, ist verständlich, da dieses Serum hohe Antikörperspiegel gegen die, die Scheidenoberfläche homogen überziehenden posttranslationalen Modifikationen der Scheidenoberflächenproteine Shp3 und Shp3a aufweist (HINTZ et al., 1996, WAGNER, 1998). Das Bindungsverhalten von Anti-p, dem die obige Spezifität fehlt, entsprach früheren Beobachtungen (SCHÜTZLE, 1994). Es ähnelte dem, das mit Anti-Bp1 auf der Scheidenoberfläche von *L. sigmodontis* erhalten wurde und lässt vermuten, dass es dort Strukturen erfasste, die von Shp3/3a nicht komplett abgedeckt werden. Die enge Begrenzung der Bindung von Anti-Bp1 auf einen engen proximalen Abschnitt der Scheide von *B. pahangi* kann derzeit nicht erklärt werden. Es existieren weder morphologische noch biochemische Besonderheiten der Scheide in diesem Bereich. Allerdings sprechen die Befunde, die nach partiellem Verdau der Scheide mit Chymotrypsin erhalten wurden, dass Bp1 auf *B. pahangi*-Scheiden durchaus von anderen Strukturen abgedeckt sein kann, denn in der Folge der enzymatischen Behandlung trat eine sich homogen über die Scheide erstreckende Fluoreszenz auf. Diese Reaktionsweise ähnelt der, die CONRATHS et al. (1997) für ein Antiserum gegen das Hauptstrukturprotein der Scheide Shp2 berichteten. Es kann ausgeschlossen werden, dass Shp2

im vorliegenden Fall eine Rolle spielt, da zwischen Bp1 und Shp2 (HIRZMANN et al., 1995) keinerlei Verwandtschaft auf Proteinebene besteht.

Für eine Lokalisation der von Anti-Bp1 erkannten Antigene sprechen indirekt auch die Ergebnisse des PAP-Tests. Die Bindung des Antiserums an Uterusepithelzellen lässt vermuten, dass von dort analog der Shp3- und Shp3a-Moleküle, eine Auflagerung auf die Scheidenoberfläche erfolgt (SCHRAERMEYER et al., 1987a; ZAHNER et al., 1995). Diese Proteine werden ausschließlich im distalen Uterusbereich transkribiert und exprimiert (für Bp1 ist der Transkriptionsort bisher nicht bekannt) und decken die Scheidenoberfläche offensichtlich weitgehend ab.

Als weiterer Beweis für die Lage an der Mikrofilarienoberfläche von Bp1 können die Ergebnisse zur Agglutination von Mikrofilarien und zur Zytoadhärenz an Mikrofilarien über Anti-Bp1 angesehen werden. Inwieweit die meist „sternförmige“ Zusammenlagerung der *B. pahangi*-Mikrofilarien über Anti-Bp1 tatsächlich damit zusammenhängt, dass nach dem Immunfluoreszenzuntersuchungen Bp1 auf den vorderen (proximalen) Teil der Scheide begrenzt ist, sollte vorerst offen bleiben. Die Anlagerung von Milzzellen an Mikrofilarien über Anti-Bp1 entspricht dem Vorgang einer „ADCC“ (antibody dependent cellular cytotoxicity)-Reaktion, die *in vivo* als wesentlicher Mechanismus der Mikrofilarienelimination anzusehen ist. So beobachteten u.a. TANNER & WEISS (1978), WEISS & TANNER (1979), HAQUE et al. (1980, 1981), JOHNSON et al. (1991), PINDER et al. (1992); TITANJI et al. (1992), OWHASHI et al. (1993) Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität. Eine IgE-abhängige Zelladhäsion und Zytotoxizität wurde von MEHTA et al. (1980, 1981a/b, 1982) beschrieben und von HAQUE et al. (1980, 1981) bestätigt. Als Effektorzellen dienen Makrophagen (HAQUE et al., 1980, 1981) sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten (GREENE et al., 1981; HAQUE et al., 1981; CHANDRASHEKAR et al., 1990; JOHNSON et al., 1991).

Die Versuche zur passiven Immunisierung *B. pahangi*- und *L. sigmodontis*-infizierter *M. coucha* mit Anti-Bp1 zeigen, dass zu den verschiedenen *in vitro*-Reaktionen schließlich ein *in vivo*-Korrelat besteht. In beiden Infektionen bewirkte die einmalige intravenöse Injektion von Anti-Bp1 einen abrupten Abfall der Mikrofilariendichte im peripheren Blut. Dieser war zwar bei *L. sigmodontis* deutlich schwächer als bei der Behandlung mit dem gegen die homologen Scheidenproteine gerichteten Serum, entspricht aber bei *B. pahangi* der Wirkung dieses Serums durchaus. Es ist anzunehmen, dass durch die Scheidenoberflächenspezifischen Antikörper Mikrofilarien in den Kapillaren agglutiniert oder überreaktive Zellen aus der Zirkulation herausgefangen und eliminiert wurden. Der mehr oder weniger rasche Wiederanstieg der Parasitämie dürfte die Elimination des heterologen Antikörpers aus den Versuchstieren und ein kompensierendes Nachproduzieren von Mikrofilarien durch die adulten Parasiten widerspiegeln. Weshalb die Parasitämie speziell bei *B. pahangi*-infizierten Tieren nach Behandlung mit dem Serum Anti-s anhaltend reduziert blieb, ist damit allerdings

nicht zu erklären. Es handelte sich in beiden Fällen um Kaninchenserum, die zumindest in ähnlichen Zeiträumen hätten abgebaut werden müssen. Der Versuch, eine Erklärung über eine mögliche Schädigung der Embryogenese zu finden, erbrachte zwar keine klaren Ergebnisse, doch war der eventuelle Effekt so gering, dass er als Ursache für die anhaltende Reduktion der Parasitämiedichte kaum in Frage kommen dürfte.

Zusammenfassend lassen die vorstehend beschriebenen und diskutierten Ergebnisse annehmen, dass mit Shp6 ein neues, konserviertes Protein der Mikrofilarienscheide gefunden wurde. Seine molekularbiologische Charakterisierung ist mit dieser Studie nicht abgeschlossen. Insbesondere sollte die gesamte cDNA erfasst werden, um Klarheit über deren Größe zu erhalten. Desweiteren gilt es zu klären, in wieviel Kopien das Gen vorliegt, wo es transkribiert wird. Da Bp1 offensichtlich auf der Scheidenoberfläche für Antikörper zugänglich ist und Mikrofilarien über Anti-Bp1-Antikörper *in vitro* und *in vivo* eliminiert werden, spielt das Molekül möglicherweise eine Rolle bei der immunologischen Kontrolle der Mikrofilariämie. Hier ist zu klären, ob Bp1 von Serum infizierter Wirte aus verschiedenen Infektionsphasen erkannt wird und so Zusammenhänge zwischen den Höhen der Parasitämie und dem Antikörperspiegel bestehen.

## 6. Zusammenfassung

Filarien (Filarioidea) sind an Arthropoden als Zwischenwirte gebundene bedeutende Krankheitserreger beim Menschen und bei Tieren. Sie sind vivipar und entlassen die für den Zwischenwirt infektiösen Larven 1 (Mikrofilarien) ins Blut oder in andere Gewebe des Endwirts. Dabei besteht innerhalb der Familie Onchocercidae eine Dichotomie, indem bei einigen Gattungen die Mikrofilarien eine sie allseits umgebende Hülle, die sogenannte Scheide, tragen, während bei anderen Gattungen die Larven frei zirkulieren. Die Scheide entsteht über ein komplexes Zusammenwirken von intrauterinen Embryonalstadien und Uterus-Zellen der weiblichen Filarie, besteht überwiegend aus Proteinen und stellt aufgrund seiner Undurchlässigkeit für Antikörper eine Interaktionszone zwischen Parasit und Immunreaktion des Wirts dar.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Scheidenoberflächenantigen (Bp1) des Parasiten *Brugia pahangi*, einer dem Erreger der Lymphatischen Filariose des Menschen *B. malayi* nahe verwandte Art, dargestellt und mit molekularbiologischen und immunologischen Methoden charakterisiert.

Der cDNA-Klon Bp1 (156 bp) wurde nach einer Expressionsklonierung aus einer cDNA-Bank adulter weiblicher *B. pahangi* mit einem Antiserum gegen den SDS/2ME-unlöslichen Anteil der Mikrofilarienscheide von *Litomosoides sigmodontis*, also heterologe Scheidenkomponenten, identifiziert. Aus einer genomischen Bibliothek konnte mit dem als Probe fungierenden cDNA-Klon ein genomischer Klon (gBp1, 10110 bp) isoliert werden. Die Sequenzen der partiellen cDNA und der genomischen DNA sind identisch. Das vollständige Bp1-Gen enthält nach computergestützter Vorhersage fünf Exons und kodiert für ein Polypeptid von 185 Aminosäuren. Die computerunterstützte Homologiesuche in den Datenbanken ergab signifikante Homologien in der sequenzierten genomischen Sequenz. Für die Bp1-cDNA-Sequenz fanden sich aber weder auf DNA- noch auf Aminosäureebene signifikante Homologien.

Die Erkennung mehrerer kreuzreagierender Antigene, die auch in Antigenpräparationen adulter Parasiten und Larven 3 auftreten, lassen vermuten, dass Bp1 nicht stadienspezifisch exprimiert wird.

Ein Antiserum gegen das rekombinante  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein erkennt im Immunoblot in adulten Stadien und Mikrofilarien von *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* sowie Larven 3 von *B. malayi* jeweils bis zu 5 Komponenten im Bereich zwischen 30 kDa und 99 kDa. In *B. malayi*-Mikrofilarienscheiden wurden Moleküle von 41 kDa und 58 kDa erfasst. Die Ergebnisse sprechen vorab weiterer Analysen für eine gattungs- und stadienübergreifende Expression.

Bei adulten weiblichen Filarien reagierte das Antiserum (PAP-Test) mit Epithelzellen im distalen Uterus. Es wird angenommen, dass Bp1 von diesen Zellen in das Uteruslumen sezerniert und auf die Scheide der herangereiften Mikrofilarien aufgelagert wird, da das Antiserum bei aus dem Blut isolierten Mikrofilarien von *B. pahangi*, *B. malayi* und *L. sigmodontis* an die Scheidenoberfläche bindet. Diese Befunde entsprechen im Prinzip denen, die für andere Oberflächenkomponenten von Mikrofilarienscheiden erhoben wurden, doch lässt sich die Bindung des Antiserums durch eine Vorbehandlung der Mikrofilarien mit Chymotrypsin steigern.

Für eine Lokalisation von Bp1 auf der Scheidenoberfläche sprechen auch die Beobachtungen, dass das Antiserum gegen Bp1 lebende Mikrofilarien der genannten Arten agglutiniert und die Adhärenz von homologen Milzzellen an die Scheidenoberfläche vermittelt. Damit korreliert weiterhin, dass die intravenöse Injektion des Antiserums in mikrofilariämische, *B. pahangi*- oder *L. sigmodontis*-infizierte *Mastomys coucha* zu einem raschen, etwa 5 Tage anhaltenden Abfall der Parasitämie um ca. 50% bzw. 25% führte.

Die Untersuchungen sprechen dafür, dass es sich bei Bp1 um ein neues, konserviertes Antigen auf der Scheidenoberfläche von Mikrofilarien handelt, das möglicherweise Bedeutung hat für die Persistenz/Immunelimination der Mikrofilarien im Wirt. Es wird vorgeschlagen, Bp1 in die Systematik der bisher beschriebenen Scheidenproteine einzugliedern und als Shp6 zu bezeichnen.

## 7. Summary

Filariæ (Filarioidea) are important metazoan pathogens of humans and animals which are transmitted by blood-sucking arthropods. They are viviparous and release first stage larvae (microfilariae) which have to be ingested by the intermediate host. There is a dichotomy within the family Onchocercidae as the microfilariae of some genera are enclosed by a so-called sheath whereas in other genera the microfilariae are released free. Sheath formation is a complex procedure involving both interuterine stages and the uterus epithelium of the female worm. The sheath is a predominantly proteinaceous structure which is impermeable for antibodies. Thus it represents an area of interaction between the parasite and the host's immune response. The present thesis describes molecular and immunologic characteristics of a sheath surface protein (Bp1) of *B. pahangi*, a species which is closely related with *B. malayi*, a causative agent of human lymphatic filariasis.

The cDNA clone Bp1 (156 bp) was identified by immunoscreening of a expression cDNA library of adult female *B. pahangi* using antibodies to heterologous sheath components, i.e. the SDS/2ME insoluble portion of the *Litomosoides sigmodontis* microfilariae sheath. Using the clone as a probe a genomic clone (101,10 bp) could be isolated. According to online sequence analysis resources the Bp1 gene contains 5 exons and encodes a polypeptide of 185 amino acids. There are homologies to some filariæ EST sequences but there were no relations to known sheath components.

An antiserum raised against the recombinant  $\beta$ -galactosidase fusion protein reacted with up to 4 polypeptides of 30 kDa to 99 kDa in adults and microfilariae of *B. pahangi*, *B. malayi* and *L. sigmodontis* and in third stage larvae of *B. malayi* when tested by immunoblotting.

In microfilariae sheaths of *B. malayi* the antiserum recognized molecules of 41 kDa and 58 kDa. The current results suggest genus and stage overlapping expression. Sections of adult female filariæ showed binding of the antibodies to the recombinant protein to epithelial cells of the distal uterus (PAP test). It therefore seems the Bp1 is synthesized by the epithelium of the uterus and accumulates on the sheath. Localization on the sheath surface could be shown by indirect immunofluorescence assays for *B. pahangi*, *B. malayi* and *L. sigmodontis* microfilariae. These data in principle correspond with those reported for other sheath surface components. However, binding of the antibodies could be intensified by pre-treatment of the microfilariae with chymotrypsin.

A localization of Bp1 on the sheath surface is also suggested by the agglutination activity of the antiserum to Bp1 and antibody mediated adherence of homologous (rabbit) spleen cells. These observations correlate with the *in vivo* effects of the antiserum in *B. pahangi* and *L. sigmodontis*

infected *Mastomys coucha*: intravenous injection of the antiserum results in a rapid decrease of microfilaraemia levels by approximately 50% and 25%, respectively, which persists for 5-7 days.

Thus Bp1 seems to represent a new, conserved antigen of the microfilariae sheath surface which possibly plays a role in persistence/immune-mediated elimination of microfilariae in the host. It is proposed name it Shp6 according to the currently used nomenclatur.

## 8. Literaturverzeichnis

- AH, H.S., THOMPSON, P.E. (1973).  
*Brugia pahangi*: Infections and their effect on the lymphatic system of mongolian jirds (*Meriones unguiculatus*).  
Experimental Parasitology **34**, 393-411.
- AHMED, S.S. (1967).  
Studies on the laboratory transmission of sub-periodic *Brugia malayi* and *B. pahangi*. II. Transmission to intact and splenectomized rats and cotton rats.  
Annals of Tropical Medicine and Parasitology **61**, 432-436.
- ALTSCHUL, S.F., BIGUSKI, M.S., GISH, W., LIPMAN, D.J. (1990).  
Basic local alignment search tool.  
J. Mol. Biol. **215**, 403-410.
- ANYA, A.O. (1976).  
Physiological aspects of reproduction in nematodes.  
Adv. Parasitol. **14**, 267-351.
- ASH, L. R. & RILEY, J.M. (1970a).  
Development of *Brugia pahangi* in the jird, *Meriones unguiculatus*, with notes on infections in other rodents.  
Journal of Parasitology **56**, 962-968.
- ASH, L. R. & RILEY, J.M. (1970b).  
Development of subperiodic *Brugia malayi* in the jird, *Meriones unguiculatus*, with notes on infections in other rodents.  
Journal of Parasitology **56**, 969-973.
- BAERMANN, G. (1917).  
Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum-(Nematoden)-Larven in Erdproben.  
Tijdschr. Diergeneesk. **57**, 131-137.
- BAIN, O. (1975).  
Redescription de cinq espèces d'Onchocercus.  
Annales de Parasitologie, Paris **50**, 763.
- BARDEHLE, G. (1990).  
Isolierung und biochemische Analysen der Mikrofilarienscheiden von *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea).  
Diss. rer. nat., Gießen.
- BARDEHLE, G., CONRATHS, F.J., FAHRENHOLZ, F., HINTZ, M., LINDER, D., SCHARES, G., SCHOTT, H.-H., SCHÜTZLE, B., STIRM, S., STÜBER, W., ZAHNER, H. (1991).  
A major *Litomosoides carinii* microfilarial sheath glycoprotein (gp22): amino terminal sequence and immunological studies with corresponding synthetic peptides.  
Parasitology **103**, 387-394.
- BARDEHLE, G., JEPP-LIBUTZKI, A., LINDER, D., MOEHNLE, K., SCHOTT, H.-H., ZAHNER, H., ZÄHRINGER, U., STIRM, S. (1992a).  
Chemical composition of *Litomosoides carinii* microfilarial sheath.  
Acta Tropica **50**, 237-247.
- BARDEHLE, G., HINTZ, M., LINDER, D., SCHARES, G., SCHOTT, H.-H., STIRM, S., ZAHNER, H. (1992b).  
*Litomosoides carinii*: extraction of the microfilarial sheath components and antigenicity of the sheath fractions.  
Parasitol. Res. **78**, 501-508.

- BELL, S.D., BROWN, H.W. (1945).  
Studies on microfilarial periodicity of *Litomosoides carinii*, filariid parasite of the cotton rat.  
Amer. J. Trop. Med. **25**, 137-140.
- BRUG, S.L. (1927).  
Een nieuwe Filaria-soort (*Filaria malayi*) parasiteerende bij den mensch (voorloopige mededeeling).  
Geneesk. Tijdschr. Nederl.-Indie **5**, 750-754.
- BUCKLEY, J.J.C., EDESON, J.F.B. (1956).  
On the adult morphology of *Wuchereria* sp. (*malayi* ?) from a monkey (*Macaca irus*) and from cats in Malaya, and on *Wuchereria pahangi* n.sp. from a dog and a cat.  
Journal of Helminthology **30**, 1-20.
- BUCKLEY, J.J.C. (1958).  
Occult filarial infections of animal origin as a cause of tropical pulmonary eosinophilia.  
E. Afr. med. J. **35**, 493 ff.
- BUCKLEY, J.J.C., NELSON, G.S., HEISCH, R.B. (1958).  
On *Wuchereria patei* n. sp. from the lymphatics of cats, dogs and genet cats on Pate Island, Kenya.  
Journal of Helminthology **32**, 73 ff.
- BUCKLEY, J.J.C. (1960).  
On *Brugia* gen. nov. for *Wuchereria* spp. of the "malayi" group.  
Ann. Trop. Med. Parasitol. **54**, 75-77.
- BURGE, C., KARLIN, S. (1997).  
Prediction of complete gene structures in human genomic DNA.  
Mol. Biol. **268**, 78-94.
- BURNETTE, W.N. (1981).  
„Western Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodated protein A.  
Anal. Biochem. **112**, 195-203.
- CANLAS, M., WADEE, A., LAMONTAGNE, L., PIESSENS, W.F. (1984).  
A monoclonal antibody to surface antigens on microfilariae of *Brugia malayi* reduces microfilaraemia in infected jirds.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. **33**, 420-424.
- CARLOW, C.K.S., FRANKE, E.D., LOWRIE, R.C. Jr, PARTONO, F., PHILIPP, M. (1987).  
Monoclonal antibody to a unique surface epitope of the human filaria *Brugia malayi* identifies infective larvae in mosquito vectors.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **84**, 6914-6918.
- CHANDRASHEKAR, R., RAO, U.R., RAJASEKARIAH, G.R., SUBRAMANYAM, D. (1984).  
Separation of viable microfilariae free of blood cells on Percoll gradients.  
Journal of Helminthology **58**, 69-70.
- CHANDRASHEKAR, R., RAO, U.R., SUBRAMANYAM, D. (1990).  
IgG response of rats to the excretory-secretory products of *Litomosoides carinii*.  
Parasitol. Res. **76**, 420-423.
- CHRIST, H., HIRZMANN, J., CONRATHS, F.J., ZAHNER, H., STIRM, S., HOBOM, G. (1992).  
Trans-splicing of an early embryo mRNA in *Litomosoides carinii*, coding for the major microfilarial sheath protein gp22.  
Gene **121**, 219-226.
- COBBOLD, T.S. (1877).  
Discovery of the adult representative of microscopic filariae.  
Lancet **2**, 70.

- CONRATHS, F.J., SCHÜTZLE, B., SCHARES, G., CHRIST, H., HOBOM, G., ZAHNER, H. (1993).  
The gene coding for the major sheath protein of *Litomosoides carinii* microfilariae, gp22, is transcribed in oocytes and embryonic cells.  
Mol. Biochem. Parasitol. **60**, 111-120.
- CONRATHS, F.J., HIRZMANN, J., HOBOM, G., ZAHNER, H. (1997).  
Expression of the microfilarial sheath protein 2 (shp2) of the filarial parasites *Litomosoides sigmodontis* and *Brugia malayi*.  
Exp. Parasitol. **85(3)**, 241-248.
- CROSS, J.H., SCOTT, J.A. (1947).  
The developmental anatomy of the fourth stage larvae and adults of *Litomosoides carinii*, a filarial worm of the cotton rat.  
Trans. Am. Micr. Soc. **66**, 1-21.
- CROSS, J.H., PARTONO, F., MEI-YUAN HSU, ASH, L.R., OEMIJATI, S. (1974).  
Proceedings of the 3rd International Congress of Parasitology (Munich) **2**, 613.
- CULBERTSON, J.T.; ROSE, H.M. (1944).  
Chemotherapy of filariasis in the cotton rat by administration of Neostam.  
Science **99**, 245.
- DAFA'ALLA, T.H. (1997).  
Characterization of Two Novel Genes of *Litomosoides sigmodontis*.  
Diss. rer. nat., Gießen.
- DAFA'ALLA, T.H., TAUBERT, A., HOBOM, G., BECK, E., ZAHNER, H. (2000).  
Molecular characterization of a *Litomosoides sigmodontis* protein involved in the development of the microfilarial sheath during embryogenesis.  
Mol. Biochem. Parasitol. **106(1)**, 37-50.
- DENHAM, D.A., PONNUDURAI, T., NELSON, G.S., GUY, F., ROGERS, R. (1972a).  
Studies with *Brugia pahangi*. I. Parasitological observations on primary infections of cats (*Felis catus*).  
International Journal for Parasitology **2**, 239-247.
- DENHAM, D.A., PONNUDURAI, T., NELSON, G.S., ROGERS, R., GUY, F. (1972b).  
Studies with *Brugia pahangi*. II. The effect of repeated infection on parasite levels in cats (*Felis catus*).  
International Journal for Parasitology **2**, 401-407.
- DENHAM, D.A., ROGERS, R. (1975).  
Structural and functional studies on the lymphatics of cats infected with *Brugia pahangi*.  
Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene **69**, 173-176.
- DENHAM, D.A., MCGREEVY, P.B., SUSWILLO, R.R., ROGERS, R. (1983).  
The resistance to reinfection of cats repeatedly inoculated with infective larvae of *Brugia pahangi*.  
Parasitology **86**, 11-18.
- DENHAM, D.A., FLETCHER, C. (1987).  
The cat infected with *Brugia pahangi* as a model of human filariasis.  
Ciba Foundation Symposium **127**, 225-235
- DENHAM, D.A., MEDEIROS, F., BALDWIN, C., KUMAR, H., MIDWINTER, I.C.T., BIRCH, D.W., SMAIL, A. (1992).  
Repeated infection of cats with *Brugia pahangi*: parasitological observations.  
Parasitology **104**, 415-420.
- DEVENEY, E. (1985).  
Lectin-binding characteristics of *Brugia malayi* microfilariae.  
Trop. Med. Parasit. **36**, 25-28.

- DONELSON, J.E., ZENG, W. (1990)  
A comparison of trans-RNA splicing in trypanosomes and nematodes.  
*Parasitology Today* **10**, 327-334.
- DRUET, R.L., JANIGAN, D.T. (1966).  
Experimental amyloidosis. Amyloid induction with a soluble protein antigen in intact, bursectomized and thymectomized chickens.  
*American Journal of Pathology* **49**, 1103-1123.
- EDESON, J.F.B., BUCKLEY, J.J.C. (1959).  
Studies on filariasis in Malaya: on the migration and rate of growth of *Wuchereria malayi* in experimentally infected cats.  
*Ann. Trop. Med. Parasit.* **53**, 113-119.
- EDESON, J.F.B., WHARTON, R.H. (1957).  
The transmission of *Wuchereria malayi* from man to the domestic cat.  
*Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* **51**, 366-370.
- EDESON, J.F.B., WHARTON, R.H., LAING, A.B.G. (1960a).  
A preliminary account of the transmission, maintenance and laboratory vectors of *Brugia pahangi*.  
*Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* **54**, 439-449.
- EDESON, J.F.B., WILSON, T., WHARTON, R.H., LAING, A.B.G. (1960b).  
Experimental transmission of *Brugia malayi* and *B. pahangi* to man.  
*Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* **54**, 229-234.
- EWERT, A., EL BIHARI, S. (1971).  
Rapid recovery of *Brugia malayi* larvae following experimental infections in cats.  
*Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* **65**, 364-368.
- EWERT, A., SINGH, M. (1969).  
Microfilarial levels in cats infected with *Brugia pahangi* by two alternative routes.  
*Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* **63**, 603-607.
- FLETCHER, C., BIRCH, D.W., SAMAD, R., DENHAM, D.A. (1986).  
*Brugia pahangi* infections in cats: antibody responses which correlate with the change from the microfilaraemic to the amicrofilaraemic state.  
*Parasite Immunol.* **8**, 345-357.
- FLETCHER, C., BIRCH, D.W., DENHAM, D.A. (1992).  
Cats with single *Brugia pahangi* infections: relationship between parasitological status and humoral responses to somatic and surface parasite antigens.  
*Parasite Immunol.* **14**, 339-350.
- FRISCHAUF A.M., LEHRACH H., POUSTKA A., MURRAY N. (1983)  
Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences.  
*J. Mol. Biol.* **170**, 827-842.
- FUHRMAN, A., ASH, L.R. (1983a).  
Analysis of *Brugia malayi* microfilariae surface carbohydrates: comparison of the binding of a panel of fluoresceinated lectins to mature in vivo-derived and immature in utero-derived microfilariae.  
*Acta trop.* **40**, 45-51.
- FUHRMAN, A., ASH, L.R. (1983b).  
Characterization of the exposed carbohydrates of the sheath surface of in vitro-derived *Brugia pahangi* microfilariae by analysis of lectin binding.  
*J. Parasitol.* **69**, 1043-1047.
- FUHRMAN, A., PIESSENS, W.F. (1985).  
Chitin synthesis and sheath morphogenesis in *Brugia malayi* microfilariae.  
*Mol. Biochem. Parasitol.* **17**, 93-104.

- GOLDSTEIN, I.J. (1981).  
Lectins: an overview.  
Biotech, autumn 81-1.
- GREENE, B.M., TAYLOR, H.R., AIKAWA, M. (1981).  
Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus*: eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction.  
J. Immunol. **127**, 1611-1618.
- GREENE, B.M. (1985)  
Onchocerciasis.  
Tropical and Geographical Medicine, McGraw-Hill Book Company, New York, 413-422.
- GREENE, B.M., TAYLOR, H.R., CUPP, E.W., MURPHY, R.P., WHITE, A.T., AZIZ, M.A., SCHULZKEY, H., D'ANNA, S., NEWLAND, H.S., GOLDSCHMITT, L.P., AUER, C., HANSON, A.P., FREEMAN, S.V., REEBER, E.W., WILLIAMS, P.N. (1985).  
Comparison of ivermectin and diethylcarbamazine in the treatment of onchocerciasis.  
N. Engl. J. Med., **313**, 133-139.
- GRENFELL, B.T., MICHAEL, E., DENHAM, D.A. (1991).  
A Model for the Dynamics of Human Lymphatic Filariasis.  
Parasitology Today vol. **7**, no. 11, 318-323.
- HAMMERBERG, B., RIKIHISA, Y., KING, M. (1984).  
Immunoglobulin interactions with surface of sheathed and unsheathed microfilariae.  
Parasit. Immunol. **6**, 421-434.
- HARDT, F. (1971).  
Acceleration of casein induced amyloidosis in mice by immunosuppressive agents.  
Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, Section A **79**, 61-64.
- HARDT, F., CLAEISSON, M.H. (1971).  
Graft-versus-host reactions mediated by spleen cells from amyloidotic and non-amyloidotic mice.  
Transplantation **12**, 36-64.
- HAQUE, A., JOSEPH, M., QUAISSI, M.A., CAPRON, M., CAPRON, A. (1980).  
IgE antibody-mediated cytotoxicity of rat macrophages against microfilaria of *Dipetalonema viteae* in vitro.  
Clin. Exp. Immunol. **40**, 487-495.
- HAQUE, A., QUAISSI, M.A., JOSEPH, M., CAPRON, M., CAPRON, A. (1981).  
IgE antibody in eosinophil- and macrophage-mediated in vitro killing of *Dipetalonema vitae* microfilariae.  
J. Immunol. **127**, 716.
- HAWKING, F., BURROUGHS, A.M. (1946).  
Transmission of *Litomosoides carinii* to mice and hamsters.  
Nature **158**, 98.
- HEERY, D.M., GANNON, F., POWELL, R. (1990).  
A simple methode for subcloning DNA fragments from gel slices.  
Trends Genet. **6**, 173ff.
- HINTZ, M., HIRZMANN, J., HOBOM, G., LINDER, D., LOTTSPEICH, F., SCHOTT, H.-H., CONRATHS, F.J., ZAHNER, H., STIRM, S. (1994).  
*Litomosoides carinii* microfilarial sheaths: partial amino acid sequences of several major polypeptide constituents.  
Mol. Biochem. Parasitol. **67**, 69-78.

- HINTZ, M. (1995).  
Die Proteine der Mikrofilarienscheide von *Litomosoides carinii*.  
Diss. rer. nat., Gießen.
- HINTZ, M., KASPER, M., STAHL, B., GEYER, R., KALINOWSKI, H.-O., KARAS, M., KÜHNHARDT, S., SCHOTT, H.-H., CONRATHS, F.J., ZAHNER, H., STIRM, S. (1994).  
*Litomosoides carinii* microfilarial sheaths: partial amino acid sequences of several major polypeptide constituents.  
Mol. Biochem. Parasitol. **77**, 69-78.
- HINTZ, M., KASPER, M., STAHL, B., GEYER, R., KALINOWSKI, H.-O., KARAS, M., KÜHNHARDT, S., SCHOTT, H.-H., CONRATHS, F., ZAHNER, H., STIRM, S. (1996).  
Dimethylaminoethanol is a major component of the *Litomosoides carinii* microfilarial sheath.  
Mol. Biochem. Parasitol. **76**, 325-328.
- HIRST, S. (1913).  
On three new gamasid mites found on rats.  
Bull. Ent. Res. **4**, 119-124.
- HIRZMANN, J., SCHNAUFER, A., HINTZ, M., CONRATHS, F.J., STIRM, S., ZAHNER, H., HOBOM, G. (1995).  
*Brugia* spp. and *Litomosoides carinii*: identification of a covalently cross-linked microfilarial sheath matrix protein (shp2).  
Mol. Biochem. Parasitol. **70(1-2)**, 95-106.
- HIRZMANN, J. (1997).  
Molekularbiologie der Mikrofilarienscheide: Isolierung, Charakterisierung und Vergleich von Strukturprotein-Genen der Nagerfilarie *Litomosoides sigmodontis* und der humanpathogenen Filarie *Brugia malayi*.  
Diss. rer. nat., Gießen.
- HOLMES, D.S. & QUIGLEY, M. (1981).  
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.  
Anal. Biochem. **114**, 193.
- HUYNH, T.V., YOUNG, R.A., DAVIS, R.W. (1985).  
Construction and Screening cDNA Libraries in  $\lambda$ gt10 and  $\lambda$ gt11.  
In: GLOVER, D.M. (Ed.): DNA Cloning Techniques: A Practical Approach  
IRL Press, Oxford, Washington D.C., 49-77.
- JOHNSON, E.H., LUSTIGMAN, S., BROTMAN, B., BROWNE, J., PRINCE, A.M. (1991).  
*Onchocerca volvolus*: In vitro killing of microfilaria by neutrophils and eosinophils from experimentally infected chimpanzees.  
Trop. Med. Parasitol. **42**, 351-355.
- KAUSHAL, N.A., SIMPSON, A.J.G., HUSSAIN, R., OTTESEN, E.A. (1984).  
*Brugia malayi*: Stage-specific expression of carbohydrates containing N-acetyl-D-glucosamine on the sheathed surfaces of microfilariae.  
Exp. Parasit. **58**, 182-187.
- KERSHAW, W.E. (1948).  
Observations on *Litomosoides carinii* (Travassos, 1919) Chandler, 1931. 1. The development of the first-stage larva.  
Annals of Tropical Medicine and Parasitology **42**, 377-399.
- KLEI, T.R., CROWELL, W., THOMPSON, P.E. (1974).  
Ultrastructural glomerular changes associated with filariasis.  
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **23**, 608-618.

- KLEI, T.R., CROWELL, W. (1981).  
Pathological changes in kidneys, livers and spleens of *Brugia pahangi*-infected jirds (*Meriones unguiculatus*).  
Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. **55**, 123-131.
- KLEI, T.R., ENRIGHT, F.M., BLANCHARD, D.P., UHL, S.A. (1981).  
Specific hypo-responsive granulomatous tissue reactions in *Brugia pahangi* infected jirds.  
Acta Tropica **38**, 267-276.
- KLONISCH, T., BARDEHLE, G., SCHOTT, H.-H., STIRM, S., ZAHNER, H. (1987).  
Comparative constituent analysis of the microfilarial sheaths of *Litomosoides carinii* and *Brugia malayi*.  
Trop. Med. Parasit. **38**, 340.
- KLONISCH, T. (1990).  
Isolierung und Analysen der Mikrofilarien-Scheiden von *Brugia malayi* und *Brugia pahangi*.  
Diss. med., Gießen.
- KLONISCH, T., BARDEHLE, G., LINDER, D., BOSCHEK, B., SCHOTT, H.-H., STIRM, S., ZAHNER, H. (1991).  
The sheaths of *Brugia* microfilariae: isolation and composition.  
Parasitology Research **77**, 448-451.
- KURNIAWAN, L., BASUNDARI, E., FUHRMAN, J.A., TURNER, H., PURTOMA, H., PIESSENS, W.F. (1990).  
Differential recognition of microfilarial antigens by sera from immigrants into an area endemic for brugian filariasis.  
Parasite Immunology **12**, 213 ff.
- LÄMMLER, G., SÄNGER, I., WEGERHOF, P.H. (1978).  
Chemotherapeutic studies on *Litomosoides carinii* infection of *Mastomys natalensis*.  
7. Filaricidal activity of Furazolidone.  
Trop. Med. Parasit. **29**, 178-182.
- LÄMMLER, G., SAUPE, E., HERZOG, H. (1968).  
Infektionsversuche mit der Baumwollrattenfilarie *Litomosoides carinii* bei *Mastomys natalensis* (Smith, 1834).  
Zeitung für Parasitenkunde **30**, 281-290.
- LÄMMLI, U.K. (1970).  
Cleavage of structural proteins during the assembly on the head of bacteriophage T4.  
Nature **227**, 680-685.
- LAING, A.B.G., EDESON, J.F.B., WHARTON, R.H. (1960).  
Studies on filariasis in Malaysia: the vertebrate hosts of *Brugia malayi* and *B. pahangi*.  
Annals of Tropical Medicine and Parasitology **54**, 92-99.
- LAURENCE, B.R., SIMPSON, M.G. (1974).  
The ultrastructure of the microfilaria of *Brugia*, Nematoda: Filarioidea.  
International Journal for Parasitology **4**, 523-536.
- LAWRENCE, R.A., DENHAM, D.A. (1992).  
*Brugia pahangi* infections in immune-compromised rats demonstrate that separate mechanisms control adult worm and microfilarial numbers.  
Parasite Immunol. **14**, 371-384.
- LAWRENCE, R.A., DENHAM, D.A. (1993).  
Stage and isotype specific immune responses in a rat model of filariasis.  
Parasite Immunol. **15**, 429-439.

- LAWSON, D.A., WENK, P., STOREY, D.M. (1989).  
Identification of a potential protective microfilarial antigen from *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea).  
Trop. Med. Parasit. **40**, 42-46.
- LEDERBERG, E.M. & COHEN, S.N. (1974).  
Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid desoxyribonucleic acid.  
J. Bacteriol. **119**, 1072-1074.
- LEEUWIN, R.S. (1962).  
Trop. Geogr. Med. **14**, 355-360.
- LICHTENBERG, F. von (1956).  
The early phase of endemic bancroftian filariasis in the male: Pathological study.  
Journal of the Mount Sinai Hospital, New York **24**, 983-1000.
- LICHTENBERG, F von (1987).  
Inflammatory responses to filarial connective tissue parasites.  
Parasitology **94**, 101-122.
- LOK, J.B., ABRAHAM, D. (1992).  
Animal models for the study of immunity in human filariasis.  
Parasitology Today **8**, 168-171.
- MAIZELS, R.M., PARTONO, F., OEMIJATI, S., DENHAM, D.A., OGILVIE, B.M. (1983).  
Cross-reactive surface antigens on three stages of *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *B. timori*.  
Parasitology **87**, 249-263.
- MAIZELS, R.M., PHILIPP, M., DASGUPTA, A., PARTONO, F. (1984).  
Human serum albumin is a major component on the surface of microfilariae of *Wuchereria bancrofti*.  
Parasite Immunology **6**, 185-190.
- MAIZELS, R.M., SELKIRK, M.E., SUTANO, I., PARTONO, F. (1987).  
Antibody responses to human lymphatic filarial parasites.  
Ciba Foundation Symp. **127**, 189-200.
- MAIZELS, R.M., SARTONO, E., KURNIAWAN, A., PARTONO, F., SELKIRK, M.E., YAZDANBAKHSH, M. (1995).  
T-cell Activation and the Balance of Antibody Isotypes in Human Lymphatic Filariasis.  
Parasitology Today, vol. II, **2**, 50-55.
- MALONE, J.B., LEININGER, J.R., CHAPMAN, W.L. (1976).  
*Brugia pahangi* in golden hamsters. histopathological study.  
Experimental Parasitology **40**, 62-73.
- MAK, J.W. (1987).  
Epidemiology of lymphatic filariasis.  
Ciba Foundation Symposium **127**, 5-14
- MARTINEZ-PALOMO, A. (1978).  
Ultrastructural characterization of the cuticle of *Onchocerca volvulus*.  
Journal of Parasitology **64**, 127-136.
- McDONELL, M.W., SIMON, M.N., STUDIER, F.W. (1977).  
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.  
J. Mol. Biol. **110**, 119ff.
- McFADZEAN, J.A., SMILES, J. (1956).  
Studies of *Litomosoides carinii* by phase-contrast microscopy: the development of the larvae.  
Journal of Helminthology **30**, 25-32.

McGREEVY, P.B., RATIWAYANTO, S., TUTI, S., McGREEVY, M., DENNIS, D.T. (1980).  
*Brugia malayi*: relationship between anti-sheath antibodies and amicrofilaraemia in natives living in an endemic area of South Kalimantan, Borneo.  
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **29**, 553-562.

McLAREN, D.J. (1972).  
Ultrastructural studies of microfilariae (Nematoda: Filarioidea).  
Parasitology **65**, 317-332.

McMAHON, J.E., SIMONSEN, P.E. (1996).  
Filariasis. In: COOK, G.C. (Ed.), Mansons Tropical Diseases.  
Verlag: WB Saunders Company Ltd., 1321-1338.

MEDEIROS, F., BALDWIN, C.I., DENHAM, D.A. (1996).  
*Brugia pahangi* in cats: the passive transfer of antimicrofilarial immunity from immune to non-immune cats.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 3642-3646.

MEHTA, K., SINDHU, R.K., SUBRAMANYAM, D., NELSON, D.S. (1980).  
IgE-dependent cellular adhesion and cytotoxicity of rat spleen and peritoneal cells to *L. carinii* microfilariae.  
Clin. Exp. Immunol. **41**, 107-114.

MEHTA, K., SINDHU, R.K., SUBRAMANYAM, D., HOPPER, K., NELSON, D.S., RAO, C.K. (1981a).  
Antibody-dependent cell-mediated effects in bancroftian filariasis.  
Immunology **43**, 117-123.

MEHTA, K., SUBRAMANYAM, D., HOPPER, K., NELSON, D.S., RAO, C.K. (1981b).  
IgE dependent human eosinophil-mediated adhesion and cytotoxicity of *Litomosoides carinii* larvae.  
Indian J. Med. Res. **74**, 226-230.

MEHTA, K., SINDHU, R.K., SUBRAMANYAM, D., HOPPER, K., NELSON, D.S. (1982).  
IgE dependent cellular adhesion and cytotoxicity to *Litomosoides carinii* microfilariae-nature of effector cells.  
Clin. Exp. Immunol. **48**, 477-484.

MILLER, J.H. (1972).  
Experiments in molecular genetics.  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

NILSEN, T.W. (1989).  
trans-Splicing in nematodes.  
Exp. Parasit. **69**, 413-416.

NEAFIE, R.C. (1972).  
Morphology of *Onchocerca volvulus*.  
American Journal of Clinical Pathology, **57**, 574-586.

OTTESEN, E.A., WELLER, P.F., HECK, L. (1977).  
Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis.  
Immunology **33**, 413-421.

OTTESEN, E.A., NEVA, F.A., PARANJAPE, R.S., TRIPATHY, S.P., THIRUVENGADAM, K.V., BEAVEN, M.A. (1979).  
Specific allergic sensitization to filarial antigens in tropical eosinophilia syndrome.  
Lancet **i**, 1158-1160.

OTTESEN, E.A. (1980).  
Immunopathology of lymphatic filariasis in man.  
Springer Seminars in Immunopathology **2**, 373-385.

- OTTESEN, E.A., WELLER, P.F., LUNDE, M.N., HUSSAIN, R. (1982).  
Endemic filariasis on a Pacific Island II. Immunologic aspects: immunoglobulin, complement, and specific antifilarial IgG, IgM and IgE antibodies.  
*American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **31**, 953-961.
- OTTESEN, E.A. (1984).  
Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man.  
*Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **78** (Suppl.), 9-18.
- OTTESEN, E.A. (1987a).  
Discussion  
*Ciba Foundation Symposium* **127**, 27.
- OTTESEN, E.A. (1987b).  
The filariases and tropical eosinophilia.  
*Tropical and Geographical Medicine*, McGraw-Hill Book Company, New York, 407-435.
- OWHASHI, M., FUTAKI, S., KITAGAWA, K., HORII, Y., MARUYAMA, H., HAYASHI, H., NAWA, Y. (1993).  
Molecular cloning and characterization of a novel neutrophil chemotactic factor from a filarial parasite.  
*Mol. Immunol.* **30** (14), 1315-1320.
- PACQUE, M.C., DUKULY, Z., GREENE, B.M., MUNOZ, B., KEYVAN-LARIJANY, WILLIAMS, P.N., TAYLOR, H.R. (1989).  
Community-based treatment of onchocerciasis with ivermectin: acceptability and early adverse reactions.  
*Bull. Wld. Hlth. Org.*, **67**, 721-730.
- PALMIERI, J.R., CONNOR, D.H., PURNOMO, DENNIS, D.T., MARWOTO, H. (1982).  
Experimental infection of *Wuchereria bancrofti* in the silvered leaf monkey *Presbytis cristatus* Eschscholtz, 1821.  
*Journal of Helminthology* **56**, 243-245.
- PALMIERI, J.R., RATIWAYANTO, S., MASBAR, S., TIRTOKUSUMO, S., RUSCH, J., MARMOTO, H.A. (1985).  
Evidence of possible natural infections of man with *Brugia pahangi* in South Kalimantan (Borneo), Indonesia.  
*Trop Geogr Med* **37**, 239-244.
- PARTONO, F., PURNOMO, DENNIS, D.T., ATMOSOEDJONO, S., OEMIJATI, S., CROSS, J.H. (1977).  
*Brugia timori* sp. n. (Nematoda: Filarioidea) from Flores Islands, Indonesia.  
*J. Parasitol.* **63**, 540-546.
- PARTONO, F., PURNOMO (1978).  
Clinical features of Timorian filariasis among immigrants to an endemic area in West Flores, Indonesia.  
*Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **9**, 338-343.
- PARTONO, F., PURNOMO, PRIBALDI, W., SOEWARTA, A. (1978).  
Epidemiological and clinical features of *Brugia timori* in a newly established village, Karakuak, West Flores, Indonesia.  
*Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**, 910-915.
- PARTONO, F. (1987).  
The spectrum of disease in lymphatic filariasis.  
*Ciba Foundation Symposium* **127**, 15-31.

- PAULI, G., GREGERSEN, J.P., LUDWIG H. (1984)  
Plaque/focus immunoassay: a simple method for detecting antiviral monoclonal or other antibodies and viral antigens in cells.  
J. Immunol. Methods **74**, 337-344
- PAULSON, C.W., JACOBSON, R.H., CUPP, E.W. (1988).  
Microfilarial surface carbohydrates as a function of developmental stage and en-sheathment status in six species of filariids.  
J. Parasitol. **74**, 743-747.
- PEARSON, W.R. & LIPMAN, D.J. (1988).  
Improved tools for biological sequence comparison.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 2444-2448.
- PETERS, W., SCHRAERMEYER, U., ZAHNER, H. (1987).  
Formation and degradation of chitin during the development of microfilariae.  
Trop. Med. Parasit. **38**, 70.
- PETRÁNY, G., MIETH, H., LEITNER, I. (1975).  
*Mastomys natalensis* as an experimental host for *Brugia malayi* subperiodic.  
Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth. **6**, 328-337.
- PIESSENS, W.F., MCGREEVY, P.B., RATIWAYANTO, S., MCGREEVY, M., PIESSENS, P.W., KOIMAN, I., SAROSO, J.S., DENNIS, D.T. (1980).  
Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: correlation of cellular and humoral reactions to microfilarial antigens with clinical status.  
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **29**, 563-570.
- PINDER, M., LECLERC, A., EVERAERE, S. (1992).  
Antibody-dependent cell-mediated immune reactions to *Loa loa* microfilariae in amicrofilaraemic subjects.  
Parasite Immunol. **14**, 541-556.
- PONNUDURAI, T., DENHAM, D.A., NELSON, G.S., ROGERS, R. (1974).  
Studies with *Brugia pahangi*. 4. Antibodies against adult and microfilarial stages.  
J. Helminth. **48**, 107-111.
- POOLE, C.B., WILLIAMS, S.A. (1990).  
A rapid DNA assay for species-specific detection and quantification of *Brugia* in blood samples.  
Molecular and biochemical parasitology **40**, 129-136.
- PRINGLE, G., KING, D.F. (1968).  
Some developments in techniques for the study of the rodent filarial parasite *Litomosoides carinii*.  
1. A preliminary comparison of the host efficiency of the multimammate rat, *Praomys (Mastomys) natalensis*.  
Annals of Tropical Medicine and Parasitology **62**, 462-468.
- RAETHER, W., MAYERHÖFER, W. (1967).  
Quantitative Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Mikrofilarien (*Litomosoides carinii*) mit Hilfe der Zählkammern nach Fuchs-Rosenthal und Jessen sowie Anreicherungsverfahren.  
Z. Tropenmed. Parasitol. **18**, 99-108.
- RAMACHANDRAN, C.P., PACHECO, G. (1965).  
American cotton rat (*Sigmodon hispidus*) as an experimental host for *Brugia pahangi*.  
Journal of Parasitology **51**, 722-726.
- RAO, U.R., CHANDRASHEKAR, R., SUBRAMANYAM, D. (1987a).  
*Litomosoides carinii*: characterization of surface carbohydrates of microfilariae and infective larvae.  
Trop. Med. Parasit. **38**, 15-18.

- RAO, U.R., CHANDRASHEKAR, R., PARAB, P.B., RAJASEKARIAH, G.R., SUBRAMANYAM, D. (1987b).  
Lectin-binding characteristics of *Wuchereria bancrofti* microfilariae.  
*Acta trop.* **44**, 35-42.
- ROGERS, R., DENHAM, D.A. (1974).  
Studies with *Brugia pahangi*. 7. Changes of the lymphatics of injected cats.  
*Journal of Helminthology* **48**, 213-219.
- ROGERS, R., DENHAM, D.A., NELSON, G.S., GUY, F., PONNUDURAI, T. (1975a).  
Studies with *Brugia pahangi*. 3. Histological changes in the affected lymph nodes of infected cats.  
*Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **69**, 77-84.
- ROGERS, R., DAVIS, R., DENHAM, D.A. (1975b).  
*Journal of Helminthology* **49**, 31-32.
- ROGERS, R., ELLIS, D.S., DENHAM, D.A. (1976).  
Studies with *Brugia pahangi*. 14. Intrauterine development of the microfilaria and in comparison with other filarial species.  
*Journal of Helminthology* **50**, 251-257.
- SÄNGER, I., LÄMMLER, G. (1979).  
On *Dipetalonema viteae* infection of *Mastomys natalensis*.  
*Trop. Med. Parasit.* **30**, 81-87.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989).  
*Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, second edition, 3 volumes.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977).  
DNA sequencing with chain termination inhibitors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- SASA, M. (1976).  
*Human Filariasis. A Global Survey of Epidemiology and Control*.  
Baltimore: University Park Press.
- SAYERS, G., MACKENZIE, C.D., DENHAM, D.A. (1984).  
Biochemical surface components of *Brugia pahangi* microfilariae.  
*Parasitology* **89**, 425-434.
- SCHACHER, J.F. (1962).  
Developmental stages of *Brugia pahangi* in the final host.  
*Journal of Parasitology* **48**, 693-706.
- SCHACHER, J.F., SAHYOUN, P.F. (1967).  
A chronological study of the histopathology of filarial disease in cats and dogs caused by *Brugia pahangi* (Buckley and Edeson, 1956).  
*Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **61**, 234-243.
- SCHARES, G. (1992).  
Studien zur Charakterisierung von Immunglobulinen der *Mastomys coucha* und zur Beeinflussung der humoralen Immunreaktion des Versuchstiers auf eine Infektion mit *Litomosoides carinii* durch filarizide Behandlungen.  
Diss. vet. med., Gießen.
- SCHARES, G., SCHÜTZLE, B., ZAHNER, H., CONRATHS, F.J. (1994).  
Surface antigens of *Litomosoides carinii* microfilariae: agglutinating antibodies react with sheath components of 40 and 120 kilo Dalton molecular mass.  
*Parasitology* **109**, 73-82.

- SCHRAERMEYER, U., PETERS, W., ZAHNER, H. (1987a).  
Formation by the uterus of a peripheral layer of the sheath in microfilariae of *Litomosoides carinii* and *Brugia malayi*.  
Parasitology Research **73**, 557-564.
- SCHRAERMEYER, U., PETERS, W., ZAHNER, H. (1987b).  
Lectin binding studies on adult filariae, intrauterine developing stages and microfilariae of *Brugia malayi* and *Litomosoides carinii*.  
Parasitol. Res. **73**, 550-556.
- SCHÜTZE, H.R., HERZOG, H., LÄMMLER, G. (1970).  
Zur Infektion der Nilratte (*Arvicanthis niloticus* Desmarest, 1822) mit der Baumwollrattenfilarie *Litomosoides carinii*.  
Z. Parasitenkd. **34**, 95-96.
- SCHÜTZLE, B. (1994).  
Charakterisierung von Antigenen der Mikrofilarienscheiden von *Litomosoides carinii* mittels polyklonaler und monoklonaler Antikörper.  
Diss. rer. nat., Gießen.
- SCOTT, J.A. (1946).  
Observations on the rate of growth and maturity of *Litomosoides carinii*, a filarial worm of the cotton rat.  
Journal of Parasitology **32**, 570-573.
- SCOTT, J.A., MACDONALD, E.M., TERMAN, B. (1951).  
A description of the stages in the life cycle of the filarial worm *Litomosoides carinii*.  
Journal of Parasitology **37**, 425-432.
- SELKIRK, M.E., DENHAM, D.A., PARTONO, F., SUTANO, I., MAIZELS, R.M. (1986).  
Molecular characterization of antigens of lymphatic filarial parasites.  
Parasitology **91**, 15-38.
- SELKIRK, M.E., YAZDANKBAKHS, M., FREEDMAN, D., BLAXTER, M.L., COOKSON, E., JENKINS, R.E., WILLIAMS, S.A. (1991).  
A proline rich structural protein of the surface sheath of larval *Brugia* filarial nematode parasites.  
J. Biol. Chem. **266**, 11002-11008.
- SHARP, P.A., SUGDEN, B., SAMBROOK, J. (1973).  
Detektion of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis.  
Biochemistry **12**, 3055 ff.
- SIMPSON, M.G., LAURENCE, R.B. (1972).  
Histochemical studies on microfilariae.  
Parasitology **64**, 61-88.
- SINGH, D., RAGHAVAN, N.G.S. (1962).  
The duration of patent infection of *Litomosoides carinii* in the albino rat.  
Indian J. Malariol. **16**, 193-201.
- SNOWDEN, K.F., HAMMERBERG, B. (1987).  
Dynamics of immune responses related to clinical status in *Brugia pahangi*-infected dogs.  
Am. J. trop. Med. Hyg. **37**, 143-151.
- SNOWDEN, K.F., HAMMERBERG, B. (1989).  
The lymphatic pathology of chronic *Brugia pahangi* infection in the dog.  
Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene **83**, 670-678.

- SOLOVYEV, V. V., SALAMOV, A. A. (1999).  
Infogene: a database of known gene structures and predicted genes and proteins in sequences of genome sequencing projects.  
Nucleic Acids Research **27**, 248-250.
- SOUTHERN, E.M. (1975).  
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.  
J. Mol. Biol. **98**, 503-517.
- SUGURI, S. (1977).  
Ultrastructure of the microfilaria of *Brugia pahangi* (BUCKLEY & EDESON, 1956) BUCKLEY, 1958.  
Acta Med. Okayama **31**, 295-318.
- SUSWILLO, R.R., DENHAM, D.A., MCGREEVY, P.B. (1982).  
The number and distribution of *Brugia pahangi* in cats at different times after primary infection.  
Acta Tropica **39**, 151-156.
- TANNER, M.; WEISS, N. (1978).  
Studies on *Dipetalonema viteae* (Filaroidea). II. Antibody dependent adhesion of peritoneal exudate cells to microfilariae in vitro.  
Acta trop. **35**, 151-160.
- TAYLOR, A.E.R. (1960).  
The spermatogenesis and embryology of *Litomosoides carinii* and *Dirofilaria immitis*.  
Journal of Helminthology **34**, 3-12.
- TERRY, A., TERRY, R.J., WORMS, M.J. (1961).  
*Dipetalonema witei*, filarial parasite of the jird, *Meriones libycus*. II The reproductive system, gametogenesis and development of the microfilaria.  
Journal of Parasitology **47**, 703-711.
- THOMPSON, J.P., CRANDALL, R.B., CRANDALL, C.A., NEILSON, J.T. (1981).  
Microfilaraemia and antibody responses in CBA/N mice following injection of microfilariae of *Brugia malayi*.  
Journal of Parasitology **67**, 728-730.
- TITANJI, V.P.K., NDE, P.N., MBACHAM, W.F. (1992).  
Cell-mediated and monoclonal antibody-dependent killing of *Onchocerca volvulus* microfilariae.  
Scand. J. Immunol., 57-61.
- TOWBIN, H., GORDON, J. (1984).  
Immunoblotting and dot immunobinding – current status and outlook.  
J. Immunol. Methods **72 (2)**, 313-340.
- TRAVASSOS, L. (1919).  
*Filaria carinii* n. sp..  
Rev. Soc. Bras. Sci. **3**, 189-190.
- VAN DELLEN, R.G., OTTESEN, E.A., GOCKE, T.M., NEAFIE, R.C. (1985).  
*Loa loa*. An unusual case of chronic urticaria and angiodema in the United States.  
J. Am. Med. Assoc. **253**, 1924-1925.
- VINCENT, A.L., ASH, L.R., FROMMES, S.P. (1975).  
The ultrastructure of adult *Brugia malayi* (Brug 1927) (Nematoda: Filarioidea).  
Journal of Parasitology **61**, 499-512.
- VOGELSTEIN, B. GILLESPIE, D. (1979)  
Preparative and analytical purification of DNA from agarose.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **76 (2)**, 615-619.

- WAGNER, U. (1998).  
Klonierung und Charakterisierung des stadienspezifisch exprimierten ES-Proteins Juv-p120 aus *Litomosoides sigmodontis* und ähnlicher Sequenzen aus *Brugia malayi*.  
Diss. rer. nat., Gießen.
- WEGERHOF, P. H., LÄMMLER, G., SÄNGER, I., ZAHNER, H. (1979).  
Chemotherapeutic studies on *Litomosoides carinii* infection of *Mastomys natalensis*: 8. The action of furazolidone on adult worms and microfilariae.  
Tropenmed. Parasit. **30**, 376-382.
- WEISS, N., TANNER, M. (1979).  
Studies on *Dipetalonema viteae* (Filarioidea). 3. Antibody-dependent cell-mediated destruction of microfilariae in vivo.  
Tropenmed. Parasitol. **30**, 73-80.
- WENK, P. (1967).  
Der Invasionsweg der metazyklischen Larven von *Litomosoides carinii* Chandler 1931 (Filariidae).  
Zeitschrift für Parasitenkunde **28**, 240-263.
- WENK, P., HEIMBURGER, I. (1967).  
Infektionsversuche mit der Baumwollrattenfilarie *Litomosoides carinii* Chandler 1931 (Filariidae) bei inadäquaten Wirten.  
Z. Parasitenkd. **29**, 282-298.
- WHARTMAN, W.B. (1947).  
Filariasis in American armed forces in World War II.  
Medicine **26**, 334-394.
- WHO Expert Committee on Filariasis. Fifth Report (1992).  
Lymphatic filariasis: the disease and its control.  
Geneva, World Health Organization, (WHO Technical Report Series, No. 821).
- WHO-Veröffentlichung (2002).  
Eliminating Lymphatic Filariasis - Burdens and trends.  
[http://www.who.int/ctd/filariasis/Disease\\_status/burdens.html](http://www.who.int/ctd/filariasis/Disease_status/burdens.html)
- WILLIAMS, R.W., BROWN, H.W. (1946).  
The transmission of *Litomosoides carinii*, filariid parasite of the cotton rat, by the tropical rat mite, *Liponyssus bacoti*.  
Science **103**, 224.
- WILLIAMS, R.W. (1948).  
Studies on the life cycle of *Litomosoides carinii* filariid parasite of the cotton rat, *Sigmodon hispidus litoralis*.  
J. Parasitol. **34**, 24-43.
- WILLIAMS, S.A. et al. (1988).  
Species-specific oligonucleotide probes for the identification of human filarial parasites.  
Molecular and biochemical parasitology **28**, 163-170.
- WILSON, T., RAMACHANDRAN, C.P. (1971).  
*Brugia* infections in man and animals: long term observations on microfilaraemia and estimates of the efficiency of transmission from mosquito vector to definitive host.  
Annals of Tropical Medicine and Parasitology **65**, 525-546.
- WONG, M.M. (1964).  
Studies on microfilaremia in dogs. II. Levels of microfilaremia in relation to immunologic responses of the host.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. **13**, 66-77.

WONG, M.M., GUEST, M.F., LIM, K.C., SIVANANDAM, S. (1977).  
Experimental *Brugia malayi* infections in the Rhesus monkey.  
Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health **8**, 265-273.

ZAHNER, H., HOBOM, G., STIRM, S. (1995).  
The microfilarial sheath and its proteins.  
Parasit. Today **11** (3), 116-119.

ZAHNER, H. & WEGERHOF, P.H. (1985).  
Immunity to *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis*. I. Effect of immunization with microfilariae and existing primary infections on the parasitaemia after microfilariae injection and challenge infection.  
Z. Parasitenk. **71**, 583-593.

ZAMAN, V. (1987).  
Ultrastructure of *Brugia malayi* egg shell and its comparison with microfilarial sheath.  
Parasitology Research **73**, 281-283.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Zahner für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung zur Anfertigung der Dissertation am Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Conraths bedanke ich mich besonders für die freundliche Einführung in das Fachgebiet und die vielen hilfreichen Anregungen. Herrn Dr. J. Hirzmann bin ich für die wertvolle Weiterführung dieser Betreuung und die intensive Durchsicht des Manuskriptes dankbar.

Den weiteren Mitarbeitern des Institutes für Parasitologie bin ich zu Dank verpflichtet, sei es für labortechnische Unterstützung während der Versuchsausführung oder einfachen Anregungen zum weiteren Gelingen der Arbeit.

Für die Hilfe bei der statistischen Datenanalyse bedanke ich mich bei Herrn Dr. K. Failing, Leiter der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung am Fachbereich Veterinärmedizin.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben ganz herzlich bedanken, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, die mich finanziell und tatkräftig unterstützten.