

---

***Schistosoma mansoni:***  
**Tyrosinkinase-Signalwege in den Reproduktionsorganen**  
**und Aktin-Promotoranalysen im Transgenmodell**

---

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
im Fachbereich Biologie und Chemie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Svenja Beckmann  
aus Hilden

März 2008

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Parasitologie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität  
im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ angefertigt.

Dekan des Fachbereiches Biologie und Chemie: Prof. Dr. P. R. Schreiner

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Dorresteijn

Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie, Fachbereich Biologie & Chemie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. C.G. Grevelding

Institut für Parasitologie, Fachbereich Veterinärmedizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht am: 20.03.2008

Disputation am: 20.05.2008

*Die Wissenschaft ist der Verstand der Welt,  
die Kunst ihre Seele.*

[Maxim Gorkij]



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Schistosoma mansoni</i></b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Reproduktionsbiologie von <i>Schistosoma mansoni</i></b>	<b>3</b>
<b>1.3 Signalwege bei der Männchen-Weibchen-Interaktion</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Tyrosinkinasen in <i>Schistosoma mansoni</i></b>	<b>7</b>
1.4.1 Die Bedeutung von Tyrosinkinasen in Signaltransduktions-Kaskaden	7
1.4.2 Zelluläre Tyrosinkinasen in <i>S. mansoni</i>	8
1.4.3 Die Src-Kinasen SmTK3 und SmTK5	9
1.4.4 Die Syk-Kinase SmTK4	11
1.4.5 Die Tyrosinkinase SmTK6	13
1.4.6 Weitere Proteinkinasen in <i>S. mansoni</i>	14
<b>1.4 „Post-Genomics“ in <i>Schistosoma mansoni</i></b>	<b>16</b>
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>21</b>
2.1.1. Puffer und Lösungen	21
2.1.2 Medien und Zusätze	25
2.1.3 Enzyme	27
2.1.4 Molekulargewichtstandards	27
2.1.5 Primer	28
2.1.6 Plasmide und rekombinante Plasmide	32
2.1.7 Bakterien- und Hefestämme	39
2.1.8 Antikörper	40
2.1.9 Genbanken	40
2.1.10 Computersoftware und Internet-Programme	40
<b>2.2 Methoden</b>	<b>41</b>
2.2.1 Laborzyklus von <i>Schistosoma mansoni</i>	41
2.2.1.1 Endwirtinfektion	41
2.2.1.2 Endwirt-Perfusion und <i>in vitro</i> - Haltung adulter Schistosomen	41
2.2.1.3 Gewinnung von Larvenstadien (Miracidien, Cercarien)	42
2.2.1.4 <i>In vitro</i> - Generation von Muttersporocysten	42
2.2.1.5 Schneckenzucht und Zwischenwirtinfektion	43
2.2.2 Arbeiten mit Bakterien	43

2.2.2.1 Glycerin-Stocks von Bakterien _____	43
2.2.2.2 Flüssigkultur von Bakterien _____	43
2.2.3 Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen _____	43
2.2.3.1 Transformation von Bakterien über Hitzeschock _____	44
2.2.4 Blau-Weiß-Selektion von transformierten Bakterien _____	44
2.2.5 Arbeiten mit Hefen _____	45
2.2.5.1 Glycerin-Stocks von Hefen _____	45
2.2.5.2 Flüssigkultur von Hefen _____	45
2.2.6 Transformation von Hefen _____	46
2.2.6.1 Herstellung kompetenter Hefekulturen für die Transformation _____	46
2.2.6.2 Transformation von Hefen – Lithium-Acetat-Methode _____	46
2.2.7 Yeast Two-Hybrid System _____	47
2.2.7.1 Screening einer GAL4-AD-Fusionsprotein-Bank durch Mating _____	49
2.2.7.2 Ermittlung der Mating-Effizienz _____	50
2.2.8 $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay _____	51
2.2.9 $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigkulturassay _____	52
2.2.10 Co-Immunopräzipitation in Hefe _____	53
2.2.11 Isolation und Analyse von Proteinen _____	55
2.2.11.1 Isolation von Proteinen aus Hefen _____	55
2.2.11.2 Präparation von Hefekulturen für die Proteinextraktion _____	55
2.2.11.3 Präparation von Proteinextrakten - Urea/SDS-Methode _____	56
2.2.11.4 Proteinmengenbestimmung nach Bradford _____	57
2.2.11.5 Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) _____	57
2.2.11.6 Färbung von Proteinen in der SDS-PAGE _____	58
2.2.11.7 Western-Blot ( <i>semi-dry</i> Elektroblot) _____	59
2.2.11.8 Immunoblot _____	60
2.2.11.9 INDIA INK - Färbung von Nitrocellulosemembranen _____	61
2.2.12 <i>in vitro</i> - Expression eines Proteins _____	62
2.2.12.1 Aufreinigung eines <i>in vitro</i> - exprimierten Proteins _____	62
2.2.12.2 Elektroelution zur Aufreinigung eines exprimierten Proteins _____	63
2.2.13 Immunoaffinitätsreinigung von Antisera _____	64
2.2.14 Isolation von Nukleinsäuren (DNA und RNA) _____	64
2.2.14.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien _____	64
2.2.14.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefen _____	65

2.2.14.3 Isolation von genomischer DNA aus adulten Schistosomen	66
2.2.14.4 Isolation von RNA und DNA aus adulten Schistosomen	66
2.2.14.5 Isolation von RNA aus Hefen	67
2.2.15 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	67
2.2.16 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	69
2.2.16.1 Agarosegelelektrophorese von DNA	69
2.2.16.2 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA	70
2.2.16.3 Elution von DNA aus Agarosegelen und “reaction clean up”	70
2.2.16.4 Densitometrische Messung von DNA-Signalintensitäten	71
2.2.17 Enzymatische Reaktionen an Nukleinsäuren	71
2.2.17.1 Restriktion von DNA	71
2.2.17.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden	71
2.2.17.3 Ligation	72
2.2.17.4 A-Addition	72
2.2.17.5 <i>Fill in</i> - Reaktion	73
2.2.17.6 Sequenzierung	73
2.2.18 Polymerase-Kettenreaktion	73
2.2.18.1 Kolonie-PCR	74
2.2.18.2 RT-PCR	75
2.2.19 Klonierung von DNA-Fragmenten	76
2.2.20 Transfer von DNA auf Membranen (Southern-Blot)	76
2.2.20.1 Hybridisierung der Membran	77
2.2.20.2 Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde	77
2.2.21 <i>In situ</i> - Hybridisierung	77
2.2.21.1 Fixierung nach Bouin	77
2.2.21.2 Einbettung in Paraffin	78
2.2.21.3 Beschichtung der Objektträger und Deckgläser	78
2.2.21.4 Herstellung von Semidünnschnitten	78
2.2.21.5 <i>In vitro</i> - Transkription	78
2.2.21.6 Transkript-Blot	79
2.2.21.7 Hybridisierung	80
2.2.21.8 Detektion	80
2.2.22 Karminrot-Färbung von <i>S. mansoni</i>	81
2.2.22.1 Fixierung adulter und larvaler Schistosomen	81

2.2.22.2 <i>Whole mount</i> - Färbung mit Karminrot und Einbettung	81
2.2.22.3 Konfokale Lasermikroskopie Karminrot-gefärbter Schistosomen	82
2.2.23 Transformation von <i>S. mansoni</i>	82
2.2.23.1 DNA-Gold-Präparation	82
2.2.23.2 Particle Bombardment adulter und larvaler Schistosomen	83
2.2.23.3 Konfokale Lasermikroskopie zum Nachweis der GFP-Reporter-gen-Aktivität	84
2.2.24 dsRNA-Behandlung adulter <i>S. mansoni</i> zur RNA-Interferenz (RNAi)	85
2.2.24.1 Synthese der dsRNA	85
2.2.24.2 Elektroporation von <i>S. mansoni</i> - Pärchen mit dsRNA	85
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>86</b>
<b>3.1 Co-Immunopräzipitationsexperimente mit SmTK4 und SmTK6</b>	<b>86</b>
3.1.1 Klonierung des pESC-HIS-Konstruktes	87
3.1.2 Transformation in Hefen und Überprüfung der Fusionsprotein-Expression	88
3.1.3 Co-Immunopräzipitation in Hefen	89
<b>3.2 Identifizierung von Bindungspartnern der Src-Kinase SmTK6</b>	<b>91</b>
3.2.1 Klonierung des <i>bait</i> -Konstruktes TK6-SH2 + TK3-TK pBridge	91
3.2.2 Überprüfung der Funktionalität des <i>bait</i> -Konstruktes TK6-SH2 + TK3-TK	93
3.2.3 Yeast Three-Hybrid Screening mit dem <i>bait</i> -Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK	94
3.2.3.1 Mating mit der <i>S. mansoni</i> Yeast Two-Hybrid Bank	95
3.2.3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Kolonie-Filterassay	95
3.2.3.3 Identifizierung der putativen <i>upstream</i> -Bindungspartner von SmTK6	97
3.2.3.4 Verifizierung der Interaktion	99
3.2.3.5 Quantifizierung der Interaktion	99
<b>3.3 Identifizierung von Bindungspartnern der Syk-Kinase SmTK4</b>	<b>100</b>
3.3.1 Klonierung der <i>bait</i> -Konstrukte TK4-bait1 und TK4-bait2 pBridge	100
3.3.2 Überprüfung der Funktionalität der <i>bait</i> -Konstrukte TK4-bait1, TK4-bait2	101
3.3.3 Yeast Three-Hybrid Screening mit den <i>bait</i> -Konstrukten TK4-bait1, TK4-bait2	103
3.3.3.1 Mating mit der <i>S. mansoni</i> Yeast Two-Hybrid Bank	103
3.3.3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Kolonie-Filterassay	104
3.3.3.3 Identifizierung der putativen <i>downstream</i> -Bindungspartner von SmTK4	105
3.3.3.4 Verifizierung der Interaktion	106
3.3.3.5 Quantifizierung der Interaktion	106
<b>3.4 Interaktion von SmTK4 mit SmTK3 bzw. SmTK6</b>	<b>108</b>
<b>3.5 Interaktion von SmRTK1 mit SmTK4, SmTK3 bzw. SmTK6</b>	<b>109</b>

<b>3.6 Integrin-Rezeptoren in <i>S. mansoni</i></b>	<b>114</b>
3.6.1 $\beta$ -Integrin-Rezeptoren in <i>S. mansoni</i>	114
3.6.1.1 Identifizierung und Klonierung eines $\beta$ -Integrin1-Rezeptors	114
3.6.1.2 Genomische Struktur des Sm $\beta$ -Int1-Gens	116
3.6.1.3 Bestimmung der genomischen Kopienzahl des Sm $\beta$ -Int1-Gens	117
3.6.1.4 Charakterisierung von Sm $\beta$ -Int1	119
3.6.1.4.1 Analyse der stadien- und geschlechtsspezifischen Transkription von Sm $\beta$ -Int1	119
3.6.1.4.2 <i>In situ</i> - Hybridisierung zur Lokalisation der Transkription von Sm $\beta$ -Int1	121
3.6.1.5 Interaktionsstudien von Sm $\beta$ -Int1 mit SmTK4	123
3.6.1.6 Interaktion von Sm $\beta$ -Int1 mit SmTK3 bzw. SmTK6	125
3.6.2 $\alpha$ -Integrin-Rezeptoren in <i>S. mansoni</i>	128
3.6.2.1 Identifizierung und Klonierung eines $\alpha$ -Integrin1-Rezeptors	128
3.6.2.2 Genomische Struktur des Sm $\alpha$ -Int1-Gens	130
3.6.2.3 Charakterisierung von Sm $\alpha$ -Int1	131
3.6.2.3.1 Analyse der stadien- und geschlechtsspezifischen Transkription von Sm $\alpha$ -Int1	131
3.6.2.3.2 <i>In situ</i> - Hybridisierung zur Lokalisation der Transkription von Sm $\alpha$ -Int1	132
<b>3.7 Die Syk-Kinase SmTK4 und ihre Interaktionspartner</b>	<b>135</b>
<b>3.8 Versuche zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen SmTK4</b>	<b>137</b>
3.8.1 Bakterielle Expression von SmTK4-Subfragmenten	137
3.8.2 Aufreinigung des exprimierten SmTK4-Subfragments	139
3.8.3 Immunisierung mit dem SmTK4-Subfragment	140
3.8.4 Austestung der SmTK4-Antiseren im Western-Blot	140
3.8.5 Bakterielle Expression weiterer SmTK4-Subfragmente	141
3.8.6 Vergleichende Analyse der <i>codon usages</i> von <i>S. mansoni</i> und <i>E. coli</i>	142
<b>3.9 Versuche zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen SmTK6</b>	<b>146</b>
3.9.1 Bakterielle Expression der SmTK6- <i>unique site</i>	146
3.9.2 Aufreinigung der exprimierten SmTK6- <i>unique site</i>	147
<b>3.10 Analyse der genomischen Sequenzen der SmTK4- und SmTK6-Gene</b>	<b>147</b>
3.10.1 Genomische Struktur des SmTK4-Gens	147
3.10.2 <i>In silico</i> - Sequenzanalyse der 5'-Region des SmTK4-Gens	148
3.10.3 Genomische Struktur des SmTK6-Gens	150

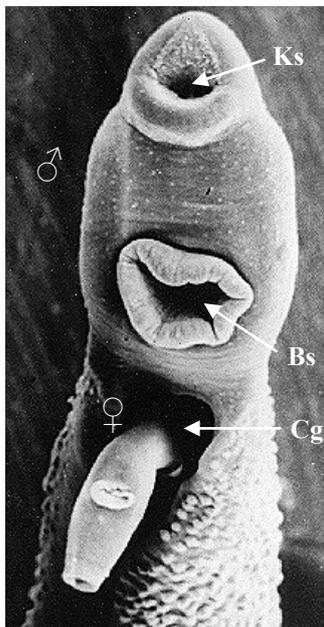
<b>3.11 Morphologie der Reproduktionsorgane von <i>S. mansoni</i> - Pärchen</b>	<b>151</b>
<b>3.12 Einfluss des Syk-Kinase Inhibitors Piceatannol auf adulte <i>S. mansoni</i></b>	<b>155</b>
3.12.1 <i>In vitro</i> - Behandlung von Schistosomen mit Piceatannol	156
3.12.2 Einfluss von Piceatannol auf gepaarte und entpaarte <i>S. mansoni</i> -Männchen	156
3.12.3 Einfluss von Piceatannol auf gepaarte und entpaarte <i>S. mansoni</i> -Weibchen	159
<b>3.13 RNAi zur Inhibition von SmTK4</b>	<b>164</b>
3.13.1 <i>In vitro</i> - Behandlung von Schistosomen-Pärchen mit TK4-dsRNA	164
3.13.2 Molekulare und mikroskopische Analyse TK4-dsRNA-behandelter Pärchen	165
<b>3.14 Transgene Schistosomen - Analyse des SmAct1-Promotors</b>	<b>168</b>
3.14.1 Identifizierung und Klonierung der regulatorischen Regionen des SmAct1-Gens	168
3.14.2 Sequenzanalyse der 5'-Region des SmAct1-Gens	170
3.14.3 Klonierung der SmAct1-Transformationsvektoren	171
3.14.4 Particle Bombardment adulter und larvaler Schistosomen	172
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>176</b>
<b>4.1 Aufklärung der SmTK4-Signalkaskade</b>	<b>176</b>
4.1.1 Verifizierung der Interaktion zwischen SmTK4 und SmTK6	177
4.1.2 Identifizierung von <i>upstream</i> - SmTK6-Interaktionspartnern	178
4.1.2.1 Ein Mucin-Homolog als Interaktionspartner von SmTK6	179
4.1.2.2 Die Src-Kinase SmTK3 als Interaktionspartner von SmTK6	183
4.1.2.3 Weitere Bindungspartner von SmTK6	183
4.1.3 SmTK4, SmTK6 und SmTK3 - Bestandteile eines Kinasekomplexes?	184
4.1.4 Identifizierung von <i>downstream</i> - SmTK4-Interaktionspartnern	186
4.1.4.1 Ein HSP-Homolog als Bindungspartner von SmTK4	186
4.1.4.2 Weitere Bindungspartner von SmTK4	187
4.1.4.3 Limitation der Identifizierung von <i>downstream</i> - SmTK4-Interaktionspartnern	189
<b>4.2 SmRTK1 und Integrine als <i>upstream</i>-Interaktionspartner</b>	<b>190</b>
4.2.1 Interaktionen zwischen SmRTK1 und SmTK4, SmTK6 sowie SmTK3	191
4.2.2 Identifizierung und erste Charakterisierung der $\alpha$ - und $\beta$ -Integrin-Rezeptoren	193
4.2.3 Interaktionen von Sm $\beta$ -Int1 und SmTK4, SmTK6 sowie SmTK3	196
<b>4.3 Modell der SmTK4-Signalkaskade</b>	<b>202</b>
<b>4.4 Versuche zur Herstellung von Antikörpern gegen SmTK4 und SmTK6</b>	<b>205</b>
<b>4.5 Analyse der genomischen Sequenzen der SmTK4- und SmTK6-Gene</b>	<b>207</b>
<b>4.6 Funktionelle Analysen von SmTK4: Inhibitorstudien und RNAi</b>	<b>211</b>

4.6.1 SmTK4-Inhibition durch den Syk-Kinase-Inhibitor Piceatannol _____	214
4.6.2 SmTK4-Supprimierung über RNAi _____	218
4.6.3 Zukünftige Experimente zur Aufklärung der SmTK4-Signalkaskade _____	221
<b>4.7 Ausblick _____</b>	<b>222</b>
<b>4.8 Transgene Schistosomen - Analyse des SmAct1-Promotors _____</b>	<b>223</b>
4.8.1 Promotorelemente in der SmAct1-5'-Region _____	223
4.8.2 Transformationsexperimente mit verschiedenen Varianten der SmAct1-5'-Region _____	226
<b>5. ANHANG _____</b>	<b>230</b>
<b>5.1 Partielle cDNA-Sequenzen der <i>prey</i>-Plasmide aus den TK6-<i>upstream</i></b>	
<b>Yeast Two-Hybrid Screenings _____</b>	<b>230</b>
5.1.1 Screening 1 mit dem <i>bait</i> -Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK pBridge _____	230
5.1.2 Screening 2 mit dem <i>bait</i> -Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK pBridge _____	231
<b>5.2 Partielle cDNA-Sequenzen der <i>prey</i>-Plasmide aus den TK4-<i>downstream</i></b>	
<b>Yeast Two-Hybrid Screenings _____</b>	<b>237</b>
5.2.1 Screening mit dem <i>bait</i> -Konstrukt TK4-bait1 pBridge _____	237
5.2.2 Screening mit dem <i>bait</i> -Konstrukt TK4-bait2 pBridge _____	238
<b>5.3 cDNA- und Aminosäuresequenzen von Sm<math>\beta</math>-Int1 _____</b>	<b>242</b>
<b>5.4 cDNA- und Aminosäuresequenzen von Sm<math>\alpha</math>-Int1 _____</b>	<b>244</b>
<b>5.5 <i>In silico</i> - Analyse der 5'-Region des SmTK4-Gens _____</b>	<b>248</b>
<b>5.6 <i>In silico</i> - Analyse der 5'-Region des SmAct1-Gens _____</b>	<b>250</b>
<b>5.7 cDNA- und Aminosäuresequenzen des Mucin-Homologs aus <i>S. mansoni</i> _____</b>	<b>252</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG _____</b>	<b>260</b>
<b>ABSTRACT _____</b>	<b>262</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS _____</b>	<b>264</b>
<b>8. ABKÜRZUNGEN &amp; EINHEITEN _____</b>	<b>284</b>
<b>8.1 Allgemeine Abkürzungen _____</b>	<b>284</b>
<b>8.2 Einheiten _____</b>	<b>285</b>
<b>8.3 Aminosäuren _____</b>	<b>286</b>
<b>ABBILDUNGS- &amp; TABELLENVERZEICHNIS _____</b>	<b>287</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG _____</b>	<b>291</b>
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN &amp; STIPENDIEN _____</b>	<b>292</b>
<b>DANKSAGUNG _____</b>	<b>294</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 *Schistosoma mansoni*

Der humanpathogene Wurmparasit *Schistosoma mansoni* und andere Mitglieder der Familie der Schistosomatidae sind die einzigen Vertreter der Trematoden, die getrennte Geschlechter entwickelt haben. Die adulten Entwicklungsstadien zeigen einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus (Abbildung 1.1). *Schistosoma mansoni* durchläuft einen komplexen Lebenszyklus mit einem obligaten Wirts- und Generationswechsel sowie zwei frei



**Abbildung 1.1:** Adulte *S. mansoni*

Das Weibchen liegt bei der Paarung im *Canalis gynaecophorus* (Cg) des Männchens. [Bs: Bauchsaugnapf, Ks: Kopfsaugnapf]

lebenden Larvenstadien. Die Infektion eines Vertebraten als Endwirt erfolgt im Wasser durch die Penetration der Gabelschwanzlarven (Cercarien) in die Haut. Im Wirt folgt die Transformation der Cercarienköpfe zu Schistosomulae, die in Kapillaren und Lymphgefäße eindringen, die Lunge und das Herz passieren und schließlich als adulte Würmer das Pfortadersystem der Leber erreichen. Hier kommt es zur Paarung der Adulten. Mit dem Blutstrom gelangen die Pärchen in die Mesenterien des Darms, wo die Weibchen pro Tag rund 300 nicht-embryonierte Eier ablegen. Diese durchbrechen durch die Sekretion lytischer Enzyme die Wand der Venen und gelangen in das intestinale Lumen des Wirtes. Während ihrer Migration, die mehrere Tage bis zu Wochen dauern kann, entwickelt sich im Ei die multizelluläre Wimpernlarve (Miracidium). Eier, die in das

Darmlumen gelangen, werden mit dem Fäzes des Endwirtes ausgeschieden. Infolge eines Wasserkontaktes und Lichtreizes schlüpfen die mit einem Wimpernepithel ausgestatteten Miracidien aus den Eiern und suchen aktiv Süßwasserschnecken als Invertebraten-Zwischenwirte auf, im Falle von *S. mansoni* solche der Gattung *Biomphalaria*. Nach der aktiven Penetration in die Schnecke wandeln sich die Miracidien zu Muttersporocysten um. Im Inneren jeder Muttersporocyste kommt es zur asexuellen Vermehrung durch mitotische Teilungen, aus denen eine Vielzahl von Tochtorsporocysten entstehen. Aus diesen entwickeln sich schließlich die Cercarien, die die Schnecke aufgrund phototaktischer Reize verlassen und über das Wasser in die Nähe eines Endwirtes gelangen.

Von den rund 300 Eiern, die pro Tag pro Schistosomen-Weibchen abgelegt werden, gelangen etwa 50 - 60% in das Darmlumen und werden ausgeschieden (Chitsulo et al., 2000). Das Durchbrechen der Darmwand verursacht massive Schäden, was unmittelbar mit einem Blutverlust einhergehen kann und mittelfristig zu schwerwiegenden Vernarbungen führt, die ihrerseits die Organfunktionen beeinträchtigen. Die im Endwirt verbleibenden Eier werden mit dem Blutstrom in andere innere Organe, hauptsächlich in die Milz und Leber, geschwemmt, wo sie mit ihrem Seitenstachel in den kleinen Gefäßen stecken bleiben. Durch die von den Miracidien produzierten und durch die Eischale freigesetzten Antigene kommt es zu Entzündungsprozessen und zur Bildung der typischen Schistosomen-Granulome. Nach dem Absterben der Eier bilden sich die Granulome zurück und werden durch Bindegewebe ersetzt. Es kommt zur dauerhaften Fibrosierung der parenchymatischen Gewebe, was bezüglich der Leber in schweren Fällen zu einer Hepatosplenomegalie und zur Leberzirrhose führt (Mehlhorn & Piekarski, 1998). Diese durch Schistosomen ausgelöste Krankheit, die Schistosomiasis oder Bilharziose genannt wird, ist nach der Malaria die zweithäufigste durch einen Parasiten verursachte Tropenkrankheit (Savioli et al., 1997; Engels et al., 2002). Nach Schätzungen der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO/TDR, 2004) ist die Schistosomiasis in 77 Ländern dokumentiert (tropische und subtropische Gebiete im mittleren und südlichen Afrika, Südamerika, Süd-Ost-Asien und vorderer Orient), mit endemischen Gebieten, die Heimat von rund 600 Millionen Menschen sind. Über 200 Millionen Menschen sind infiziert, 10% von ihnen zeigen Krankheitssymptome (Chitsulo et al., 2000; Ross et al., 2002; Engels et al., 2002). Mit 85% lebt der Großteil der infizierten Menschen südlich der Sahara, wo die Anzahl an Toten durch Schistosomiasis auf 200.000 pro Jahr geschätzt wird (Engels et al., 2002). Aufgrund ihrer weltweiten Verbreitung sind Schistosomen von großer medizinischer, aber auch ökonomischer Bedeutung, da es neben den für Menschen relevanten Arten noch weitere gibt, die Haus- und Hoftiere befallen (Quack et al., 2006).

Mittel der Wahl zur Bekämpfung der Schistosomen ist das Chemotherapeutikum Praziquantel<sup>®</sup>, das jedoch nur gegen die Adulten wirkt. Durch die häufigen Reinfektionen in endemischen Gebieten ist eine wiederholte Behandlung notwendig, die aufgrund der starken Nebenwirkungen und der hohen Kosten schwierig ist. Ein zunehmendes Problem ist das Auftreten Praziquantel<sup>®</sup>-resistenter Schistosomen-Stämme (Bennett et al., 1997; Doenhoff et al., 2002; Cioli & Pica-Mattoccia, 2003). Mit Oxamniquine steht ein weiteres Mittel zur Verfügung, das jedoch nur gegen *S. mansoni* wirkt. Auch hier wurden bereits erste Resistenzen beschrieben (Cioli et al., 1993; Pica-Mattoccia et al., 1997; Mayer & Fried, 2002). Zusammen mit der Tatsache, dass derzeit noch keine wirksame Vakzine gegen

Schistosomen zur Verfügung steht (Bergquist et al., 2002), unterstreicht dies die Bedeutung alternativer Ansatzpunkte für eine Kontrolle der Schistosomiasis. Im Rahmen der Grundlagenforschung zur Bekämpfung parasitärer Erkrankungen wurde von der WHO daher ein Genomprojekt für Schistosomen (WHO/UNPD/World Bank *Schistosoma* Genome Network) initiiert und finanziell unterstützt als auch durch industrielle Initiativen (TIGR, Sanger) realisiert, die sich zum Ziel gesetzt haben, das Genom vollständig zu entschlüsseln. Durch die Aufklärung des *S. mansoni*-Transkriptoms mittels EST (*Expressed Sequence Tag*)-Analysen (Merrick et al., 2003; Verjovski-Almeida et al., 2003) wurden neben Genomdaten auch Erkenntnisse zum Transkriptom dieses Parasiten erhalten. Die gewonnenen Daten eröffnen neue Wege in der Identifizierung interessanter Gene, deren Proteinprodukte wiederum potentielle Ziele für Vakzinierungsstrategien oder für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika darstellen, und somit zu einer Kontrolle der parasitären Erkrankung beitragen können (Rollinson & Blackwell, 1999).

## **1.2 Die Reproduktionsbiologie von *Schistosoma mansoni***

Neben ihrer weltweiten medizinischen Bedeutung zeigen Schistosomen biologische Besonderheiten. Durch ihre Zweigeschlechtlichkeit unterscheiden sie sich von den sonst zwittrigen Mitgliedern der Trematoden. Die Adulten befinden sich in einem oft lebenslangen Paarungskontakt, bei dem das kürzere, muskulösere Männchen das längere, schlankere Weibchen in seiner Bauchfalte, dem sog. *Canalis gynaecophorus* umschließt (Abbildung 1.1). Dieser dauerhafte Paarungskontakt ist eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung der Reproduktionsorgane des Weibchens (Popiel et al., 1984) - ein nahezu einmaliges, biologisches Phänomen. Diese Männchen-induzierte sexuelle Maturation des Weibchens führt zu deutlichen morphologischen und physiologischen Unterschieden zwischen maturen und immaturren Weibchen. Immaturre, also paarungsunerfahrene Weibchen sind kleiner, in ihrer Entwicklung reprimiert und legen keine Eier. Der sexuell immature Status betrifft verschiedene Bereiche des Reproduktionssystems. Das Ovar und das Vitellarium sind nur als undifferenzierte Anlagen vorhanden. Im Gegensatz hierzu sind der Uterus, der Ovidukt und Vitellodukt sowie der Ootyp voll ausgebildet (Erasmus, 1973). Mit der Paarung setzt die Differenzierung des Ovars und des Vitellariums ein. Das Weibchen gewinnt an Größe, und Ei-Produktion sowie Ei-Ablage setzen ein. Durch die Paarung werden im Weibchen mitotische Teilungen sowie Differenzierungsprozesse von Oocyten und Vitellocyten induziert, die bereits im immaturren Status als Vorläuferzellen vorliegen (Kunz, 2001).

Durch klassische Studien wurde gezeigt, dass die Reifung des Weibchens dabei unabhängig ist von Fertilisation oder Spermien-Transfer (Armstrong, 1965; Popiel et al., 1984). Eine bislang jedoch noch ungeklärte Frage ist, ob der männliche Stimulus taktile Reize bei der Umklammerung des Weibchens oder die Ausschüttung chemischer Signale wie zum Beispiel Hormone umfasst, was die derzeit favorisierte Hypothese ist (Kunz, 2001; LoVerde, 2002). Unabhängig von der Art des Signals ist der männliche Stimulus nicht nur notwendig für die Initiation der Reifung des Weibchens sondern ebenfalls für die Aufrechterhaltung ihres maturated Status (Clough, 1981). Nach der Trennung vom Männchen dedifferenzieren die Weibchen in den immaturen Status. Mitogene Aktivität und Differenzierungsprozesse nehmen ab und schließlich stoppt die Ei-Produktion (Popiel et al., 1984). Werden diese Weibchen dann wieder in den Paarungskontakt mit einem Männchen gebracht, wird die normale Reproduktionsaktivität binnen weniger Tage wieder hergestellt.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurde durch verschiedene molekulare Untersuchungen wie RT-PCR-Analysen oder Northern-Blots gezeigt, dass das Männchen bei der Paarung sogar die Expression verschiedener Gene in den Reproduktionsorganen gepaarter Weibchen beeinflusst. Dazu gehören Gene, die für Eischalvorläufer-Proteine wie p14 (Köster et al., 1988) und p19 (Michel et al., 2003), das Eisenspeicher-Protein Ferritin I (Schüssler et al., 1995) und ein Mucin-ähnliches Protein (Menrath et al., 1995) kodieren. Nach der Trennung vom Männchen nimmt die transkriptionelle Aktivität dieser Gene ab und setzt mit der Paarung erneut ein (Chen et al., 1992; Grevelding et al., 1997; Michel et al., 2003).

Bestätigt und ergänzt wurden diese Ergebnisse durch Microarray-Analysen, bei denen das Transkriptom maturated und immaturer Weibchen sowie Männchen verglichen wurde (Fitzpatrick & Hoffmann, 2006). Überraschender Weise zeigten diese Analysen, dass nur 98 Gene in maturated Adulten (64 in Weibchen, 34 in Männchen) stärker transkribiert werden als in immaturen, wohingegen 285 Gene in immaturen Adulten (181 in Weibchen, 104 in Männchen) stärker exprimiert werden. Postuliert wurde, dass es durch den Paarungskontakt mit dem Männchen zu einem *streamlining*, also einer Fokussierung der Gen-Expression im Weibchen hin zur Erythrocyten-Aufnahme und Ei-Produktion, also hin zur Reproduktion, kommt. In Abwesenheit des Männchens erhalten die Weibchen diese Signale nicht und exprimieren daher eine höhere Zahl unterschiedlicher Gene. Im Gegenzug hierzu führt der Paarungskontakt im Männchen zu einer verstärkten Expression von Genen, deren Produkte strukturelle Funktion besitzen (Fitzpatrick & Hoffmann, 2006). Damit wurde auch gezeigt, dass durch die Paarung nicht nur das Expressionsmuster im Weibchen beeinflusst wird, sondern im Gegenzug sich auch die Expression von Genen im Männchen verändert.

### 1.3 Signalwege bei der Männchen-Weibchen-Interaktion

Da die sexuelle Reifung des Weibchens durch den Paarungskontakt mit dem Männchen induziert wird, sind molekulare Kommunikationsprozesse postuliert worden, die vermutlich auch Signaltransduktions-Kaskaden zur Kontrolle von mitotischer Aktivität und Differenzierungsprozessen beinhalten (Schüssler et al., 1997; Kunz, 2001; LoVerde et al., 2004). Bis heute sind über molekulare Ansätze verschiedene Signalmoleküle in *S. mansoni* identifiziert und charakterisiert worden, meist auf der Basis ihrer konservierten Sequenz. Zu den Molekülen, deren Expression in den Reproduktionsorganen des Weibchens lokalisiert werden konnte, gehören eine Rezeptor-Tyrosinkinase (Vicogne et al., 2003), cytoplasmatische Tyrosinkinasen der Src- und Syk-Familie (Kapp et al., 2001; Knobloch et al., 2002b; Kapp et al., 2004), die kleine GTPase Ras (Kampkötter et al., 1999; Osman et al., 1999), Transkriptionsfaktoren der Retinoid-Rezeptor Familie (RXR) (Fantappie et al., 2001) sowie Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen der *transforming growth factor*  $\beta$ -Familie (TGF- $\beta$ ) (Davies et al., 1998; Forrester et al., 2004).

Für die meisten dieser Moleküle wurde eine hohe Übereinstimmung ihrer Sequenz im Vergleich zu Vertebraten-Homologen festgestellt, besonders in den Domänen, die für die katalytische Aktivität oder die Interaktion mit Substraten verantwortlich sind (Knobloch et al., 2002b; Kapp et al., 2004; Vermeire et al., 2005). Die konservierte Funktion einzelner Moleküle wurde gezeigt, indem endogene Signalmoleküle im Zellkultur- oder Hefesystem durch Schistosomen-Homologe ersetzt wurden (Rossi et al., 2002; Osman et al., 2004). Ebenfalls konnten Interaktionen spezifischer Signalmoleküle aus Schistosomen nachgewiesen werden, die bereits von den Homologen aus Vertebraten bekannt waren (Osman et al., 2001; Osman et al., 2004; Osman et al., 2006). Einige, wenn vermutlich auch nicht alle Signalwege, scheinen somit vom Plathelminthen bis zum Vertebraten konserviert zu sein (zusammengefasst in Knobloch et al., 2007).

Der wohl am besten charakterisierte Signalweg in Schistosomen ist der TGF $\beta$ /Smad-Signalweg (LoVerde et al., 2007). Alle essentiellen Bestandteile dieses Signalwegs, wie der TGF $\beta$ -Rezeptor I und II, R-Smad, Co-Smad und FKBP12 sind in Schistosomen identifiziert, kloniert und charakterisiert worden (Davies et al., 1998; Beall et al., 2000; Osman et al., 2001; Knobloch et al., 2004; Osman et al., 2004; Osman et al., 2006; LoVerde et al., 2007). *In vitro* - Studien zeigten, dass SmT $\beta$ R1 an SmT $\beta$ R2 bindet und durch diesen phosphoryliert wird (Osman et al., 2006). Des Weiteren rekrutiert und phosphoryliert SmT $\beta$ R1 SmSmad2 (R-Smad) (Osman et al., 2001), das seinerseits mit SmSmad4 interagiert (Osman et al., 2004).

Die Aktivierung des SmT $\beta$ RI kann durch das Immunophilin SmFKBP12 unterbunden werden, indem dieses an SmT $\beta$ RI bindet und dadurch die Phosphorylierung von SmT $\beta$ RI durch SmT $\beta$ RII verhindert (Knobloch et al., 2004). Der TGF $\beta$ /Smad-Signalweg spielt in Schistosomen möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung des Vitellariums. Die identifizierten Moleküle zeigen eine präferentielle Expression in diesem Organ. Zudem wurde kürzlich durch die Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen mit dem TGF $\beta$ -RI-Kinase-Inhibitor (TRIKI) eine signifikante Reduktion mitotischer Aktivität im Weibchen gezeigt. TRIKI inhibiert vermutlich Proliferationsprozesse im Vitellarium und führt damit letztlich auch zu einer Reduktion der Eiproduktion (Knobloch et al., 2007).

Hinweise auf eine Beteiligung von Tyrosinkinase-Signalwegen wurde durch den Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren gefunden. Der Src-Kinase-spezifische Inhibitor Herbimycin A führte innerhalb von zwei Tagen in der *in vitro* - Kultur zu einer Reduktion mitotischer Aktivität im Weibchen sowie zu einer Reduktion der Eiproduktion um 90% (Knobloch et al., 2006). Im Gegensatz hierzu beeinflusste in diesem Zeitraum der Syk-Kinase-spezifische Inhibitor Piceatannol weder die mitotische Aktivität noch die Eiproduktion (Knobloch et al., 2007). Src-Kinasen scheinen somit u.a. eine wichtige Rolle bei der Vermittlung Männchen-induzierter, Mitose-stimulierender Effekte im Vitellarium zu spielen. Die simultane Behandlung von Pärchen mit Herbimycin A und TRIKI führte zu einer Reduktion mitotischer Aktivität auf einen Level, der unter dem Einfluss jeweils eines der Inhibitoren nicht erreicht wurde (Knobloch et al., 2007). Ein oder mehrere Src-Kinase-beinhaltende Signalwege und TGF $\beta$ -Signalwege agieren somit vermutlich in additiver Weise und beeinflussen mitotische Aktivität sowie Eiproduktion positiv. Zelluläre Tyrosinkinasen verschiedener Klassen, u.a. auch vom Src-Typ, aus *S. mansoni* sind mittlerweile bekannt und charakterisiert (Kapitel 1.4).

Neben einem TGF $\beta$ /Smad- sowie Src-Kinase-Signalwegen gibt es auch Hinweise für einen Rho-Signalweg. Ein Rho-Homolog aus Schistosomen (SmRho) wurde identifiziert und charakterisiert. Eine Bindung von SmRho an ein Diaphanous-Homolog aus *S. mansoni* (SmDRF) wurde im Yeast Two-Hybrid System gezeigt, ebenso eine Interaktion mit einer Src-Kinase (Manuskript in Vorbereitung). SmRho und SmDRF weisen eine Lokalisation der Expression im Vitellarium auf, so dass eine Verbindung zu den Src-Signalwegen und damit eine Beteiligung an der Regulation mitotischer Prozesse im Weibchen anzunehmen ist (Knobloch et al., 2007).

## 1.4 Tyrosinkinassen in *Schistosoma mansoni*

### 1.4.1 Die Bedeutung von Tyrosinkinassen in Signaltransduktions-Kaskaden

In multizellulären Organismen werden alle wichtigen Prozesse wie Wachstum, Entwicklung, Differenzierung und Stoffwechsel über Kommunikationsprozesse zwischen und innerhalb von Zellen gewährleistet. Diese Signalprozesse und die beteiligten Moleküle sind, wie die Forschung an verschiedenen Modellorganismen gezeigt hat, im Tierreich vom initialen Signal bis zum resultierenden Effekt meist hoch konserviert und folgen einem einheitlichen Ablauf. Die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen kann durch den Austausch von Molekülen, über direkte Zell-Zell-Kontakte oder über die elektrochemische Weiterleitung von Reizen über eine Veränderung des Membranpotentials erfolgen. Die wichtigste Form der Zell-Zell-Kommunikation ist jedoch die Verständigung über extrazelluläre Moleküle (Lodish, 2001). Hierbei beginnen Signalwege mit der Ausschüttung eines chemischen Faktors (Hormon, Cytokin, Wachstumsfaktor oder Polysaccharid), der von der gleichen oder einer anderen Zelle über spezifische Oberflächen-Rezeptoren empfangen werden kann. Welcher intrazelluläre Signalweg schließlich eingeschlagen wird, ist abhängig von den Eigenschaften des Signalmoleküls und des passenden Rezeptors, dessen Verfügbarkeit, sowie der Ausstattung der Zelle an intrazellulären Signalproteinen. Lipophile Signale wie verschiedene Hormone können direkt durch die Plasmamembran diffundieren und an intrazelluläre Rezeptoren, wie zum Beispiel Steroidrezeptoren, binden. Diese gelangen in den Zellkern und binden dann ihrerseits direkt an entsprechende regulatorische DNA-Elemente und beeinflussen so die Expression bestimmter Gene. Hydrophile Signalmoleküle hingegen binden meist an den extrazellulären Teil spezifischer Transmembran-Rezeptoren und führen zur Dimerisierung, Oligomerisierung oder Konformationsänderung der Rezeptoren. Die Weiterleitung des Signals erfolgt dann ausgehend von dem intrazellulären Teil des Rezeptors. Dies kann wie im Fall der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren über heterotrimere G-Proteine erfolgen, die über nachgeschaltete Effektoren zur Ausschüttung so genannter *second messenger* wie zum Beispiel cAMP oder IP<sub>3</sub> führen (Lodish, 2001). Diese bewirken strukturelle oder funktionelle Veränderungen in der Zelle, indem sie konzentrationsabhängig die Aktivität bestimmter Enzyme beeinflussen. Hierdurch werden Signalkaskaden ausgelöst, die über eine Reihe verschiedener Signalmoleküle die Genexpression spezifisch beeinflussen. Andere Rezeptoren verfügen über eigene enzymatische Aktivität. Hierzu gehören zum Beispiel Rezeptor-Proteinkinassen. Die Weiterleitung des Signals im Zellinneren erfolgt hier meist über cytoplasmatische Proteinkinassen oder -phosphatasen. Rezeptoren ohne eigene katalytische Aktivität können oftmals nach Ligandenbindung mit cytosolischen

Protein-Tyrosinkinasen interagieren. Da in einer Zelle gleichzeitig eine Vielzahl verschiedener Signalkaskaden ablaufen, sind mehrere Signalwege oftmals über eine Reihe von Molekülen miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig (*crosstalk*).

Eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionsprozessen spielen Protein-Tyrosinkinasen (PTKs), die  $\gamma$ -Phosphatreste von ATP auf Tyrosinreste in Substratproteinen übertragen können (Tatosyan & Mizenina, 2000). Die durch sie vollzogenen Tyrosin-Phosphorylierungen stellen entscheidende Modifikationen innerhalb von Signalkaskaden dar (Hubbard & Till, 2000). Sie resultieren in einer Veränderung der enzymatischen Aktivität des Substratproteins und stellen gleichzeitig Bindestellen für weitere Signalmoleküle dar. Unter den PTKs sind zwei Klassen von Enzymen zusammengefasst: die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und die cytoplasmatischen Tyrosinkinasen (TKs). Beide weisen die für die Übertragung von Phosphatresten verantwortliche, hoch konservierte Tyrosinkinase-Domäne auf (Hubbard & Till, 2000). Die Klasse der TKs wird unterteilt in acht Familien, die sich durch das Vorhandensein und die Anordnung konservierter Domänen voneinander unterscheiden: Abl, Syk/Zap70, Jak, Tec(Btk), Fak, Src, Csk und Fes (Hubbard & Till, 2000).

#### **1.4.2 Zelluläre Tyrosinkinasen in *S. mansoni***

PTKs spielen eine entscheidende Rolle bei Signaltransduktionsprozessen, welche an der Regulation der Zell-Proliferation und Zell-Differenzierung beteiligt sind (Brown & Cooper, 1996). Derartige Prozesse liegen auch der Entwicklung der Reproduktionsorgane des Schistosomen-Weibchens infolge der Paarung zugrunde. In den Arbeitsgruppen von Prof. Kunz und Prof. Grevelding (seinerzeit Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) wurde vor einigen Jahren mit der Identifizierung von Signalwegen begonnen, die bei der sexuellen Maturation des Schistosomen-Weibchens von Bedeutung sind. Bei der Identifizierung beteiligter Signalmoleküle richtete sich der Fokus auf PTKs.

Über einen RT-PCR-basierenden Ansatz mit degenerierten Primern, die gegen hochkonservierte Bereiche der Tyrosinkinase-Domäne gerichtet waren, konnten verschiedene cytoplasmatische Tyrosinkinasen aus *S. mansoni* (SmTK3, SmTK4 und SmTK5) identifiziert werden. SmTK3 und SmTK5 gehören zur Superfamilie der Src-ähnlichen Kinasen (Kapp et al., 2001; Kapp et al., 2004). Diese ist die größte Familie der cytoplasmatischen Tyrosinkinasen. Ihre Mitglieder agieren in einer Reihe verschiedener Signalwege bei der Zell-Proliferation, Cytoskelett-Organisation und T- sowie B-Zell-Aktivierung. Sie spielen eine Rolle in Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalwegen, die durch Wachstumsfaktoren initiiert werden, wie auch in Integrin-vermittelten Signalwegen (Hubbard & Till, 2000; Bromann et al., 2004).

Die Aktivierung von Src-Kinasen kann ihrerseits zur Rekrutierung weiterer TKs führen, wie zum Beispiel von weiteren Src-Kinasen, *focal adhesion* Kinasen (FAK) oder Syk-Kinasen (Hubbard & Till, 2000). SmTK4 gehört zur Familie der Syk-Tyrosinkinasen (Knobloch et al., 2002b), deren Mitglieder ebenfalls an Integrin-Rezeptor-vermittelten Signalwegen beteiligt sind (Woodside et al., 2001). Diese Signalkaskaden regulieren diverse zelluläre Prozesse im Zusammenhang mit Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion, spielen aber auch eine definierte Rolle in der Reproduktion (Miller et al., 1999; Shinohara et al., 1999).

### 1.4.3 Die Src-Kinasen SmTK3 und SmTK5

Die Tyrosinkinase SmTK3 besitzt einen für Src-Kinasen charakteristischen Aufbau, eine N-terminalen SH4-, eine SH3- und eine SH2-Domäne (Src-Homologie-Domänen), sowie eine C-terminale, katalytisch aktive Tyrosinkinase-Domäne (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2:** Struktur der Tyrosinkinase SmTK3

Schematisches Modell der Src-ähnlichen Tyrosinkinase SmTK3 (nicht maßstabsgetreu). Die konservierten Domänen sind als farbige Boxen dargestellt. SH4-Domäne: AS 1 - 12, SH3-Domäne: AS 159 - 212, SH2-Domäne: AS 221 - 320, TK-Domäne: AS 348 - 592. [SH2 - 4: Src-Homologie-Domänen 2 - 4; TK: Tyrosinkinase-Domäne; N: N-Terminus; C: C-Terminus; *unique site*: nicht-konservierter Bereich der Src-Kinase]

Die SH4-Domäne von SmTK3 wird von einem Glycin an Position 2, eingebettet in einer konservierten Konsensussequenz, gebildet, das Zielpunkt für posttranslationale Modifikationen wie Myristylierungen ist (Resh, 1994). Diese ermöglichen die Anlagerung des Moleküls an die Plasmamembran und bringen damit SmTK3 in die räumliche Nähe von Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die SH3- und die SH2-Domänen von Src-Kinasen sind für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich. Die SH3-Domäne kann im Zuge der Signalweiterleitung an Prolin-reiche Regionen von Proteinen binden, die *downstream* in einer Signalkaskade agieren (Boggon & Eck, 2004). Die SH2-Domäne ist zur Bindung an phosphorylierte Tyrosine *upstream* agierender Proteine befähigt und dient oftmals als Verbindung zwischen der zellulären Tyrosinkinase und einem Rezeptor (Boggon & Eck, 2004). Darüber hinaus spielt die SH2-Domäne eine Rolle bei der Autoregulation von

Src-Kinasen (s.u.). Die zwischen der SH4- und SH3-Domäne gelegene *unique site* ist ein nicht-konservierter Bereich, der für jede Tyrosinkinase der Src-Familie spezifisch ist und der vermutlich eine Rolle bei der Interaktion von Src-Kinasen mit Zielproteinen spielt (Thomas & Brugge, 1997). Die Tyrosinkinase-Domäne (TK) ist die katalytisch aktive Domäne von Src-Kinasen, die Tyrosinreste in Substratproteinen phosphorylieren kann und damit an der Weiterleitung eines Signals in der Zelle beteiligt ist (Tatosyan & Mizenina, 2000). Dass es sich bei SmTK3 um eine katalytisch aktive Src-Kinase handelt, konnte durch die Tyrosin-Phosphorylierung des Src-Substrates p130Cas nach Überexpression in eukaryotischen Zellen gezeigt werden (Kapp et al., 2004). Voraussetzung für die Phosphorylierung anderer Proteine ist eine Aktivierung, die bei Src-Kinasen zwei Stufen umfasst: die Steigerung der intrinsischen enzymatischen Aktivität und die Bildung von Bindestellen für weiter *downstream* im Signalweg agierende Moleküle. Die Aktivierung einer Src-Kinase beinhaltet eine durch Phosphorylierung ausgelöste Konformationsänderung des Moleküls. Im inaktiven Zustand kommt es zu einer intramolekularen Bindung zwischen einem konservierten, phosphorylierten Tyrosinrest im C-Terminus (Tyr<sup>527</sup>) und der SH2-Domäne sowie zu einer Bindung zwischen dem Kinase-Linker (Abschnitt zwischen der SH2- und TK-Domäne) und der SH3-Domäne. Eine Src-Kinase liegt in diesem Zustand in einer geschlossenen, inaktiven Form vor. Infolge einer Rezeptoraktivierung kommt es zu Konformationsänderungen im Molekül, die zu dessen Aktivierung führen (Brown & Cooper, 1996). Die Src-Kinase nimmt eine offene, aktive Konformation an, die die Phosphorylierung eines konservierten Tyrosinrestes in der TK-Domäne (Tyr<sup>416</sup>) erlaubt. Das ist Voraussetzung für eine Substratphosphorylierung (Brown & Cooper, 1996). Auch SmTK3 ist zu dieser Autophosphorylierung befähigt, wie nach Überexpression in eukaryotischen Zellen gezeigt worden ist (Kapp et al., 2004).

*In situ* - Hybridisierungen und Immunlokalisationsstudien zeigten, dass SmTK3 im Parenchym beider Geschlechter, im Vitellarium und Ovar des Weibchens, sowie in den Testes des Männchens exprimiert wird (Kapp et al., 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass SmTK3 neben Funktionen im Parenchym zusätzliche Funktionen in den Gonaden erfüllt, die möglicherweise für deren Entwicklung von Bedeutung sind.

SmTK5 ist eine weitere zelluläre Tyrosinkinase aus *S. mansoni*, die dem Src-/Fyn-Typ zugeordnet wurde (Kapp et al., 2001). SmTK5 weist Übereinstimmungen in konservierten Bereichen oder Aminosäuren mit Src-Kinasen und Fyn-Kinasen auf, zeigt zu beiden jedoch aber auch Unterschiede, vor allem in der Länge und der Struktur der Domänen. Zusätzlich weist SmTK5 verlängerte N-terminale und C-terminale Regionen auf. Die Membran-

anlagerung von SmTK5 ist fraglich. Zwar tritt an der Aminosäureposition 2 ein Glycin auf, dieses liegt jedoch nicht in der für eine SH4-Domäne typischen Konsensus-Sequenz (Kapp et al., 2001). Die SH2- und die SH3-Domänen entsprechen in ihren Längen denen anderer Src-Kinasen, weisen aber auch Unterschiede in konservierten Aminosäureresten auf. Besonders in der *unique site* liegen verschiedene Aminosäurereste, durch die SmTK5 Ähnlichkeit zu Fyn-Kinasen besitzt.

SmTK5 wird in larvalen und adulten Schistosomen exprimiert. In Adulten ist eine ubiquitäre Expression über *in situ* - Hybridisierungen in den Gonaden (Vitellarium, Ovar, Testes), im Parenchym, Subtegument und in der Gastrodermis beider Geschlechter, nicht aber im Tegument und den Muskeln nachgewiesen worden (Knobloch, 2002; Knobloch et al., 2002b).

#### 1.4.4 Die Syk-Kinase SmTK4

Datenbankanalysen und phylogenetischen Untersuchungen zur Folge gehört SmTK4 zur Syk-Familie zellulärer Tyrosinkinase (Knobloch et al., 2002b). Sie besitzt den für Syk-Kinasen charakteristischen Aufbau aus zwei N-terminalen, tandemartig angeordneten SH2-Domänen und einer C-terminalen Tyrosinkinase-Domäne (Abbildung 1.3). SmTK4 weist jedoch signifikante Unterschiede zu Syk-Kinasen anderer Organismen auf. So ist SmTK4 mehr als doppelt so lang wie vergleichbare Moleküle, was an einer ungewöhnlich langen *linker*-Region zwischen der C-terminalen SH2-Domäne und der TK-Domäne sowie an einem verlängerten C-Terminus liegt (Knobloch et al., 2002b).



**Abbildung 1.3:** Struktur der Tyrosinkinase SmTK4

Schematisches Modell der Syk-ähnlichen Tyrosinkinase SmTK4 (nicht maßstabsgetreu). Die konservierten Domänen sind als farbige Boxen dargestellt. SH2-Domänen: AS 48 - 143 und 201 - 292, TK-Domäne: AS 881 - 1147. [SH2: Src-Homologie-Domäne 2; TK: Tyrosinkinase-Domäne; N: N-Terminus; C: C-Terminus; *linker*: Bereich zwischen der C-terminalen SH2-Domäne und der TK-Domäne der Syk-Kinase]

Die TK-Domäne von SmTK4 enthält das konservierte ATP-Bindemotiv, den so genannten *activation loop* mit dem konservierten Tyrosinrest Tyr<sup>416</sup> sowie die für TK-Domänen typischen Signaturen (Knobloch et al., 2002b). Die beiden konservierten

Tyrosinreste im *activation loop* sind essentiell für *downstream* Ereignisse im Signalweg (Zhang et al., 2000). Ein weiterer konservierter Tyrosinrest am C-Terminus ist für intramolekulare Konformationsänderungen einer Syk-Kinase im Zuge der Regulation der enzymatischen Aktivität notwendig. Für Syk-Kinasen mit diesem Tyrosinrest wird ein ähnlicher Regulationsmechanismus postuliert wie für Src-Kinasen (Knobloch et al., 2002b). Die beiden tandemartig angeordneten SH2-Domänen von Vertebraten-Syk-Kinasen dienen der Bindung an ITAMs (*immunreceptor tyrosine-based activation motifs*), die Teile cytoplasmatischer Domänen vieler Rezeptoren sind. Dabei interagiert jede SH2-Domäne mit einem ITAM, was in einer Konformationsänderung des Moleküls verbunden mit einer Steigerung der enzymatischen Aktivität resultiert (Geahlen, 2007). Ausgelöst durch diese Interaktion kommt es zur Autophosphorylierung der Syk-Kinase an Tyrosinresten im *activation loop*. Die Aktivierung der Syk-Kinase wird dabei über eine Tyrosinphosphorylierung durch eine oder mehrere Src-Kinasen gesteigert. Syk-Kinasen werden ebenfalls *downstream* von Rezeptoren aktiviert, die keine ITAMs besitzen, wie zum Beispiel Integrin-Rezeptoren. Der Mechanismus dieser Aktivierung ist Gegenstand aktueller Forschung aber bis heute noch nicht verstanden (Geahlen, 2007). SmTK4 besitzt die für die Interaktion mit ITAMs typischen Sequenzmotive innerhalb der SH2-Domänen nicht, so dass für SmTK4 eine Interaktion mit Rezeptoren ohne ITAMs zu vermuten ist (Knobloch et al., 2002b). Syk-Kinasen liegen in der Zelle cytoplasmatisch vor, ihnen fehlt eine SH4-Domäne und damit eine Membranverankerung. Erst nach der Aktivierung eines entsprechenden Rezeptors werden sie zur Plasmamembran rekrutiert. Diese Rekrutierung wird bei den meisten Syk-Kinasen aus Vertebraten durch eine Src-Kinase bewirkt. Die Phosphorylierung der Syk-Kinase an Tyrosinresten in der *linker*-Region, die die SH2-Domänen von der TK-Domäne trennt, vermittelt ihre Interaktion mit *downstream* - Effektormolekülen, die meist selber Substrate der Syk-Kinase sind (Geahlen, 2007).

Die Expression von SmTK4 konnte in Adulten beider Geschlechter, sowie in beiden frei lebenden Larvenstadien (Miracidien, Cercarien) nachgewiesen werden. Über *in situ* - Hybridisierungen wurde die Expression in den Adulten hauptsächlich im Ovar des Weibchens (Oocyten) und den Testes des Männchens (Spermatocyten) nachgewiesen. Im Gegensatz zu SmTK3 und SmTK5 wird SmTK4 jedoch nicht im Vitellarium des Weibchens exprimiert. Aufgrund der Expression von SmTK4 in Ovar und Testes sowie des Wissens um die Beteiligung von Tyrosinkinase an Proliferations- und Differenzierungsprozessen bei der Gonadenentwicklung, wurde für SmTK4 eine Rolle bei der Gonadendifferenzierung in *S. mansoni* postuliert (Knobloch et al., 2002b). Da SmTK4 jedoch nicht im Vitellarium

exprimiert wird und die Expression paarungsunabhängig ist, ist SmTK4 vermutlich nicht in die initialen Prozesse involviert, welche ausgelöst durch die Paarung zur vollständigen Entwicklung der weiblichen Reproduktionsorgane führen. Vielmehr wird für SmTK4 eine Rolle bei der Differenzierung von Oocyten oder Spermatozyten postuliert, nachdem die Entwicklung der Gonaden bereits abgeschlossen ist. Da SmTK4 auch in manchen Zellen des Parenchyms und Subteguments beider Geschlechter exprimiert wird, werden zusätzliche Funktionen nicht ausgeschlossen (Knobloch et al., 2002b).

#### 1.4.5 Die Tyrosinkinase SmTK6

Die in der vorausgegangenen Diplomarbeit über Yeast Two-Hybrid Analysen als ein *upstream* - Interaktionspartner von SmTK4 identifizierte zelluläre Tyrosinkinase SmTK6 wurde der Src-Familie zugeordnet. Wie typisch für diese Klasse zellulärer Kinasen besitzt auch SmTK6 einen Aufbau aus einer N-terminalen SH3-, einer zentralen SH2- und einer C-terminalen TK-Domäne (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4:** Struktur der Tyrosinkinase SmTK6

Schematisches Modell der Src-ähnlichen Tyrosinkinase SmTK6 (nicht maßstabsgetreu). Die konservierten Domänen sind als farbige Boxen dargestellt. SH3-Domäne: AS 119 - 168, SH2-Domäne: AS 181 - 277, TK-Domäne: AS 305 - 554. [SH2 - 3: Src-Homologie-Domänen 2 - 3; TK: Tyrosinkinase-Domäne; N: N-Terminus; C: C-Terminus]

Im Gegensatz zu der Src-Kinase SmTK3 weist SmTK6 nicht die für eine SH4-Domäne typischen Sequenzmotive am N-Terminus auf, so dass eine Anlagerung an die Membran über Myristylierung nicht möglich ist. Eine Membrananlagerung über die Palmytylierung von Cysteinresten ist jedoch theoretisch möglich, da SmTK6 entsprechende Reste an nahezu konservierter Position besitzt. Die SH3- und SH2-Domänen von SmTK6 weisen die für Src-Kinasen typischen Sequenzmotive auf. Auch die für die Interaktion mit Phosphotyrosinen in Ziel-Proteinen notwendigen Arginin- und Histidin-Reste innerhalb der SH2-Domäne sind an konservierten Positionen vorhanden. Die Tyrosinkinase-Domäne von SmTK6 weist die konservierten Prolin- und Tryptophanreste auf, die diese Kinase als Tyrosin-Kinase kennzeichnen und von Serin/Threonin-Kinasen unterscheiden. SmTK6 besitzt jedoch an der Position 447 anstelle eines Tyrosinrestes wie in anderen Src-Kinasen (Tyr<sup>416</sup>)

einen Serinrest. Ein Tyrosinrest an dieser Position dient bei Src-Kinasen als Autophosphorylierungsstelle, die es der Src-Kinase erlaubt, von anderen Proteinen mit SH2-Domänen erkannt zu werden (Pawson, 1992). Möglicherweise kann bei SmTK6 ein phosphorylierter Serinrest die entsprechende Funktion erfüllen, die eine Interaktion mit SH2-Domänen-tragenden Proteinen ermöglicht. Auch ein weiterer konservierter Tyrosinrest in der katalytischen Domäne von Src-Kinasen (Tyr<sup>527</sup>) tritt bei SmTK6 nicht auf, so dass sich SmTK6 hierdurch von anderen Kinasen dieser Klasse unterscheidet. Im C-terminalen Bereich von SmTK6 fehlen regulatorische Tyrosinreste, die bei anderen Src-Kinasen im phosphorylierten Zustand für den inaktiven Zustand der Src-Kinase verantwortlich sind (Cooper & Howell, 1993). In Abl-Kinasen, die wie Src-Kinasen über eine SH3-, SH2- und TK-Domäne verfügen, sind diese Tyrosinreste ebenfalls nicht vorhanden (Hubbard & Till, 2000). Für diese TK-Klasse ist eine Autoregulation über die Bindung der SH3-Domäne an einen Prolinrest (bei c-Abl an Position 242) im *linker*-Bereich beschrieben (Brasher et al., 2001; Smith et al., 2003). Da in der entsprechenden Region bei SmTK6 auch Prolinreste liegen (Position 282 und 283), wäre eine derartige Regulation für SmTK6 theoretisch möglich. Ferner zeigte eine phylogenetische Analyse der TK-Domäne von SmTK6, dass diese Kinase nicht nur mit Src-Kinasen sondern auch mit Abl-Kinasen verwandt ist (Beckmann, 2005). Jedoch zeigte sich ein markanter Unterschied. Abl-Kinasen besitzen einen verlängerten C-Terminus mit einer DNA- und Aktin-Bindedomäne (Hubbard & Till, 2000), den SmTK6 nicht aufweist. SmTK6 weist somit sowohl Unterschiede als auch Ähnlichkeiten zu Src- und Abl-Tyrosinkinase auf, könnte von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen und eine intermediäre Form darstellen.

SmTK6 wird in Adulten beider Geschlechter sowie in beiden freilebenden Larvenstadien exprimiert. Durch *in situ* - Hybridisierungen konnte die Expression im Ovar des Weibchens und den Testes des Männchens lokalisiert werden (Beckmann, 2005). Diese Lokalisation stimmt mit der Expression von SmTK4 überein, was die im Yeast Two-Hybrid System detektierte Interaktion beider Tyrosinkinase bekräftigt.

#### 1.4.6 Weitere Proteinkinase in *S. mansoni*

Bislang wurden nur wenige Proteinkinase aus *S. mansoni* identifiziert und charakterisiert. Neben den zuvor beschriebenen zellulären Tyrosinkinase SmTK3, SmTK5, SmTK4 und SmTK6 wurden eine weitere Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase (SmFes) und drei Rezeptor-Tyrosinkinase (SmRTK-1, SmIR-1, SER) beschrieben.

SmFes zeigt Charakteristika der Fes/fps-Subfamilie von Protein-Tyrosinkinase. Dazu gehören eine *coiled-coil* Region, eine SH2-Domäne und eine Tyrosinkinase-Domäne. Die N-terminale FCH-Domäne, die bei anderen Fes-Kinasen zu finden ist, fehlt jedoch bei SmFes (Bahia et al., 2006). SmFes wird im Terebratorium von Miracidien exprimiert sowie im Bereich des Kopfsaugnapfes, der Acetabular-Drüsen und im Tegument von Schistosomulae. In Cercarien wurde ein ähnliches Expressionsmuster wie in Schistosomulae beobachtet. Im Zusammenhang mit der Funktion dieser Gewebe wurde für SmFes eine Rolle bei Signalwegen postuliert, die an der Transformation der Larve nach der Penetration in den Zwischen- oder Endwirt beteiligt sind (Bahia et al., 2006).

SmRTK-1 ist ein Transmembranprotein mit einer extrazellulären Domäne, die ein *Venus Flytrap*-Motiv (VFT) trägt, sowie einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne mit Ähnlichkeit zu der katalytischen Domäne des Insulin-Rezeptors (IR). Das VFT-Modul in der extrazellulären Domäne ist ein typisches Merkmal von Pheromonrezeptoren oder pharmakologisch aktivierbaren Ionenkanalrezeptoren wie dem GABA-B-Rezeptor. SmRTK-1 wird in allen Stadien des Lebenszyklus exprimiert. In adulten Männchen wurde die Expression in parenchymatischen Zellen lokalisiert; in adulten Weibchen in Oocyten des Ovars und im Ovidukt (Vicogne et al., 2003). In Sporocysten wurde die Expression von RTK-1 in den Keimzellen nachgewiesen, so dass eine Funktion in Wachstums- und Differenzierungsprozessen postuliert wurde (Vicogne et al., 2003).

SmIR-1 zeigt alle Charakteristika von Insulin-Rezeptoren inklusive einer konservierten Liganden-Bindungs-Domäne. SmIR-1 wird überwiegend in der Basalmembran des Teguments adulter Würmer exprimiert und spielt vermutlich eine Rolle bei der Regulation der Glucoseaufnahme (Dissous et al., 2006).

SER ist ein EGF (*epithelial growth factor*) - Rezeptor mit einer Cystein-reichen extrazellulären Domäne, einer hydrophoben Transmembranregion sowie einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. SER ist sowohl in Cercarien wie auch verstärkt in den Muskeln adulter Würmer zu finden (Ramachandran et al., 1996) und spielt daher eventuell eine Rolle bei der Entwicklung und Funktion der Muskeln. SER scheint durch EGF-Liganden von Vertebraten aktiviert zu werden, was für eine evolutionäre Konservierung des EGFR-Rezeptor vermittelter Signaltransduktionswege spricht (Vicogne et al., 2004).

## 1.4 „Post-Genomics“ in *Schistosoma mansoni*

Die verschiedenen Projekte zur Sequenzierung des Genoms und Transkriptoms von *S. mansoni* ergeben eine Vielzahl von Möglichkeiten post-genomischer Forschungsansätze. Allgemein versteht man darunter verschiedenste Techniken zur funktionellen Erforschung der Gene, welche über die Sequenzierungsprojekte identifiziert wurden.

Nach dem derzeitigen Stand wird das Genom von *S. mansoni* auf 300 Mbp geschätzt. Mit Hilfe verschiedener Algorithmen (Augustus, Twinscan und GlimmerHMM) wurden ca. 17.250 Gene in diesen Sequenzen vorhergesagt (Wilson et al., 2007). Annähernd 55% von diesen besitzen keine Homologie außerhalb der Gattung der Schistosomen. Von den verbleibenden 45% wird geschätzt, dass insgesamt nur etwa 25% funktionelle Homologien aufweisen. Drei von vier Genprodukten in Schistosomen haben somit bislang noch unbekannte Funktionen. Die Sequenzierung des Transkriptoms ergab eine 92%ige Übereinstimmung mit den aus den Genomdaten vorhergesagten Genen. Die derzeitigen Daten lassen darauf schließen, dass rund 7.000 Gene in allen Stadien des Lebenszyklus exprimiert werden, während etwa 1.000 vermutlich Stadien-spezifisch sind (Wilson et al., 2007).

Die Menge an Transkriptom-Daten wird derzeit mit Hilfe von Microarrays analysiert, die ein Massen-Screening von Genexpressions-Mustern ermöglichen. Dabei wird sowohl die geschlechts- wie auch die stadienspezifische Expression der Gene untersucht. Erste Screenings mit Oligonukleotid-Microarrays zeigten 197 geschlechtsspezifisch exprimierte Gene (Fitzpatrick et al., 2005). Ein auf mRNAs aus den Lungenstadien von *S. mansoni* basierender Microarray zeigte im Vergleich mit sechs weiteren Lebenszyklusstadien, dass 281 Gene im Lebenszyklus differentiell reguliert und rund 50 Gene nur im Lungenstadium stark exprimiert werden (Hoffmann et al., 2002). Ein 60mer-Oligonukleotid-Microarray mit 44.000 cDNA-Proben zeigte bei 7% der Gene, die in Adulten exprimiert werden und keine bekannte Funktion und keine Orthologen in anderen Organismen besitzen, eine bidirektionale Transkription. Dies führte zu der Postulierung einer regulatorischen Funktion von *antisense*-Transkripten in Schistosomen (Verjovski-Almeida et al., 2007).

Neben den Daten des Genoms und Transkriptoms ist es ebenfalls möglich, das Proteom der Schistosomen zu untersuchen. Hierunter versteht man die Gesamtheit der Proteine eines Organismus, eines Gewebes, einer Zelle oder eines Zellorganells (Ashton et al., 2001). Die Analyse des Schistosomen-Proteoms erfolgt u.a. über 2D-Gelelektrophoresen, in deren Anschluss interessante Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden (zusammengefasst in van Hellemond et al., 2007). Da die Proteine eine Zelle oder einen Parasiten mit spezifischen Funktionen ausstatten, ist diese Art der differentiellen Analyse dem

Microarray überlegen, da die Detektion einer mRNA nicht gleich zu setzen ist mit dem Vorhandensein des Proteins. Unterschiedliche Studien haben bereits das Proteom verschiedener Lebenszyklusstadien verglichen und gezeigt, dass in den cytosolischen Fraktionen rund 70% der Proteine übereinstimmen (Curwen et al., 2004). Diese Proteine erfüllen daher vermutlich essentielle zelluläre Funktionen in allen Stadien. Andere Studien konzentrierten sich auf Proteom-Vergleiche von Männchen und Weibchen und offenbarten 49 Proteine, die ausschließlich im Weibchen und 52 Proteine, die ausschließlich im Männchen exprimiert werden (Cheng et al., 2005). Ein Teil dieser Proteine konnte identifiziert und hauptsächlich als Signaltransduktions-Moleküle oder Transkriptions-Regulatoren klassifiziert werden. In anderen Ansätzen wurde die Zusammensetzung des Teguments adulter Schistosomen untersucht (van Balkom et al., 2005; Braschi & Wilson, 2006; Braschi et al., 2006; van Hellemond et al., 2006). Hierbei wurden verschiedene Proteine identifiziert, die spezifisch nur im Tegument exprimiert werden. Zudem wurden im Tegument auch verschiedene Wirtsproteine wie Immunglobuline und Komplement-Proteine identifiziert (Braschi & Wilson, 2006), die den Schistosomen möglicherweise helfen, sich vor dem Immunsystem des Wirtes zu schützen.

Ähnliche wie in der Proteomik werden neue Techniken und Ansätze etabliert, das Glycom und das Immunom der Schistosomen zu analysieren. Erste Glycan-Arrays wurden konstruiert (Drickamer & Taylor, 2002). In Zukunft wird es möglich sein, mit dieser Gesamtheit der Glycan-Strukturen die Immunreaktion von Endwirten auf eine Schistosomen-Infektion zu testen, da die Glycan-Epitope oftmals Stimulatoren einer Antikörper-Produktion infolge der Schistosomen-Infektion sind (Eberl et al., 2001). In Kombination mit der Serologie würden die Proteomik und Glycomik bei Schistosomen die Identifizierung von stark immunogenen Oberflächen-Antigenen erlauben (Mutapi et al., 2005; Perez-Sanchez et al., 2006; Hokke et al., 2007).

Für die Erforschung von Schistosomen-Genen, die über die Sequenzierungsprojekte identifiziert worden sind, ist die reverse Genetik ein wichtiger Ansatz. Klassische Ansätze wie Mutagenesen und folgende genetische Analysen sind aufgrund des langen und komplexen Lebenszyklus von Schistosomen sowie der nur begrenzt möglichen *in vitro* - Haltung so gut wie nicht durchführbar. Die Funktionsanalyse identifizierter Gene aus Schistosomen war bislang darauf beschränkt, Sequenzvergleiche mit bekannten Genen anderer Organismen durchzuführen. Um mehr über die Funktion und Steuerung von Genen dieses Parasiten erfahren zu können, sind jedoch Funktionsanalysen im homologen System notwendig. Bislang sind verschiedene Schritte in diese Richtung unternommen worden. Mit Hilfe der

Etablierung eines ballistischen Transformationssystems für *S. mansoni* über Particle Bombardment wurden transiente Transformationen von adulten und larvalen Schistosomen-Stadien bereits erreicht (Wippersteg et al., 2002a; Wippersteg et al., 2002b; Wippersteg et al., 2003). Ein anderer Ansatz zur Etablierung stabiler Transformationen nutzt heterologe, retrovirale Vektoren (Kines et al., 2006; Mann et al., 2007; Morales et al., 2007a). Die Rekonstruktion eines aktiven, retroviralen Vektors aus den im *S. mansoni*-Genom gefundenen Elementen und repetitiven Sequenzen ist ebenfalls denkbar, da dies bei anderen Organismen bereits erfolgreich war, wie im Falle des Retrotransposons *Sleeping Beauty* (Ivics et al., 1997). Die Etablierung einer Transformation, bei der DNA-Sequenzen beispielsweise über die Rekombination homologer Sequenzbereiche, stabil in das Genom eingebaut werden, sowie von Keimbahntransformationen sind Ziele aktueller Forschung, konnten bislang aber noch nicht erreicht werden. Aus diesem Grund sind auch funktionelle Genanalysen über Langzeit-Überexpressionsstudien derzeit noch nicht möglich.

Die transienten Transformationen erlauben es, mit Hilfe von Reportergenkonstrukten Promotoranalysen durchzuführen (Rossi et al., 2003; Wippersteg et al., 2005). Um die Funktion eines Gens jedoch aufzuklären zu können, wäre es notwendig, das Gen funktionell auszuschalten und den daraus resultierenden Phänotyp zu analysieren. Erreichbar wäre dies zum Beispiel durch eine stabile Keimbahntransformation und homologe Rekombination. Diese ist für Schistosomen jedoch noch nicht etabliert. Eine alternative Möglichkeit ist die RNA-Interferenz (RNAi), bei der die Expression eines Gens auf posttranskriptioneller Ebene supprimiert wird. Über das *soaking* oder die Elektroporation von verschiedenen Lebenszyklusstadien konnte ein Protokoll etabliert werden, mit dem dsRNAs oder siRNAs in Schistosomen eingebracht werden können. Erfolgreich angewandt wurde RNAi bei Schistosomen bisher hauptsächlich für Prä-Adultstadien (Schistosomulae) (Skelly et al., 2003; Boyle et al., 2003; Correnti & Pearce, 2004; Correnti et al., 2005; Correnti et al., 2007; Morales et al., 2007b). Erst kürzlich konnte diese Methode auch für Adulte etabliert (Davis et al., 1999; Delcroix et al., 2006; Ndegwa et al., 2007; Krautz-Peterson et al., 2007; Geldhof et al., 2007) und in diesen erfolgreich für tegumental und gastrodermal exprimierte Gene eingesetzt werden (Ndegwa et al., 2007; Krautz-Peterson et al., 2007).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe der Genom- und Transkriptomprojekte sowie über alternative Ansätze konnten in den letzten Jahren verschiedene Signalmoleküle in Schistosomen identifiziert, kloniert und schließlich charakterisiert werden. Einige dieser Moleküle werden in den Reproduktionsorganen des Weibchens und des Männchens exprimiert. Homologe dieser Moleküle sind in anderen Organismen an der Steuerung von Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt, wie sie auch infolge der Paarung in Schistosomen-Weibchen auftreten. Es wird daher vermutet, dass diese in *S. mansoni* identifizierten Signalmoleküle sowohl an den Signaltransduktions-Kaskaden während der Männchen-Weibchen-Interaktion sowie an der vom Männchen induzierten, sexuellen Maturation des Weibchens beteiligt sein könnten.

Nach der Identifizierung dieser Moleküle sollten nun deren Funktionen sowie die Signalwege, an denen die beteiligt sind, näher untersucht werden. Da sich unsere Arbeitsgruppe auf zelluläre Tyrosinkinase aus *S. mansoni* fokussiert hat, war eine Zielsetzung dieser Arbeit, die bereits bekannten Tyrosinkinase SmTK4 und SmTK6 weiter zu charakterisieren. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Identifizierung von Interaktionspartnern über das Yeast Two-Hybrid System. Aufgrund der hohen funktionellen Konservierung von Signalwegen sowie der strukturellen Homologien der daran beteiligten Moleküle ließe die Kenntnis der *up-* und *downstream* in der Hierarchie eines Signalwegs gelegenen Interaktionspartner eines Signalmoleküls Rückschlüsse auf dessen Funktion zu. Parallel zu der Suche nach noch unbekanntem Interaktionspartner sollten Signalmoleküle aus *S. mansoni* gezielt kloniert werden, um Interaktionen, wie sie aus Mammaliern bekannt sind (zum Beispiel mit Integrin-Rezeptoren), im Yeast Two-Hybrid System zu überprüfen. Ein weiteres Ziel war es herauszufinden, ob die Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK-1 mit SmTK4 im Yeast Two-Hybrid System interagiert. Dieses Teilprojekt wurde im Rahmen einer Kollaboration mit Dr. Colette Dissous (Institute Pasteur, Lille) durchgeführt.

Eine mögliche Funktion der Syk-Kinase SmTK4 in den Reproduktionsorganen adulter Schistosomen sollte durch den Einsatz eines Syk-Kinase-spezifischen Inhibitors sowie durch eine posttranskriptionelle Suppression von SmTK4 mittels RNAi analysiert werden. Mögliche morphologische Effekte der SmTK4-Inhibierung auf die Reproduktionsorgane adulter Schistosomen sollten untersucht werden.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war es, verschiedene Bereiche der regulatorischen 5'-Region des Aktin-Gens SmAct1 zu klonieren. Diese Arbeiten wurden im Rahmen von Experimenten zur Transformation von Schistosomen unternommen. Da hierbei für die ektopische Expressionen von Genen konstitutiv aktive Promotoren wünschenswert sind, sollten unterschiedlich lange SmAct1-5'-Regionen über die transiente Transformation von Schistosomen (Adulte, Larven) mit GFP-Reportergenkonstrukten auf ihre potentiell konstitutive Promotoraktivität hin untersucht werden.

## 2. MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1. Puffer und Lösungen

Die für die Herstellung der folgenden Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen und lagen in p.A. Qualität vor.

<b>Lösung / Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Verwendungszweck</b>
<u>Acetat-Mix:</u>	3 M Kalium-Acetat; 11,5% konz. Essigsäure	Plasmidpräparation
<u>AFA-Fixativ:</u>	2% Essigsäure; 3% Formaldehyd; 95% Ethanol (70%ig)	Fixierung von Schistosomen
<u>„Annealing“-Puffer :</u>	500 mM Kalium-Acetat; 150 mM HEPES-KOH (pH 7,4); 10 mM Magnesium-Acetat; in DEPC-dH <sub>2</sub> O; sterilfiltriert	Synthese von dsRNA
<u>Anodenpuffer:</u>	200 mM Tris (pH 10,4); 20% Methanol	Western-Blot
<u>APS:</u>	10% Ammoniumpersulfat (Amersham) in dH <sub>2</sub> O	Proteingel
<u>Aufschlusspuffer (Stocklösung):</u>	8 M Urea; 5% (w/v) SDS; 40 mM Tris (pH 6,8); 0,1 mM EDTA; 0,4 mg/ml Bromphenol-Blau; in dH <sub>2</sub> O	Proteinextraktion aus Hefen
<u>Aufschlusspuffer (Gebrauchslösung):</u>	1,3 ml Aufschlusspuffer-Stocklösung; 13 µl β-Mercaptoethanol; 150 µl Complete Mini; 66 µl 100× PMSF	Proteinextraktion aus Hefen
<u>Blaumarker:</u>	0,1% Bromphenol-Blau; 0,1% Xylencyanol; 50% Glycerin; in 1× TAE-Puffer	DNA-Elektrophorese
<u>„Bead“-Puffer:</u>	50 mM Tris (pH 7,4); 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 250 mM NaCl; 0,1% NP-40; sterilfiltriert; vor Gebrauch werden 50 mM NaF hinzu gegeben	Immunopräzipitation
<u>Blockierungs-Lösung:</u>	4% <i>blocking reagent</i> (Roche, in Maleinsäurepuffer)	Transkript-Blot
<u>Bouin-Fixativ:</u>	15 ml gesättigte Pikrinsäure; 5 ml Formaldehyd; 1 ml Essigsäure	<i>In situ</i> - Hybridisierung
<u>BSS (Balanced Salt Solution):</u>	2,8 g NaCl; 0,15 g KCl; 0,07 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,05 g NaHCO <sub>3</sub> ; 0,53 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 1,0 g Glucose; 0,45 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; dH <sub>2</sub> O ad 1l, pH 7,4; sterilfiltriert	<i>In vitro</i> - Generation von Muttersporocysten

<u>Complete Mini:</u>	Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche); 1 Tablette in 1 ml dH <sub>2</sub> O gelöst	Proteinextraktion
<u>Coomassie Färbelösung:</u>	0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 40% Ethanol; 10% Eisessig; 50% dH <sub>2</sub> O	Färbung von Proteingelen
<u>Coomassie Entfärber:</u>	40% Ethanol; 10% Eisessig; 50% dH <sub>2</sub> O	Färbung von Proteingelen
<u>Detektionspuffer:</u>	100 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 9,5	Alkalische Phosphatase Umsetzung
<u>Denaturierungslösung:</u>	0,2 N NaOH; 1% SDS	Plasmidpräparation
<u>Denaturierungs-Puffer:</u>	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH	Southern-Blot
<u>Denhardt's (100×):</u>	2× SSC; 2% (w/v) Ficoll; 2% (w/v) Polyvinyl- pyrrolidon; 2% (w/v) BSA; in dH <sub>2</sub> O; filtriert	<i>In situ</i> - Hybridisierung
<u>DEPC-dH<sub>2</sub>O:</u>	0,1% Diethylpyrocarbonat in dH <sub>2</sub> O; autoklaviert	RNA-Isolation
<u>DMSO:</u>	100% Dimethylsulfoxid	Lösungsmittel
<u>DNA- Extraktionspuffer:</u>	20 mM Tris (pH 8,0); 100 mM EDTA; 1% SDS; 500 µg/ml Proteinase K (frisch hinzu geben)	DNA-Isolation aus Schistosomen
<u>Elutionspuffer:</u>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8,0	Proteinaufreinigung
<u>Ethidiumbromid (EtBr) :</u>	1 g auf 100 ml dH <sub>2</sub> O; abgedunkelt aufzubewahren	Anfärbung von Nukleinsäuren
<u>FastRed:</u>	4-Chlor-2-Methylbenzendiazonium (Sigma)	<i>In situ</i> - Hybridisierung
<u>Glucoselösung:</u>	50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris (pH 8,0); sterilfiltriert	Plasmidpräparation
<u>Hybridisierungs- Lösung</u>	5× SSC; 5× Denhardt's; 0,5% SDS; 100 µg/ml Heringssperma-DNA	Southern-Blot
<u>INDIA INK-Lösung:</u>	0,1% Fount India (filtriert, Pelikan) in PBS; 0,05% Tween 20; 1% Essigsäure; pH 8,4	Färbung von Membranen
<u>Karminrot-Lösung:</u>	500 mg Karminrot (Certistain, Merck); 500 µl konz. HCl; 500 µl dH <sub>2</sub> O; 90%iger Ethanol ad 20 ml	Färbung von Schistosomen
<u>Kathodenpuffer:</u>	40 mM ε-Aminocaprinsäure; 25 mM Tris (pH 9,4); 20% Methanol	Western-Blot
<u>LiAc-Lösung (10×):</u>	1 M LiAc; pH 7,5 (einzustellen mit verdünnter Essigsäure); autoklaviert	Hefetransformation

<u>Lösung S:</u>	5 ml Formamid (deionisiert), 2,5 ml SSC (20×), 30 µl t-RNA (33 mg/ml), 50 µl Tween 20 (20%), 50 µl Heringssperma-DNA (20 mg/ml), 100 µl Denhardt (100×), mit DEPC-dH <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen	<i>In situ</i> - Hybridisierung
<u>“Low salt” - Lysispuffer:</u>	50 mM Tris (pH 7,5); 0,1% (v/v) Triton X-100; 50 mM Natrium-β-Glycerophosphat; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; sterilfiltriert; vor Gebrauch werden 10% Complete Mini, 2 mM PMSF, 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (aktiviert) und 50 mM NaF hinzugegeben	Immunopräzipitation
<u>Lysispuffer:</u>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0	Proteinaufreinigung
<u>Maleinsäurepuffer:</u>	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5; in dH <sub>2</sub> O; autoklaviert	<i>In situ</i> - Hybridisierung
<u>MOPS-Puffer (10×):</u>	200 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS); 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; in DEPC-dH <sub>2</sub> O (pH 7,0); autoklaviert	RNA-Elektrophorese
<u>Naphthol- AS-Phosphat:</u>	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClNO <sub>5</sub> P (Sigma)	<i>In situ</i> - Hybridisierung
<u>Neutralisierungs- Puffer:</u>	1 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,5	Southern-Blot
<u>PBS (10×):</u>	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; dH <sub>2</sub> O ad 1 l (pH 7,0 - 7,2); autoklaviert	Waschpuffer
<u>PBST:</u>	0,05% - 0,1% (v/v) Tween20 in 1× PBS	Western-Blot
<u>Phenol:</u>	Phenol, abgesättigt mit gleichem Volumen 0,5 mM Tris (pH 7,8)	Aufreinigung von Nukleinsäuren
<u>PEG-Lösung:</u>	50% PEG 3350 (Polyethylenglycol)	Hefetransformation
<u>PEG/LiAc-Lösung:</u>	40% PEG 4000; 1× TE-Lösung; 1× LiAc-Lösung	Hefetransformation
<u>PMFS-Stock (100×):</u>	0,1742 g Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid in 10 ml Isopropanol; dunkel bei Raumtemperatur zu lagern	Proteinextraktion
<u>Polyacrylamid- Stammlösung:</u>	0,8% N’N’-Methylbisacrylamid; 30% Acrylamid; in dH <sub>2</sub> O (Rotiphorese® Gel 30; Carl Roth)	Proteingel
<u>Ponceau-Rot S:</u>	2% Ponceau-Rot S; 30% Sulfoacylsäure; 30% Trichloressigsäure; in dH <sub>2</sub> O	Western-Blot
<u>Proteinase K-Puffer:</u>	0,1 M Tris (pH 8,0); 0,05 M EDTA (pH 8,0); autoklaviert; vor Gebrauch Zugabe von Proteinase K (Stammkonz. 10 mg/ml, Endkonz. 1 µg/ml)	<i>In situ</i> - Hybridisierung

<u>Repel-Silan:</u>	2% Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan	Beschichtung von Deckgläsern
<u>RNA-Loading-Puffer:</u>	900 µl Formamid (deionisiert); 100 µl MOPS-Puffer (1×); 160 µl Formaldehyd; 20 µl Bromphenol-Blau (1% in DEPC-dH <sub>2</sub> O); 20 µl Xylenol (1% in DEPC-dH <sub>2</sub> O); 10 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl)	RNA-Elektrophorese
<u>Sammelgelpuffer (4×):</u>	0,5 M Tris (pH 6,8); 0,4% SDS	Proteingel
<u>Schneckenwasser:</u>	auf 1 l: 3 ml Lösung I (11 g CaCl <sub>2</sub> ; 7 g MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O; dH <sub>2</sub> O ad 200 ml); 2 ml Lösung II (0,6 g K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 4,6 g NaHCO <sub>3</sub> ; dH <sub>2</sub> O ad 200 ml); 0,4 ml Lösung III (0,6 M NaOH)	Kultur von <i>Biomphalaria glabrata</i>
<u>SDS-Laufpuffer (10×):</u>	1,92 M Glycin; 250 mM Tris; 10% (w/v) SDS; dH <sub>2</sub> O ad 1 l (pH 8,3; vor SDS-Zugabe einstellen)	Proteingel
<u>SDS-Laufpuffer (1×):</u>	100 ml 10× Stocklösung; dH <sub>2</sub> O ad 1 l	Proteingel
<u>SDS-Probenpuffer:</u>	8 ml Glycerin; 4 ml β-Mercaptoethanol; 12 ml 20% SDS; 16 ml 4×Sammelgelpuffer; (ggf. 4% Bromphenol-Blau)	Proteingel
<u>SSC (20×):</u>	3 M NaCl; 0,3 M Trinatriumcitrat·2H <sub>2</sub> O; dH <sub>2</sub> O ad 1 l; pH 7,0	<i>In situ</i> - Hybridisierung, Southern-Blot
<u>STET-Puffer:</u>	8% Sucrose; 50 mM Tris (pH 8,0); 50 mM EDTA; 5% Triton X-100	Plasmidpräparation aus Hefen
<u>Substratpuffer I:</u>	100 mM Tris; pH 8,0	<i>In situ</i> - Hybridisierung
<u>Substratpuffer II:</u>	100 mM Tris; 100 mM NaCl; 50 mM MgSO <sub>4</sub> ; pH 9,5 (schnelle Farbreaktion)	<i>In situ</i> - Hybridisierung
<u>TAE-Puffer (50×):</u>	2M Tris; 50 mM EDTA; 5,71% Eisessig; dH <sub>2</sub> O ad 1 l; pH 8,0	DNA-Elektrophorese
<u>TBS-Puffer:</u>	20 mM Tris; 137 mM NaCl; pH 7,5	Immunodetektion
<u>TBST-Puffer:</u>	TBS-Puffer + 0,05% - 0,1% (v/v) Tween-20	Immunodetektion
<u>TE-Lösung (10×):</u>	0,1 M Tris; 10 mM EDTA; pH 7,5; autoklaviert	Hefetransformation
<u>TEMED:</u>	Tetramethylethylendiamin, Amerham	Proteingel
<u>TESPA:</u>	3-Amino-propyltriethoxysilan, Sigma	Beschichtung von Objektträgern
<u>TFB1-Puffer :</u>	100 mM RbCl; 50 mM MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O; 30 mM Kalium-Acetat; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glycerin; pH 5,8; sterilfiltriert	Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i>

<u>TFB2-Puffer:</u>	10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glycerin; pH 6,8 (mit KOH einzustellen); sterilfiltriert	Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i>
<u>Trenngelpuffer (4x):</u>	1,5 M Tris (pH 8,8); 0,4% SDS	Proteingel
<u>TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz:</u>	Phenol, Guanidin-Isothiocyanat (GIBCO)	RNA-Isolation
<u>Waschpuffer:</u>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0	Proteinaufreinigung
<u>X-Gal-Stocklösung:</u>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) in N,N-dimethyl-formamid (DMF); 20 mg/ml	β-Galaktosidase-Assay
<u>Z-Puffer:</u>	60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O; 10 mM KCl; 1 mM MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; pH 7,0; autoklaviert	β-Galaktosidase-Assay
<u>Z-Puffer/ X-Gal-Lösung:</u>	100 ml Z-Puffer; 0,27 ml β-Mercaptoethanol; 1,67 ml X-Gal-Stocklösung	β-Galaktosidase-Assay

### 2.1.2 Medien und Zusätze

<b>Medium / Zusatz</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Verwendungszweck</b>
<u>LB-Medium:</u>	25 g Luria Broth Base (Miller's Lab; Invitrogen); ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O (pH 7,5); autoklaviert	<i>E. coli</i> - Medium (flüssig)
<u>LB-Agar:</u>	wie LB-Medium; zusätzlich 15 g/l Agar; autoklaviert	<i>E. coli</i> - Medium (fest)
<u>SOC-Medium:</u>	20 g Tryptone, 5 g Hefe-Extrakt; 0,5 g NaCl; 10 ml 250 mM KCl; 5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub> ; dH <sub>2</sub> O ad 1 l; autoklaviert; nach dem Autoklavieren Zugabe von 20 ml 1 M Glucoselösung (steril)	<i>E. coli</i> - Medium [nach Hitzeschock] (flüssig)
<u>Ampicillin:</u>	Ampicillin-Trihydrat [D(-)-α-Aminobenzylpenicillin]; Stockkonz. 100 mg/ml dH <sub>2</sub> O; Endkonz. 100 µg/ml	Zusatz zu LB-Medium und LB-Platten (Selektion)
<u>Kanamycin:</u>	Kanamycin-Disulfate; Stockkonz. 25 mg/ml dH <sub>2</sub> O; Endkonz. 25 µg/ml	Zusatz zu LB-Medium und LB-Platten (Selektion)
<u>X-Gal:</u>	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid; Stockkonz. 2% in Dimethylformamid; Endkonz. 0,004%	Blau-Weiß-Selektion
<u>IPTG:</u>	Isopropylthiogalactosid; Stockkonz. 1 M in dH <sub>2</sub> O; Endkonz. 0,2 mM	Blau-Weiß-Selektion

<u>YPD-Medium:</u>	20 g/l Peptone; 10 g/l Hefeextrakt; 950 ml dH <sub>2</sub> O; autoklaviert; nach dem Autoklavieren Zugabe von 50 ml 40%iger Glucoselösung (steril)	Flüssigkultur von Hefen (Vollmedium)
<u>YPD-Platten:</u>	wie YPD-Medium; zusätzlich 20 g/l Agar; autoklaviert; nach dem Autoklavieren Zugabe von 50 ml 40%iger Glucoselösung (steril)	Kulturplatten für Hefen (Vollmedium)
<u>YPDA-Medium:</u>	wie YPD-Medium; zusätzlich 0,2%ige Adenin-Hemisulfat-Lösung (steril; Endkonz. 0,003%)	Flüssigkultur von Hefen (Vollmedium)
<u>SD-Medium:</u>	6,7 g/l Yeast Nitrogene Base (YNB, without amino acids); Zugabe der entsprechenden 100× Aminosäurestocklösungen; dH <sub>2</sub> O ad 950 ml; autoklaviert; nach dem Autoklavieren Zugabe von 50 ml 40%iger Glucoselösung (steril)	Flüssigkultur von Hefen (Minimalmedium)
<u>SD-Agar:</u>	wie SD-Medium; zusätzlich 20 g/l Agar; autoklaviert; nach dem Autoklavieren Zugabe von 50 ml 40%iger Glucoselösung (steril)	Kulturplatten für Hefen (Minimalmedium)
<u>SG-Medium:</u>	6,7 g/l Yeast Nitrogene Base (YNB, without amino acids); 20 g Galaktose; dH <sub>2</sub> O ad 1 l; autoklaviert	Flüssigkultur von Hefen (Minimalmedium)
<u>Aminosäuren (Merck; Sigma):</u>	Adenin (20 mg/l), L-Histidin (20 mg/l), L-Leucin (100 mg/l), L-Lysin (30 mg/l), L-Methionin (20 mg/l), L-Tryptophan (20 mg/l), Uracil (20 mg/l); angesetzt als 100× Stocks in dH <sub>2</sub> O	Zusätze zu SD-Medium und SD-Platten
<u>M199:</u>	10,43 g M199; 1 g Glucose; 2,2 g NaHCO <sub>3</sub> ; 20 ml Tris (1 M; pH 7,4); dH <sub>2</sub> O ad 1 l (pH 7,0); sterilfiltriert	<i>In vitro</i> - Kultur von Schistosomen
<u>Schistosomen-Kulturmedium:</u>	M199; 1% HEPES; 1% ABAM; 10% NCS	<i>In vitro</i> - Kultur von Schistosomen
<u>Perfusionsmedium:</u>	1% (w/v) M199 Pulvermedium; 2% (v/v) 0,5 M Tris (pH 7,4); 0,1% Glucose; Heparin (Endkonz. 10 mg/l)	Hamster - Perfusion
<u>Bge-Medium:</u>	22% Schneider's Insect Medium; 58% dH <sub>2</sub> O; 4,5 g/l Lactalbumin Hydrolysat; 1,3 g/l Galactose; pH 7,4; sterilfiltriert	<i>In vitro</i> - Kultur von Muttersporocysten
<u>ABAM:</u>	Antibiotikum/Antimycotikum-Lösung (Sigma)	Zusatz zu Schistosomen - Kulturmedium
<u>NCS</u>	Serum von neugeborenen Kälbern (Sigma)	Zusatz zu Schistosomen - Kulturmedium
<u>HEPES:</u>	1 M 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethan-Sulfonsäure; pH 7,4; sterilfiltriert	Zusatz zu Schistosomen - Kulturmedium

### 2.1.3 Enzyme

Die während dieser Promotionsarbeit verwendeten Enzyme, sowie die Firmen, von denen sie bezogen wurden, sind im Folgenden wiedergegeben.

<b>Enzym</b>	<b>Firma</b>	<b>Anmerkung</b>
<u>Alkalische Phosphatase</u>	New England Biolabs	Calf Intestinal Mucosa Phosphatase (CIP)
<u>DNase</u>	Fermentas	RNase-freie DNaseI
<u>Proteinase K</u>	Merck	Cystein-Protease
<u>Restriktionsenzyme</u>	New England Biolabs, Fermentas	Restriktionsendonukleasen Typ II
<u>Reverse Transkriptase</u>	Qiagen Invitrogen	SensiScript SuperScriptII, SuperScriptIII
<u>RNaseA</u>	Sigma	DNase-freie RNase
<u>RNasin</u>	Promega	RNase-Inhibitor
<u>Taq-Polymerase</u>	New England Biolabs Solis Biodyne	DNA-Polymerase DNA-Polymerase
<u>TripleMaster (PCR Extender System)</u>	Eppendorf (5 PRIME)	DNA-Polymerase mit <i>proof reading</i> -Aktivität
<u>T4-DNA-Ligase</u>	New England Biolabs, Fermentas	Ligation von DNA
<u>T7-, T3-, SP6- RNA-Polymerase</u>	Roche	DNA-abhängige RNA-Polymerase

### 2.1.4 Molekulargewichtstandards

- DNA Standard: HyperLadderI (Bioline)  
10.000 (100); 8.000 (80); 600 (60); 5.000 (50); 4.000 (40); 3.000 (30); 2.500 (25); 2.000 (20); 1.500 (15); 1.000 (100); 800 (80); 600 (60); 400 (40); 200 (20)  
[bp; in Klammern angegeben die Menge DNA in ng pro 5 µl]
- RNA Standard: RNA Ladder High Range (Fermentas)  
6.000; 4.000; 3.000; 2.000; 1.500; 1.000; 500; 200 [bp]
- Protein Standard: Roti-Mark 10-150 (Carl Roth)  
150; 100; 80; 60; 40; 30; 20; 10 [kDa]
- Protein Standard: Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad)  
250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15; 10 [kDa]

### 2.1.5 Primer

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten Primer sind mit ihren Sequenzen und  $T_m$ -Werten im Folgenden angegeben. Die  $T_m$ -Werte der Primer wurde mit Hilfe der Formel  $T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$  abgeschätzt. Den Primern angehängte Restriktionsschnittstellen sind in der Sequenz blau markiert. Eingefügte Sequenzen für Start- oder Stop-Codons sind rot und in den Primern eingefügte „Tag“-Sequenzen grün markiert.

Primer-Name	Primer-Sequenz (5' → 3')	$T_m$ -Wert [°C]
TK6-Voll-pESC-His-5' ( <i>XhoI</i> )	CTC GAG AAT GTT GTG ACT GAT GTG CAT	58
TK6-Voll-pESC-His-3' ( <i>SacII</i> )	CCG CGG TTA TCT AAA TAT TGA GCT TCT GTG TGC	72
TK4-SH2SH2-pESC-His-5' ( <i>NotI</i> )	GCG GCC GCA ATG GGA GCT ATT CCA CCG	58
TK4-SH2SH2-pESC-His-3' ( <i>Clal</i> )	AT CGA TGA TAT ACC ACC GGA ACC TGA	60
TK6-SH2-5' ( <i>BamHI</i> )	GG ATC CGT CTG AAT GAT GGA CTT CCA ACT AGT TTG	82
TK6-SH2-3' ( <i>PstI</i> )	CTG CAG AAA TGC ACT GGT GGA CGG TAT GC	70
TK4-bait1-5'	GG ATC CTA CAG AAA CCA ATA CCA GTA TC	60
TK4-bait1-3'	CT GCA GGG TAT GCA AAT ATT TGT TTG T	54
TK4-bait2-5'	GG ATC CAA ATT TAT GAT GAA TTA CCA CC	56
TK4-bait2-3'	CT GCA GTT CAA CAA GAA ATT CGA TG	50
GAL4-DNA-BD-5'	TGT GAA TAA AGA TGC CGT C	54
pGADT7-5'	GTG GTA TCA ACG CAG AGT GGC	66
pGADT7-3'	ATC GAT GCC CAC CCT CTA GAG	66
pGADTneu-5'	TGC AAA GAT GGA TAA AGC GG	58
pGADTneu-3'	ATC TGG TAC GTC GTA TGG G	58
prey-pGADT7-5'	ACC AAA TGC GGT GTT CTT G	56
prey-pGADT7-3'	CTA AAG GTA CTG ACT TCG TTG TTG TC	74
TK6-SH2-pACT2-5' ( <i>BamHI</i> )	GG ATC CTG AAT GAT GGA CTT CCA ACT	56

TK6-SH2-pACT2-3' ( <i>XhoI</i> )	C TCG AGA ATG CAC TGG TGG ACG GTA	58
TK3-SH2-pACT2-5' ( <i>BamHI</i> )	GG ATC CGT TTG GAA TCC AAT GAA TGG T	58
TK3-SH2-pACT2-3' ( <i>XhoI</i> )	C TCG AGG TCG AAT ACA CGG TTT TCC C	60
RTK1-pACT2-5' ( <i>BamHI</i> )	GG ATC CTT TAC TAT CGG CGC AAA CTA AAG	64
RTK1-pACT2-3' ( <i>XhoI</i> )	C TCG AGA AGG TAG AAA CGC TAA ACT GTT ATC	68
TK6-SH3SH2-5' ( <i>BamHI</i> )	GG ATC CGT ATG GGA ATT TGT TTG TGT CTT C	52
TK6-SH3SH2-3' ( <i>PstI</i> )	CTG CAG AAG CTT TCG AAT TCT TGT TAT G	58
TK3-SH3SH2-5' ( <i>BamHI</i> )	GG ATC CGT ATG GGA AAT TCT AAT TCG TCT AA	64
TK3-SH3SH2-3' ( <i>PstI</i> )	CTG CAG AAT TGA AGA TTT TGG AAT TTC CC	60
$\beta$ -Integrin1-5'	TGG TGA ATG TAA ATG TCA GTC T	60
$\beta$ -Integrin1- C-Terminus-3'	ATA TCC GTT TTC TTC AAA AGT	54
$\beta$ -Integrin1- C-Terminus-5'	TAC AAT TGA TGA TCG TCG T	52
$\beta$ -Integrin1- komplett-5'	ATG GGA CTT GTT CGT C	48
$\beta$ -Integrin1-Sonde-5'	TCG TGG TGT GTG TGA CTG TG	62
$\beta$ -Integrin1-Sonde-3'	GAA GAT TCG CAT TGT GTA GCA	60
Southern- $\beta$ -Int-5'	CCA GAG GGT GGT ATG GAC G	62
Southern- $\beta$ -Int-3'	CGC TAG GAT AAT CAG TTT GAT CAG	68
$\beta$ -Integrin1-C- Terminus-5' ( <i>BamHI</i> )	GG ATC CGA AAA CTA GTC ATT ACA ATT GAT GA	58
$\beta$ -Integrin1-C- Terminus-3' ( <i>XhoI</i> )	CTC GAG TTA TCA ATA TCC GTT TTC TTC AAA AGT TG	60
TK6-SH3-5' ( <i>BamHI</i> )	GG ATC CGT TTG GTA CAG GTT CGC GCT C	60
TK6-SH3-3' ( <i>PstI</i> )	CTG CAG TCA AGT TGG AAG TCC ATC ATT CAG	62
TK3-SH3-5' ( <i>BamHI</i> )	GG ATC CGT ACA GAA GGG CAG TTT GTT GC	60
TK3-SH3-3' ( <i>PstI</i> )	CTG CAG TCA TTC CAA ACT GGT AAC AGC TG	58

$\alpha$ -Integrin1-5'	ATG AGA TAT TTA AAG AAA TAT ATT AGT CGA AA	76
$\alpha$ -Integrin1-kurz-5'	ATG GGT CAA ATA TCT CAT TGG T	60
$\alpha$ -Integrin1-int-5'	TGT GGA ATT GAA AAC CGA	50
$\alpha$ -Integrin1-3'	TTA ATT TTT TCT CGG TTC AAT AAA T	60
$\alpha$ -Integrin1-int-3'	TAA AGG TTC GAT TGC CCA	52
$\alpha$ -Int-Sub1-5'	CGA CGT TCA GTA AAT AGG AAA ATA AA	68
$\alpha$ -Int-Sub1-3'	TGG AAT TTC ACG AAA TAA TGA TAC A	64
TK4-linker-Sub1-5' ( <i>Bam</i> HI)	G GAT CCG AAT TTC ACA TGT TCA TTT TCA GG	64
TK4-linker-Sub1-3' ( <i>Pst</i> I)	CT GCA GGA TGG AGA AGA GAA AGC ATT TGA	64
TK4-linker-Sub2-5' ( <i>Bam</i> HI)	G GAT CCA TCA AAT GCT TTC TCT TCT CCA TC	66
TK4-linker-Sub2-3' ( <i>Pst</i> I)	CT GCA GAA CAA GAA ATT CGA TGG TGG T	58
TK4-Sub1-5' (pGEX)	GGA TCC AAT TTC ACA TGT TCA TTT TCA GG	60
TK4-Sub1-3' (pGEX)	G AAT TCA TGG AGA AGA GAA AGC ATT TGA T	62
TK4-Sub2-5' (pGEX)	GGA TCC ACA TTA CAC TTT CCT CCA ATA TT	60
TK4-Sub2-3' (pGEX)	G AAT TCA CAA GAA ATT CGA TGG TGG TAA	60
TK4-Sub1- <i>in vitro</i> Expression-5' ( <i>Kpn</i> I)	GGTACCA ATG CAC CAT CAC CAT CAC CAC AAT TTC ACA TGT TCA TTT TCA GGT	62
TK4-Sub1- <i>in vitro</i> Expression-3' ( <i>Eco</i> RI)	GAATTC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GGG TTA AGA TGG AGA AGA GAA AGC ATT	58
TK4-Sub2- <i>in vitro</i> Expression-5' ( <i>Kpn</i> I)	GGTACCA ATG CAC CAT CAC CAT CAC CAT ACA TTA CAC TTT CCT CCA ATA TTG	64
TK4-Sub2- <i>in vitro</i> Expression-3' ( <i>Eco</i> RI)	GAA TTC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GGG TTA CAA GAA ATT CGA TGG TGG TAA	58
TK4-linker1- pBAD-5' ( <i>Xba</i> I)	TCT AGA AAT TTC ACA TGT TCA TTT TCA GG	60
TK4-linker1- pBAD-3' ( <i>Eco</i> RI)	GAA TTC AGA TGG AGA AGA GAA AGC ATT TG	64
TK4-linker2- pBAD-5' ( <i>Xba</i> I)	TCT AGA ACA TTA CAC TTT CCT CCA ATA TTG	64
TK4-linker2- pBAD-3' ( <i>Eco</i> RI)	GAA TTC CAA GAA ATT CGA TGG TGG TAA T	60

TK4-SH2SH2- pBAD-5' ( <i>Xba</i> I)	TCT AGA ATG CCT GGA GCT ATT CCA	46
TK4-SH2SH2- pBAD-3' ( <i>Not</i> I)	GC GGC CGC TGA TAT ACC ACC GGA	44
TK4-SH2-1-pBAD-5' ( <i>Xba</i> I)	TCT AGA ATG GAA TCA ACA AAT TAT TTC TAT GG	66
TK4-SH2-1-pBAD-3' ( <i>Not</i> I)	GC GGC CGC AAG AAA ACC ATC CAA TTG	48
TK4-SH2-2-pBAD-5' ( <i>Xba</i> I)	TCT AGA ATG CAT TTA TTA CAA CCA TGG TAT C	66
TK4-SH2-2-pBAD-3' ( <i>Eco</i> RI)	GAA TTC ACA TAA TAA TCC ATC TTG ACG	56
TK4-linker-Sub3- pBAD-5' ( <i>Xba</i> I)	TCT AGA ATG AAC GTA AAA GAT TCA CGT G	60
TK4-linker-Sub3- pBAD-3'( <i>Not</i> I)	GC GGC CGC TGC ATG TTC TTC ACT ACA ATC	58
TK6-unique-pBAD-5' ( <i>Xba</i> I)	TCT AGA ATG GGA ATT TGT TTG TGT CTT C	60
TK6-unique-pBAD-3' ( <i>Eco</i> RI)	GAA TTC CAA AGG TCT CGC TTG GA	52
Trx fwd	TTC CTC GAC GCT AAC CTG	56
pBAD rev	GAT TTA ATC TGT ATC AGG C	52
Act <sub>500</sub> -5' ( <i>Sac</i> II)	TCC CCG CGG TAC TAT AGG GCA CGC GTG	56
Act <sub>1000</sub> -5' ( <i>Sac</i> II)	TTC CCG CGG TAA ACA CGC ACT CAA AGT G	54
Act <sub>1500</sub> -5' ( <i>Sac</i> II)	TCC CCG CGG CTC GAA TAT ATG GGT AAG C	54
Act <sub>500</sub> -3' ( <i>Nco</i> I)	CCC ATG GTT TAC TAG ATG ATG AGA CAC	54
Act3 Promotor-5' ( <i>Sac</i> II)	CCG CGG CTT CCA AAT AGT TCC CAC	52
Act2 Promotor-5' ( <i>Sac</i> II)	CCG CGG CCA TCT TGT CTA AAT CCT ATC	58
Act1 Promotor-5' ( <i>Sac</i> II)	CCG CGG TAT GGG TAA GCG TTG TTC	52
Act Promotor-3' ( <i>Nco</i> I)	CCA TGG TAC TAG ATG ATG AGA CAC T	52
GFP-5'	GGG AAC TAC AAG ACA CGT GC	62
GFP-3'	AAC TGC AGT CCT TAT TTG TAT AGT TCC C	78
Oligo-d(T)-Primer	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT	40

PDI-RNA-5'	AAA TGA TGC CCC GAC TTA CC	60
PDI-RNA-3'	TCA TCC CAA ACT GGA GCA AG	60
PDI-5'	GGG ATT TAT CAA GGA TAC GGA CTC	70
PDI-3'	CAC CAA GGA GCA TAC AGT TTG AC	68

### 2.1.6 Plasmide und rekombinante Plasmide

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden die folgenden kommerziellen Plasmide als Grundlage für Klonierungen verwendet.

Plasmid-Name	Beschreibung	Firma/Quelle
<u>pST-Blue1</u>	Klonierungsvektor	Novagen
<u>pDrive</u>	Klonierungsvektor	Qiagen
<u>pQE-30, pQE-31, pQE-81L</u>	Vektoren zur Proteinexpression in <i>E. coli</i>	Qiagen
<u>pGEX-2T</u>	GST-Fusionsvektor zur Proteinexpression in <i>E. coli</i>	Amersham
<u>pBAD-TOPO/Thio</u>	Thioredoxin-Fusionsvektor zur Proteinexpression in <i>E. coli</i>	Invitrogen; modifizierte MCS (K. Brehm)
<u>pBridge</u>	Yeast Three-Hybrid – GAL4-BD-Vektor	Clontech
<u>pGADT7</u>	Yeast Two-Hybrid – GAL4-AD-Vektor	Clontech
<u>pACT2</u>	Yeast Two-Hybrid – GAL4-AD-Vektor	Clontech
<u>pESC-HIS</u>	Yeast epitope tagging vector	Stratagene

Auf der Grundlage dieser Plasmide wurden die im Folgenden aufgeführten, rekombinanten Plasmide hergestellt [\*: Glycerin-Stock angelegt; \*\*: Glycerin-Stock angelegt und sequenziert]. Bei Plasmiden, die in die Klonsammlung der Arbeitsgruppe eingefügt wurden, sind zusätzlich zu den Namen die jeweiligen Klonnummern in Klammern angegeben.

Plasmid-Name	Beschreibung	Quelle
TK4-Volllänge [245]	<u>Insert:</u> Vollängen-cDNA-Sequenz von SmTK4 <u>Rückgrat:</u> pDrive	V. Wippersteg, unveröffentlicht *
TK6-Volllänge [140]	<u>Insert:</u> Vollängen-cDNA-Sequenz von SmTK6 <u>Rückgrat:</u> pST-Blue1	selbst erstellt **
TK6-Volllänge pDrive (pESC-HIS)	<u>Insert:</u> Vollängen-cDNA-Sequenz von SmTK6 (5' <i>XhoI</i> ; 3' <i>SacII</i> ) zur Klonierung in pESC-HIS <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK6-Volllänge pESC-HIS [145]	<u>Insert:</u> Vollängen-cDNA-Sequenz von SmTK6 (5' <i>XhoI</i> ; 3' <i>SacII</i> ) in der MCSII <u>Rückgrat:</u> pESC-HIS	selbst erstellt *
TK4-SH2SH2 pDrive (pESC-HIS)	<u>Insert:</u> Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 (5' <i>NotI</i> ; 3' <i>Clal</i> ) zur Klonierung in pESC-HIS <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-SH2SH2 pESC-HIS [146]	<u>Insert:</u> Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 (5' <i>NotI</i> ; 3' <i>Clal</i> ) in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pESC-HIS	selbst erstellt *
TK4-SH2SH2 + TK6-Volllänge pESC-HIS [147]	<u>Insert:</u> Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 (5' <i>NotI</i> ; 3' <i>Clal</i> ) in der MCSI, Vollängen-cDNA- Sequenz von SmTK6 (5' <i>XhoI</i> ; 3' <i>SacII</i> ) in der MCSII <u>Rückgrat:</u> pESC-HIS	selbst erstellt **
TK6-SH2 [141]	<u>Insert:</u> SH2-Domäne von SmTK6 (5' <i>BamHI</i> , 3' <i>PstI</i> ) zur Klonierung in die MCSI von pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK6-SH2 pBridge [142]	<u>Insert:</u> SH2-Domäne von SmTK6 in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
TK6-SH2 + TK3-TK pBridge [143]	<u>Insert:</u> SH2-Domäne von SmTK6 in der MCSI und TK-Domäne von SmTK3 in der MCSII <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
TK4-bait1 pDrive	<u>Insert:</u> SmTK4-bait1 (5' <i>BamHI</i> , 3' <i>PstI</i> ) zur Klonierung in die MCSI von pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-bait2 pDrive	<u>Insert:</u> SmTK4-bait2 (5' <i>BamHI</i> , 3' <i>PstI</i> ) zur Klonierung in die MCSI von pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-bait3 pDrive	<u>Insert:</u> SmTK4-bait3 (5' <i>BamHI</i> , 3' <i>PstI</i> ) zur Klonierung in die MCSI von pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-bait1 pBridge [158]	<u>Insert:</u> SmTK4-bait1 (5' <i>BamHI</i> , 3' <i>PstI</i> ) in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **

TK4-bait2 pBridge [159]	<u>Insert:</u> SmTK4-bait2 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
TK4-bait3 pBridge [160]	<u>Insert:</u> SmTK4-bait3 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
TK6-SH2 pDrive	<u>Insert:</u> SH2-Domäne von SmTK6 (5' <i>Bam</i> HI; 3' <i>Xho</i> I) zur Klonierung in pACT2 <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK6-SH2 pACT2 [235]	<u>Insert:</u> SH2-Domäne von SmTK6 (5' <i>Bam</i> HI; 3' <i>Xho</i> I) <u>Rückgrat:</u> pACT2	selbst erstellt **
TK3-SH2 pDrive	<u>Insert:</u> SH2-Domäne von SmTK3 (5' <i>Bam</i> HI; 3' <i>Xho</i> I) zur Klonierung in pACT2 <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK3-SH2 pACT2 [236]	<u>Insert:</u> SH2-Domäne von SmTK3 (5' <i>Bam</i> HI; 3' <i>Xho</i> I) <u>Rückgrat:</u> pACT2	selbst erstellt **
TK4-SH2SH2 pBridge [118]	<u>Insert:</u> Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pBridge	Beckmann, 2005
TK4-SH2SH2 + TK3-TK pBridge [117]	<u>Insert:</u> Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 in der MCSI und TK-Domäne von SmTK3 in der MCSII <u>Rückgrat:</u> pBridge	Beckmann, 2005
TK4-SH2(1) + TK3-TK pBridge [119]	<u>Insert:</u> N-terminale SH2-Domäne von SmTK4 in der MCSI und TK-Domäne von SmTK3 in der MCSII <u>Rückgrat:</u> pBridge	Beckmann, 2005
TK4-SH2(2) + TK3-TK pBridge [120]	<u>Insert:</u> C-terminale SH2-Domäne von SmTK4 in der MCSI und TK-Domäne von SmTK3 in der MCSII <u>Rückgrat:</u> pBridge	Beckmann, 2005
SmVKF fl	<u>Insert:</u> Volllängen-cDNA-Sequenz von SmRTK-1 <u>Rückgrat:</u> pcDNA 3.1 V5His (Invitrogen)	C. Dissous *
iSmVKR pBridge	<u>Insert:</u> C-Terminus von SmRTK-1 (5' <i>Eco</i> RI, 3' <i>Bam</i> HI) in der MCSI und TK-Domäne von SmTK3 in der MCSII <u>Rückgrat:</u> pBridge	C. Dissous *
RTK1-C-Terminus pDrive	<u>Insert:</u> C-Terminus von SmRTK-1 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Xho</i> I) zur Klonierung in pACT2 <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
RTK1-C-Terminus pACT2 [247]	<u>Insert:</u> C-Terminus von SmRTK-1 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Xho</i> I) <u>Rückgrat:</u> pACT2	selbst erstellt **
TK6-SH3SH2 pDrive	<u>Insert:</u> SH3- und SH2-Domäne von SmTK6 (5' <i>Bam</i> HI; 3' <i>Pst</i> I) zur Klonierung in pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *

TK6-SH3SH2 pBridge [237]	<u>Insert:</u> SH3- und SH2-Domäne von SmTK6 (5' <i>Bam</i> HI; 3' <i>Pst</i> I) <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
TK3-SH3SH2 pDrive	<u>Insert:</u> SH3- und SH2-Domäne von SmTK3 (5' <i>Bam</i> HI; 3' <i>Pst</i> I) zur Klonierung in pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK3-SH3SH2 pBridge [238]	<u>Insert:</u> SH3- und SH2-Domäne von SmTK3 (5' <i>Bam</i> HI; 3' <i>Pst</i> I) <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
β-Integrin1-1200bp	<u>Insert:</u> unbekannter Bereich der <i>in silico</i> - Smβ-Integrin1- Sequenz (1.200 bp Amplifikat) <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt **
β-Integrin1- Volllänge	<u>Insert:</u> Volllängen-cDNA-Sequenz von Smβ-Integrin1 <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt **
β-Integrin1-Sonde [150]	<u>Insert:</u> Subfragment der Smβ-Integrin1-Sequenz für die Transkriptionherstellung für eine <i>in situ</i> - Hybridisierung <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt **
Southern-β-Int [242]	<u>Insert:</u> Subfragment der Smβ-Integrin1-Sequenz für die Herstellung einer Sonde für einen Southern-Blot <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt **
β-Integrin1-C- Terminus pDrive (pACT2)	<u>Insert:</u> C-Terminus von Smβ-Integrin1 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Xho</i> I) zur Klonierung in pACT2 <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
β-Integrin1-C- Terminus pACT2	<u>Insert:</u> C-Terminus von Smβ-Integrin1 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Xho</i> I) <u>Rückgrat:</u> pACT2	selbst erstellt **
TK6-SH4SH3 pDrive	<u>Insert:</u> SH4- und SH3-Domäne von SmTK6 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) zur Klonierung in pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK6-SH4SH3 pBridge	<u>Insert:</u> SH4- und SH3-Domäne von SmTK6 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
TK6-SH3 pDrive	<u>Insert:</u> SH3-Domäne von SmTK6 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) zur Klonierung in pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK6-SH3 pBridge	<u>Insert:</u> SH3-Domäne von SmTK6 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
TK3-SH4SH3 pDrive	<u>Insert:</u> SH4- und SH3-Domäne von SmTK3 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) zur Klonierung in pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *

TK3-SH4SH3 pBridge	<u>Insert:</u> SH4- und SH3-Domäne von SmTK3 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
TK3-SH3 pDrive	<u>Insert:</u> SH3-Domäne von SmTK3 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) zur Klonierung in pBridge <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK3-SH3 pBridge	<u>Insert:</u> SH3-Domäne von SmTK3 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) in der MCSI <u>Rückgrat:</u> pBridge	selbst erstellt **
$\alpha$ -Integrin- 5'-Bereich	<u>Insert:</u> 1.930 bp des 5'-Bereiches von Sm $\alpha$ -Integrin1 <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt**
$\alpha$ -Integrin- 3'-Bereich	<u>Insert:</u> 2.071 bp des 3'-Bereiches von Sm $\alpha$ -Integrin1 <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt **
$\alpha$ -Integrin-Sub1 [248]	<u>Insert:</u> Subfragment der Sm $\alpha$ -Integrin1-Sequenz für die Transkriptionherstellung für eine <i>in situ</i> - Hybridisierung <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt**
TK4-linker- Subfragment 1 pDrive (pQE-31)	<u>Insert:</u> Subfragment 1 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) zur Klonierung in pQE-31 <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-linker- Subfragment 2 pDrive (pQE-31)	<u>Insert:</u> Subfragment 2 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) zur Klonierung in pQE-31 <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-linker-komplett pDrive (pQE-31)	<u>Insert:</u> komplette „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-linker- Subfragment 1 pDrive (pGEX-2T)	<u>Insert:</u> Subfragment 1 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Eco</i> RI) zur Klonierung in pGEX-2T <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-linker- Subfragment 2 pDrive (pGEX-2T)	<u>Insert:</u> Subfragment 2 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Eco</i> RI) zur Klonierung in pGEX-2T <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-linker-Sub 1 Expressionsklon pQE-31 [151]	<u>Insert:</u> Subfragment 1 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) <u>Rückgrat:</u> pQE-31	selbst erstellt **
TK4-linker-Sub 2 Expressionsklon pQE-31 [152]	<u>Insert:</u> Subfragment 2 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) <u>Rückgrat:</u> pQE-31	selbst erstellt **
TK4-linker-Sub 1 Expressionsklon pQE-81L [153]	<u>Insert:</u> Subfragment 1 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) <u>Rückgrat:</u> pQE-81L	selbst erstellt **

TK4-linker-komplett Expressionsklon pQE-81L [154]	<u>Insert:</u> komplette „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Pst</i> I) <u>Rückgrat:</u> pQE-81L	selbst erstellt **
TK4-linker-Sub 1 GST-Expressionsklon [155]	<u>Insert:</u> Subfragment 1 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Eco</i> RI) <u>Rückgrat:</u> pQEX-2T	selbst erstellt **
TK4-linker-Sub 2 GST-Expressionsklon [156]	<u>Insert:</u> Subfragment 2 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Eco</i> RI) <u>Rückgrat:</u> pQEX-2T	selbst erstellt **
TK4-Sub1-für <i>in vitro</i> Expression	<u>Insert:</u> Subfragment 1 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Kpn</i> I; 3' <i>Eco</i> RI) für <i>in vitro</i> - Expressionsklon <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-Sub2-für <i>in vitro</i> Expression	<u>Insert:</u> Subfragment 2 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Kpn</i> I; 3' <i>Eco</i> RI) für <i>in vitro</i> - Expressionsklon <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-Sub1- <i>in vitro</i> Expressionsklon	<u>Insert:</u> Subfragment 1 der „linker“-Region von SmTK4, <i>in vitro</i> - Expressionsklon <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt **
TK4-Sub2- <i>in vitro</i> Expressionsklon	<u>Insert:</u> Subfragment 2 der „linker“-Region von SmTK4, <i>in vitro</i> - Expressionsklon <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt **
TK4-linker-Sub 1 pDrive (pBAD)	<u>Insert:</u> Subfragment 1 der „linker“-Region von SmTK4 zur Klonierung in pBAD-TOPO/Thio <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-linker-Sub 2 pDrive (pBAD)	<u>Insert:</u> Subfragment 2 der „linker“-Region von SmTK4 zur Klonierung in pBAD-TOPO/Thio <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-linker-Sub 1 pBAD [191]	<u>Insert:</u> Subfragment 1 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Eco</i> RI) <u>Rückgrat:</u> pBAD-TOPO/Thio	selbst erstellt **
TK4-linker-Sub 2 pBAD [157]	<u>Insert:</u> Subfragment 2 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Eco</i> RI) <u>Rückgrat:</u> pBAD-TOPO/Thio	selbst erstellt **
TK4-SH2SH2 pDrive (pBAD)	<u>Insert:</u> Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Not</i> I) zur Klonierung in pBAD <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-SH2SH2 pBAD [192]	<u>Insert:</u> Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Not</i> I) <u>Rückgrat:</u> pBAD-TOPO/Thio	selbst erstellt **

TK4-SH2-1 pDrive (pBAD)	<u>Insert:</u> N-terminale SH2-Domäne von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Not</i> I) zur Klonierung in pBAD-TOPO/Thio <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-SH2-1 pBAD [241]	<u>Insert:</u> N-terminale SH2-Domäne von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Not</i> I) <u>Rückgrat:</u> pBAD-TOPO/Thio	selbst erstellt **
TK4-SH2-2 pDrive (pBAD)	<u>Insert:</u> C-terminale SH2-Domäne von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Eco</i> RI) zur Klonierung in pBAD-TOPO/Thio <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-SH2-2 pBAD [246]	<u>Insert:</u> C-terminale SH2-Domäne von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Eco</i> RI) <u>Rückgrat:</u> pBAD-TOPO/Thio	selbst erstellt **
TK4-linker-Sub3 pDrive (pBAD)	<u>Insert:</u> Subfragment 3 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Not</i> I) zur Klonierung in pBAD-TOPO/Thio <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK4-linker-Sub3 pBAD [249]	<u>Insert:</u> Subfragment 3 der „linker“-Region von SmTK4 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Not</i> I) <u>Rückgrat:</u> pBAD-TOPO/Thio	selbst erstellt **
TK6- <i>unique site</i> pDrive	<u>Insert:</u> <i>unique site</i> von SmTK6 zur Klonierung in pBAD- TOPO/Thio (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Eco</i> RI) <u>Rückgrat:</u> pDrive	selbst erstellt *
TK6- <i>unique site</i> pBAD [185]	<u>Insert:</u> <i>unique site</i> von SmTK6 (5' <i>Xba</i> I, 3' <i>Eco</i> RI) <u>Rückgrat:</u> pBAD-TOPO/Thio	selbst erstellt **
Act <sub>500</sub> - GFP - Act [4]	<u>Insert:</u> ORF des GFP-Gens unter der Kontrolle des Aktin <sub>500</sub> -Promotors, gefolgt von dem SmAct1-Terminator <u>Rückgrat:</u> pBlueskript II SK-	El Bahay, 2003
Act <sub>1000</sub> - GFP - Act [161]	<u>Insert:</u> ORF des GFP-Gens unter der Kontrolle des Aktin <sub>1000</sub> -Promotors, gefolgt von dem SmAct1-Terminator <u>Rückgrat:</u> pBlueskript II SK-	selbst erstellt **
Act <sub>1500</sub> - GFP - Act [107]	<u>Insert:</u> ORF des GFP-Gens unter der Kontrolle des Aktin <sub>1500</sub> -Promotors, gefolgt von dem SmAct1-Terminator <u>Rückgrat:</u> pBlueskript II SK-	Beckmann, 2005
Act1 (Act <sub>1500</sub> -luciferase) [162]	<u>Insert:</u> ORF des Luciferase-Gens unter der Kontrolle eines Aktin <sub>1500</sub> -Promotors [Act1] (5' <i>Kpn</i> I, 3' <i>Sma</i> I) <u>Rückgrat:</u> pGL3basic (Promega)	J. Correnti *
Act2 (Act <sub>1000</sub> -luciferase) [163]	<u>Insert:</u> ORF des Luciferase-Gens unter der Kontrolle eines Aktin <sub>1000</sub> -Promotors [Act2] (5' <i>Kpn</i> I, 3' <i>Sma</i> I) <u>Rückgrat:</u> pGL3basic (Promega)	J. Correnti *
Act3 (Act <sub>500</sub> -luciferase) [164]	<u>Insert:</u> ORF des Luciferase-Gens unter der Kontrolle eines Aktin <sub>500</sub> -Promotors [Act3] (5' <i>Kpn</i> I, 3' <i>Sma</i> I) <u>Rückgrat:</u> pGL3basic (Promega)	J. Correnti *

Act1-GFP-Act [165]	<u>Insert:</u> ORF des GFP-Gens unter der Kontrolle des Act1-Promotors, gefolgt von dem SmAct1-Terminator <u>Rückgrat:</u> pBlueskript II SK-	selbst erstellt *
Act2-GFP-Act [166]	<u>Insert:</u> ORF des GFP-Gens unter der Kontrolle des Act2-Promotors, gefolgt von dem SmAct1-Terminator <u>Rückgrat:</u> pBlueskript II SK-	selbst erstellt *
Act3-GFP-Act [167]	<u>Insert:</u> ORF des GFP-Gens unter der Kontrolle des Act3-Promotors, gefolgt von dem SmAct1-Terminator <u>Rückgrat:</u> pBlueskript II SK-	selbst erstellt *

## 2.1.7 Bakterien- und Hefestämme

### Bakterien-Stämme

<u>DH5<math>\alpha</math></u>	Hitzeschock-kompetente <i>E. coli</i> - Zellen (Hanahan, 1983) [F <sup>-</sup> , end A1, hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), supE44, thi-1, $\lambda$ <sup>-</sup> , recA1, gyrA96, relA1, $\Delta$ (argF-lacZYA), U196, $\Phi$ 80d, lacZ $\Delta$ M15]
<u>XL1-Blue</u>	Hitzeschock-kompetente <i>E. coli</i> - Zellen (Bullock et al., 1987) [endA1, hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), supE44, thi-1, $\lambda$ <sup>-</sup> , recA1, gyrA96, relA1, $\Delta$ (lac), F <sup>-</sup> , Pro A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, Tn10(tet <sup>r</sup> )]
<u>M15 [pREP4]</u>	Hitzeschock-kompetente <i>E. coli</i> - Zellen für Protein-Expression (Qiagen) [Nal <sup>S</sup> , Str <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Thi <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>+</sup> , Gal <sup>+</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup> ]
<u>SG 13009 [pREP4]</u>	Hitzeschock-kompetente <i>E. coli</i> - Zellen für Protein-Expression (Qiagen) [Nal <sup>S</sup> , Str <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Thi <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>+</sup> , Gal <sup>+</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup> ]
<u>BL21(DE3)-pLysS</u>	Hitzeschock-kompetente <i>E. coli</i> - Zellen für Protein-Expression (Novagen) [F <sup>-</sup> , omT, hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal dcm (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )]

### Hefe-Stämme

<u>AH109</u>	Mat a, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::Gal1 <sub>UAS</sub> -Gal1 <sub>TATA</sub> -HIS3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2, URA3::MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> -lacZ (James et al., 1996)
<u>Y187</u>	Mat $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 $\Delta$ , met <sup>-</sup> , gal80 $\Delta$ , URA3::Gal1 <sub>UAS</sub> -Gal1 <sub>TATA</sub> -lacZ (Clontech)
<u>YPH499</u>	ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1- $\Delta$ 63 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1; Mat a (Stratagene)
<u>YPH500</u>	ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1- $\Delta$ 63 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1; Mat $\alpha$ (Stratagene)
<u>YPH501</u>	ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1- $\Delta$ 63 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1; Mat a/ $\alpha$ (Stratagene)

### 2.1.8 Antikörper

- goat anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG (Dianova; Peroxidase-gekoppelt)
- anti-FLAG, polyklonal, aus Kaninchen (Sigma, F7425)
- anti-c-Myc polyklonal, aus Kaninchen (Sigma, C3956)
- anti-His, monoklonal, aus Maus (Qiagen; Anti-His Antibody Selector Kit, 34698)
- anti-Digoxygenin (Fab-Fragment) (Roche; Alkalische Phosphatase-gekoppelt)
- anti-SmTK4, polyklonal, isoliert aus Kaninchen

### 2.1.9 Genbanken

- GAL4 - *Schistosoma mansoni* cDNA-Bank in pGADT7 (Knobloch, 2002)

### 2.1.10 Computersoftware und Internet-Programme

- Software: Microsoft Office Professional 2003; CorelDraw X3; CloneManager5
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
- NCBI-BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Sanger-Institut: <http://www.sanger.ac.uk/>
- TIGR-Institut: <http://www.tigr.org>
- *S. mansoni*-Blast: [http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s\\_mansoni/omni](http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni/omni)
- ClustalW: <http://clustalw.genome.jp>
- Multialignment: <http://prodes.toulouse.intra.fr/multalin/multalin.html>
- Promotoranalyse (MatInspector): <http://www.genomatix.de/cgi-bin/eldorado/main.pl>
- GENSCAN: <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>
- *Graphical codon usage analyser*: <http://gcua.schoedl.de/>
- SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/>
- ImageJ: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- NetPhos: [www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Laborzyklus von *Schistosoma mansoni*

Schistosomen eines liberianischen Stamms (Bayer AG, Monheim) von *Schistosoma mansoni* (Gönnert, 1955) werden im Laborzyklus in Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria glabrata* als Zwischenwirte und in syrischen Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) als Endwirten gezüchtet.

#### 2.2.1.1 Endwirtinfektion

Die Infektion der Hamster (aus der eigenen Zucht oder von Harlan) als Endwirte erfolgt durch Baden der Hamster in Cercarien-haltigem Wasser. Vor der eigentlichen Infektion werden die Hamster zum Aufweichen der Haut für etwa 40 Minuten in warmem Schneckenwasser gebadet. Die Infektion erfolgt im Schneckenwasser durch die Zugabe von 1.500 Cercarien pro Hamster. Die Hamster werden für 45 Minuten in dem Cercarien-haltigen Wasser gebadet (Dettman et al., 1989).

#### 2.2.1.2 Endwirt-Perfusion und *in vitro* - Haltung adulter Schistosomen

Innerhalb von 42 - 49 Tagen nach der Infektion der Endwirte entwickeln sich in den Hamstern adulte Schistosomen. Diese werden am 42. oder 49. Tag nach der Infektion durch Perfusion gewonnen. Hierfür werden die Hamster in einem Gefäß mit Ether-getränkten Tüchern betäubt. Anschließend erhalten sie durch Injektion in das Peritoneum eine Überdosis eines Sedativum-Gemisches (Ketamin, Xylazin). Der Brustkorb des Hamsters wird anschließend geöffnet, die inneren Organe frei gelegt und die Pfortader angeritzt. Durch den Einstich in den linken Herz-Ventrikel wird das Perfusionsmedium mit einer Kanüle in den Kreislauf geleitet. Die adulten Schistosomen werden mit dem Perfusionsmedium aus dem Gefäßsystem gespült, mit Hilfe eines Gaze-Netzes aufgefangen und mit einem Pinsel in Kulturschalen überführt. Nach der Perfusion werden sie in 60 mm Kulturschalen mit Medium M199 (inklusive NCS, HEPES und Antibiotikum/Antimycotikum-Lösung) zu jeweils 25 - 30 Würmern pro Schale gesammelt und zweimal in frisches Medium umgesetzt, um sie von Geweberesten und Hamsterhaaren zu reinigen. Die Schistosomen werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Dabei wird zweimal pro Woche das Kulturmedium gewechselt.

### 2.2.1.3 Gewinnung von Larvenstadien (Miracidien, Cercarien)

Für die Gewinnung von Miracidien (Wimpernlarven) werden die Lebern infizierter Hamster nach der Perfusion zunächst mit der Schere in  $1 \times$  PBS zerkleinert und anschließend im Mixer homogenisiert ( $3 \times$  für 1 Sekunde auf höchster Stufe). Das Homogenat wird mit  $1 \times$  PBS aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wird das Pellet in warmem  $H_2O$  resuspendiert und die Suspension in eine abgedunkelte Schlupfflasche (Erlenmeyerkolben mit Steigrohr) überführt. Das Steigrohrende wird mit Licht bestrahlt. Aus den im Leberhomogenat befindlichen Eiern schlüpfen Miracidien, die sich in Richtung der Lichtquelle bewegen. Diese werden im Steigrohr abgesammelt und können nach der Titerbestimmung direkt zur Infektion des Zwischenwirtes eingesetzt werden.

Für die Gewinnung von Cercarien werden die Schnecken 3 - 4 Wochen nach der Infektion mit Miracidien abgedunkelt und so für weitere 1 - 2 Wochen gehalten. Die Schnecken werden dann einzeln in die Vertiefungen von 12-well-Mikrotiterschalen gegeben, in denen 2 ml Schneckenwasser vorgelegt worden ist. Die Platten werden belichtet, wodurch der Cercarien-Ausstoß ausgelöst wird. Innerhalb von 3 - 4 Stunden verlassen die Cercarien phototaktisch gesteuert die Schnecke, können abgesammelt und nach der Titerbestimmung für die Endwirtinfektion eingesetzt werden.

### 2.2.1.4 *In vitro* - Generation von Muttersporocysten

Für die *in vitro* - Transformation von Miracidien zu Muttersporocysten werden die abgesammelten Miracidien in BSS (inkl. ABAM) überführt. Der Ansatz wird für 20 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Miracidien absinken. Der Überstand wird abgenommen und die Miracidien erneut mit BSS (inkl. ABAM) gewaschen. Die Waschprozedur wird nach weiteren 30 Minuten auf Eis wiederholt, wobei im letzten Waschschritt BSS ohne ABAM verwendet wird. Im Anschluss an die Waschprozedur wird der Miracidientiter bestimmt. 5.000 - 10.000 Miracidien werden in 5 ml Bge-Medium (inkl. ABAM, 1:1.000) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei  $25^\circ C$  inkubiert. Innerhalb von 12 - 16 Stunden erfolgt die Transformation der Miracidien, die ihr Wimpernepithel verlieren, zu Muttersporocysten. Diese können etwa 1 Woche in Bge-Medium gehalten werden, wobei das Medium alle 2 - 3 Tage gewechselt wird.

### 2.2.1.5 Schneckenzucht und Zwischenwirtinfektion

Als Zwischenwirte für *Schistosoma mansoni* dienen Süßwasserschnecken (*Biomphalaria glabrata*), die in belüfteten Aquarien mit speziellem Schneckenwasser bei 26°C Raumtemperatur gehalten werden. Die Schnecken unterliegen durch die Raumbeleuchtung einem konstanten Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden und werden regelmäßig mit gewaschenem Salat gefüttert.

Für die polymiracidiale (multisexuelle) Infektion von Schnecken werden diese in Vertiefungen von 12-well-Mikrotiterschalen mit Schneckenwasser vereinzelt und mit etwa 10 - 15 Miracidien pro Schnecke 12 Stunden inkubiert, bevor sie wieder in Aquarien zurück gesetzt werden. Für eine monomiracidiale (unisexuelle) Infektion wird zu jeder Schnecke, die sich in einer mit Schneckenwasser gefüllten Vertiefung einer 12-well-Mikrotiterschale befindet, jeweils nur ein einzelnes Miracidium gegeben. Die Schnecken werden nach 12 Stunden zurück in die Aquarien gesetzt. Drei Wochen nach der Infektion werden die Aquarien der infizierten Schnecken abgedunkelt und diese erst zur Freisetzung der Cercarien nach weiteren zwei Wochen wieder ans Licht gesetzt.

## 2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

### 2.2.2.1 Glycerin-Stocks von Bakterien

Für die langfristige Konservierung von Bakterien dienen Glycerin-Stocks. Für das Anlegen dieser Stocks wird zu 500 µl sterilem Glycerol jeweils 1 ml einer gut gewachsenen üN-Kultur gegeben. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

### 2.2.2.2 Flüssigkultur von Bakterien

Für die Anzucht einer üN-Kultur wird ausgehend von einer Kolonie (LB-Platte) oder einem Glycerin-Stock ein einzelner Bakterienklon in 4 - 40 ml LB-Medium, dem entsprechende Antibiotika zur Selektion hinzugesetzt werden können, angeimpft. Es folgt eine Inkubation üN bei 37°C und 200 rpm.

## 2.2.3 Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli*-Zellen (Nishimura et al., 1990) wird zunächst eine 10 ml Vorkultur von DH5α-Zellen oder XL1-Blue-Zellen in LB-Medium, dem entsprechende Antibiotika zugesetzt worden sind, angesetzt und üN inkubiert (37°C,

200 rpm). Von dieser Vorkultur wird 1 ml in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben (inkl. der entsprechenden Antibiotika) und die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert (37°C, 200 rpm). Nach Erreichen dieser OD<sub>600</sub> wird die Bakterien-Kultur für 5 Minuten auf Eis gekühlt und dann zentrifugiert (5 Minuten, 4.000 g, 4°C). Nach Entfernen des Überstandes wird das Zellpellet in eiskaltem (4°C) TFB1-Puffer (30 ml pro 100 ml Kultur) resuspendiert und die Suspension für 90 Minuten auf Eis inkubiert. Durch eine sich anschließende Zentrifugation (5 Minuten, 4.000 g, 4°C) werden die Zellen gesammelt. Das Pellet wird vorsichtig in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Von dieser Suspension Hitzeschock-kompetenter *E. coli*-Zellen werden 100 - 200 µl Aliquots hergestellt und diese zunächst in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren, bevor sie bei -80°C gelagert werden.

### 2.2.3.1 Transformation von Bakterien über Hitzeschock

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen erfolgte über Hitzeschock. Hierfür werden kompetente Zellen kurzfristig einem Temperaturschock ausgesetzt, der zur Destabilisierung und Öffnung der Bakterienzellwand und -membran führt, wodurch die Plasmid-DNA in die Zelle eindringen kann. Hierfür werden 100 - 200 µl Aliquots Hitzeschock-kompetenter *E. coli* Zellen (siehe 2.2.3) auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wird die zu transformierende Plasmid-DNA (ca. 1 - 10 ng) hinzugegeben und der Ansatz für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock für 1 Minute bei 42°C und eine sich anschließende Inkubation auf Eis für 3 Minuten. Nach der Zugabe von 600 µl LB-Medium oder SOC-Medium (ohne Antibiotika) zu den Zellen werden diese für 45 Minuten bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bevor sie auf entsprechenden LB-Selektionsplatten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert werden.

### 2.2.4 Blau-Weiß-Selektion von transformierten Bakterien

Den zur Selektion auf transformierte Bakterienzellen verwendeten LB-Platten kann neben Ampicillin auch IPTG und X-Gal hinzugesetzt werden. Der Zusatz dieser Komponenten erlaubt bei Plasmiden, die das LacZ-Gen für die β-Galaktosidase als zweiten Selektionsmarker neben der Ampicillin-Resistenz tragen (z.B. bei pDrive oder pSTBlue-1), eine Blau-Weiß-Selektion der Bakterien-Kolonien. Das Lac-Operon und damit die Transkription des LacZ-Gens wird nur in Anwesenheit eines Induktors aktiviert. Als künstlicher Induktor wurde den Platten das Lactosederivat IPTG (Isopropylthiogalactosid) hinzugesetzt, das die Transkription des LacZ-Gens ermöglicht. Durch die so

gebildete  $\beta$ -Galaktosidase wird das als künstliches Substrat hinzugesetzte X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid) gespalten; die Spaltprodukte reagieren mit Sauerstoff zu dem blauen Farbstoff Indigo. Die Bakterienkolonien, die bei der Transformation ein religiertes Plasmid aufgenommen haben, färben sich durch die Bildung des Farbstoffes blau. Die MCS (*multiple cloning site*) liegt im Bereich des LacZ-Gens, so dass dieses durch den Einbau eines Inserts unterbrochen wird und damit keine  $\beta$ -Galaktosidase mehr gebildet werden kann. Bakterienkolonien, die ein Plasmid mit Insert tragen, erscheinen auf den Platten somit weiß.

## 2.2.5 Arbeiten mit Hefen

### 2.2.5.1 Glycerin-Stocks von Hefen

Für die längerfristige Konservierung von Hefestämmen werden Glycerin-Stocks angelegt (Yeast Protocols Handbook, 2001). Hierfür wird eine einzelne Hefe-Kolonie von einer Agar-Platte gepickt und mit 200 - 500  $\mu$ l YPD-Medium oder entsprechendem SD-Selektionsmedium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Durch Vortexen werden die Zellen vereinzelt. Zu der Zellsuspension wird 50%iges Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 25% gegeben. Die Glycerin-Stocks der Hefen können bis zu einem Jahr bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Transformierte Hefestämme sollten in entsprechendem SD-Minimalmedium gelagert werden, um den Selektionsdruck auf das Plasmid aufrecht zu erhalten.

Zur Reaktivierung von Glycerin-Stocks wird ein kleiner Teil des Stocks auf einer YPD-Agar-Platte oder entsprechenden SD-Agar-Platten ausgestrichen und diese bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bis Kolonien auf der Platte erscheinen. Diese Stammpplatten der Hefen können, verschlossen mit Parafilm, bis zu zwei Monate bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.2.5.2 Flüssigkultur von Hefen

Für die Anzucht einer Flüssigkultur von Hefen wird zunächst eine Vorkultur angesetzt (Yeast Protocols Handbook, 2001). Hierfür wird eine Kolonie von einer Stammpplatte in 5 ml YPD- oder entsprechendem SD-Medium resuspendiert und die Kultur üN (16 - 18 Stunden) bei  $30^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm inkubiert. Die Kultur sollte nach dieser Inkubationszeit eine  $\text{OD}_{600}$  von über 1,5 erreicht haben; die Zellen der meisten Kulturen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der stationären Wachstumsphase. Benötigt man eine log-Phasen-Kultur wird ein Teil dieser üN-Kultur in frischem Medium auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 - 0,3 verdünnt. Diese Kultur wird dann weiter inkubiert ( $30^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm), bis eine  $\text{OD}_{600}$  von etwa 0,4 - 0,6 erreicht ist.

## 2.2.6 Transformation von Hefen

### 2.2.6.1 Herstellung kompetenter Hefekulturen für die Transformation

Zur Vorbereitung der Transformation von Hefen über die Lithium-Acetat-Methode (Yeast Protocols Handbook, 2001) werden 30 ml einer 50ml-üN-Kultur in 300 ml YPD-Medium gegeben, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 - 0,3 eingestellt. Die Kultur wird weiter bei 30°C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 erreicht worden ist. Die Hefekultur wird dann bei Raumtemperatur bei 1.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird in sterilem TE-Puffer oder dH<sub>2</sub>O resuspendiert worauf sich eine erneute Zentrifugation (5 Minuten, 1.000 g, RT) anschließt. Das Zellpellet wird dann in 1,5 ml frisch angesetztem, sterilem 1× TE/1× LiAc (1× TE-Puffer, 1× Lithiumacetat; 0,1 M) resuspendiert. Die Hefezellen sind dann kompetent für die sich anschließende Transformation.

### 2.2.6.2 Transformation von Hefen – Lithium-Acetat-Methode

Die zu transformierende Plasmid-DNA (0,1 µg) wird zusammen mit 0,1 mg Heringssperma-DNA als Träger-DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Zu diesem Gemisch werden 0,1 ml der kompetenten Hefezellen gegeben, der Ansatz gut gevortext und 0,6 ml sterile PEG/LiAc-Lösung (Polyethylenglycol-Lithium-Acetat-Lösung) hinzu gegeben. Der Transformations-Ansatz wird auf höchster Stufe 10 Sekunden gevortext und anschließend 30 Minuten bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Vor dem Hitzeschock, durch den die DNA in die Zellen eindringen kann, werden zu dem Ansatz 70 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) gegeben. Der Hitzeschock erfolgt für 15 Minuten bei 42°C im Wasserbad, woraufhin der Ansatz für 2 Minuten auf Eis gehalten wird. Es folgt eine Zentrifugation (5 Sekunden, 13.000 rpm, RT), nach der das Zell-Pellet in 500 µl sterilem 1× TE-Puffer resuspendiert wird. 100 - 500 µl dieser Zellsuspension werden auf SD-Platten ausplattiert, um auf das Vorhandensein des entsprechenden Plasmides zu selektionieren. Die SD-Platten werden bei 30°C 2 - 4 Tage inkubiert, bis Hefekolonien auf den Platten sichtbar werden. Um Hefen mit zwei verschiedenen Plasmiden zu transformieren, werden 0,1 µg von jedem Plasmid mit 0,1 mg Heringssperma-DNA gemischt und zu den kompetenten Hefezellen gegeben. Nach erfolgter Transformation werden 200 - 500 µl der Hefen auf entsprechenden SD-Selektionsplatten ausgestrichen, durch die auf das Vorhandensein beider Plasmide selektioniert wird.

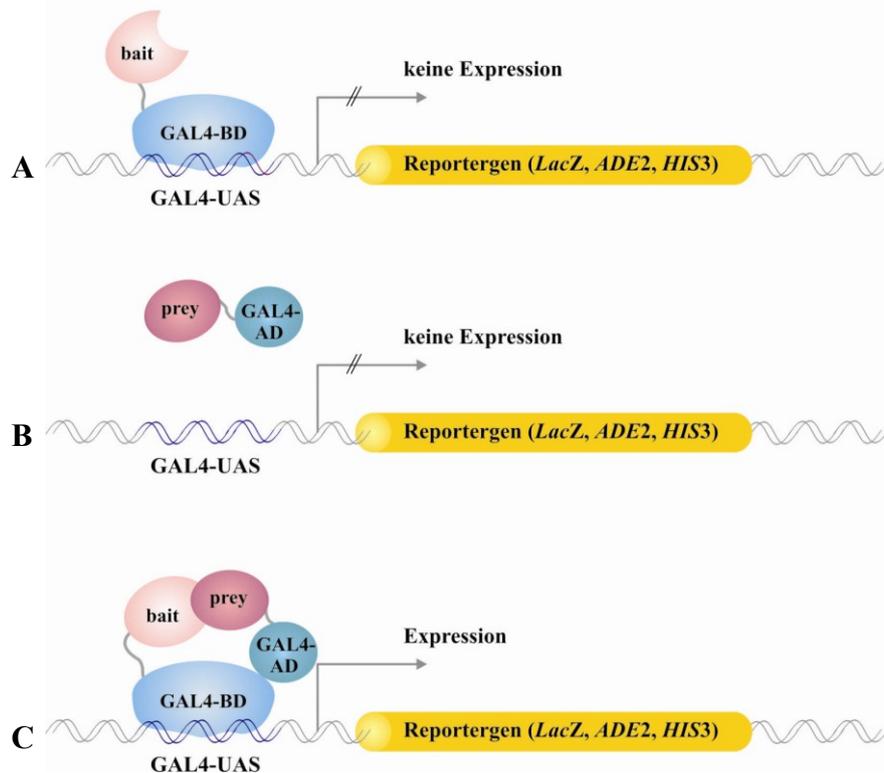
### 2.2.7 Yeast Two-Hybrid System

Mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems (Hefe-Zwei-Hybrid-System, YTH-System) ist es möglich, die Interaktion von zwei Proteinen *in vivo* zu untersuchen (Chien et al., 1991). Das in dieser Arbeit verwendete Yeast Two-Hybrid System (Matchmarker II, Clontech) basiert auf dem Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4, der zwei separate Funktionen in zwei Domänen beinhaltet; eine DNA-Bindedomäne (BD) und eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD). Für das Yeast Two-Hybrid System wurden diese beiden Domänen, und damit die beiden Funktionen des GAL4-Transkriptionsfaktors getrennt. Die DNA-Bindedomäne oder die Aktivierungsdomäne allein sind nicht in der Lage, die Transkription von Genen zu aktivieren. Erst wenn beide Domänen in physikalischen Kontakt kommen, wird ein aktiver Transkriptionsfaktor gebildet, der an die GAL4-UAS (*upstream activating sequence*) bindet, um die Transkription nachgeschalteter Gene zu initiieren. Die beiden Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors können in Kontakt gebracht werden, indem chimäre Fusionsproteine gebildet werden, die aus einer der beiden Domänen und je einem weiteren Protein oder Teilprotein bestehen. Interagieren die beiden Proteine, die mit den Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert sind, so treten die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne in physikalischen Kontakt. Es entsteht ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Reportergenen aktiviert. Hierfür werden in der Regel Auxotrophie-Gene für eine Wachstums-Selektion (*ADE2*, *HIS3*) oder Reportergene für die Farb-Selektion (*LacZ*) verwendet. Der große Vorteil des Yeast Two-Hybrid Systems liegt in der Kombination von Wachstums-Selektion und der Verwendung einer komplexen cDNA-Bibliothek, die für Millionen potentieller Interaktionspartner kodiert. Nur jene Klone, die für ein mit dem sogenannten „Köder-Protein“ (*bait*) interagierendes Protein kodieren, überleben die Wachstumsselektion und können zudem noch über  $\beta$ -Galaktosidase-Farbassays untersucht werden.

Der erste Schritt eines Yeast Two-Hybrid Screenings ist die Klonierung des *bait*-Vektors („Köder-Plasmid“). Hierbei wird die für das *bait*-Protein kodierende cDNA-Sequenz im selben Leseraster (*in frame*) hinter die Sequenz kloniert, die für die DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors kodiert. Auf diese Weise entsteht ein Fusionsprotein aus dem *bait*-Protein und der DNA-Bindedomäne. Da das *bait*-Protein allein nicht in der Lage sein sollte, die Transkription der Reportergene (*LacZ*, *ADE2*, *HIS3*) in der Hefe zu aktivieren, können die Hefen nicht auf Agar-Platten wachsen, denen z.B. Histidin im Medium fehlt, und sich nicht blau färben (Abbildung 2.1 A).

Der zweite Schritt eines Yeast Two-Hybrid Screenings ist die Klonierung einer cDNA-Bibliothek, die für potentielle Interaktionspartner („Beute“, *prey*) kodiert, in den *prey*-Vektor („Beute-Plasmid“). Die DNA-Sequenzen für die *prey*-Proteine werden so in den Vektor kloniert, dass sie im selben Leseraster hinter der Sequenz für die Transkriptions-Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors liegen und sich damit ein Fusionsprotein mit der GAL4-AD ergibt. Da auch das *prey*-Protein allein nicht in der Lage sein sollte, die Transkription der Reportergene (*LacZ*, *ADE2*, *HIS3*) zu aktivieren, können die entsprechenden Hefen ebenfalls nicht auf Agar-Platten ohne z.B. Histidin wachsen und sich nicht blau färben (Abbildung 2.1 B).

Interagieren jedoch die beiden Proteine, die mit der BD- und der AD-Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert sind, so bilden die physikalisch verknüpfte DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor. Durch diesen kommt es zur Transkription der Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *LacZ*, was in einer Adenin- und Histidin-Prototrophie sowie in der Fähigkeit zur X-Gal-Substrat-Spaltung (Blaufärbung der Hefen) resultiert (Abbildung 2.1 C).



**Abbildung 2.1:** Prinzip des auf GAL4 basierenden Yeast Two-Hybrid Systems (Clontech, Matchmarker II)

Nur bei einer Interaktion von *bait*- und *prey*-Protein wird ein aktiver GAL4-Transkriptionsfaktor, bestehend aus der GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-BD) und der GAL4-Transkriptionsaktivierungsdomäne (GAL4-AD), gebildet und die Reportergene können transkribiert werden. [nähere Erläuterungen zu den Abbildungen A - C siehe Text]

### 2.2.7.1 Screening einer GAL4-AD-Fusionsprotein-Bank durch Mating

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Yeast Two-Hybrid Screenings wurde eine bereits vorliegende GAL4-AD-Fusionsproteinbank genutzt (enthält die *prey*-Plasmide) (Knobloch, 2002), um mit *bait*-Proteinen nach Interaktionspartnern zu suchen. Für die Durchführung des Yeast Two-Hybrid Screenings müssen zunächst *bait*- und *prey*-Plasmid in einem Hefestamm vereinigt werden. Das erfolgt durch die Verwendung verschiedener Paarungstypen (Mat a, Mat  $\alpha$ ) und ihrer Paarung (Mating). In den durchgeführten Screenings wurde der Hefestamm Y187 (Mat  $\alpha$ ) mit den *bait*-Plasmiden transformiert, während die *prey*-Plasmide, die die cDNA-Fragmente aus der *S. mansoni*-Genbank enthalten, bereits in dem Hefestamm AH109 (Mat a) transformiert vorlagen (Knobloch, 2002). Beide verwendeten Hefestämme sind Histidin- und Adenin-auxotroph, also nicht in der Lage, diese Aminosäuren selber zu synthetisieren. Sie besitzen aber die zur Synthese von Histidin und Adenin benötigten Gene (*HIS3*, *ADE2*) unter der Promotor-Kontrolle der GAL4-UAS in ihrem Genom integriert. Bei einer Interaktion zwischen *bait*- und *prey*-Plasmid kommt es zur Transkription dieser Reportergene, was den entsprechenden Hefen das Wachstum auf Selektionsplatten ermöglicht, denen die Aminosäuren Histidin und Adenin fehlen. Im Rahmen der durchgeführten Screenings erfolgte die Selektion positiver Klone nicht nur auf Histidin und Adenin, sondern zusätzlich auch auf Tryptophan und Leucin. Tryptophan dient hierbei als Selektionsmarker für die Anwesenheit des *bait*-Plasmides, Leucin in gleicher Weise als Selektionsmarker für das *prey*-Plasmid.

Das Mating wurde entsprechend des Benutzerhandbuches (Matchmaker Library Construction & Screening Kit User Manual, 2001; Knobloch, 2002) von Clontech durchgeführt. Das *bait*-Plasmid wird zunächst in den Hefestamm Y187 transformiert und von den erhaltenen Klonen dann eine 50 ml Kultur (SD-Trp-Medium, + Kanamycin 20  $\mu\text{g/ml}$ ) bis zu einer Zellzahl von mindestens  $1 \times 10^9$  Zellen/ml angezogen, die Zellen pelletiert und in 5 ml des Mediums wieder resuspendiert. Ein 1 ml - Aliquot der Genbank (in AH109) wird bei Raumtemperatur aufgetaut. Um die Zellzahl in der Bank zu bestimmen, wird ein 10  $\mu\text{l}$  - Aliquot entnommen und hiervon 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 Verdünnungen angefertigt, von denen jeweils 100  $\mu\text{l}$  auf SD-Platten ohne Leucin ausplattiert werden. Die Platten werden bei 30°C inkubiert bis Kolonien erscheinen; diese werden gezählt und hieraus die Anzahl von Klonen in der Bank ermittelt; die Anzahl sollte  $> 2 \times 10^7$  Zellen/ml betragen.

Für das eigentliche Mating wird der Rest des aufgetauten Genbank-Aliquots (*prey*-Kultur; AH109) mit der 5 ml-Kultur des *bait*-Plasmid-tragenden Stammes (*bait*-Kultur; Y187) in einem sterilen 2 l Erlenmeyerkolben vereinigt und mit 45 ml  $2 \times$  YPD-Medium +

Kanamycin (50 µg/ml) versetzt. Diese Mating-Kultur wird für 20 - 24 Stunden bei 30°C und 30 - 50 rpm inkubiert. Nach 20 Stunden wird ein Aliquot der Mating-Kultur entnommen und unter dem Mikroskop kontrolliert. Enthält diese noch Zygoten, wird das Mating für weitere 4 Stunden fortgesetzt. Anderenfalls wird die Kultur direkt weiter verarbeitet. Zum Sammeln der Zellen wird die Mating-Kultur zentrifugiert (10 Minuten, 1.000 g). Der Kolben der Mating-Kultur wird zweimal mit 50 ml 0,5× YPD-Medium + Kanamycin (50 µg/ml) ausgespült und mit den Spüllösungen das Zellpellet resuspendiert. Es wird erneut zentrifugiert (10 Minuten, 1.000g), bevor das Pellet in 10 ml 0,5× YPD-Medium + Kanamycin (50 µg/ml) resuspendiert wird (das Volumen der Zellsuspension wird notiert, da dieser Wert später für die Berechnung der Anzahl gescreenter Klone benötigt wird).

Für die Selektion diploider Hefezellen, die ein mit dem *bait*-Protein interagierendes Protein enthalten, werden jeweils 200 µl der Zellsuspension auf 150 mm - SD-Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (SD-Trp/-Leu/-His) ausgestrichen und die Platten bei 30°C für mindestens 5 Tage inkubiert. Sichtbare Kolonien werden nach dieser Inkubation auf SD-Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin (SD-Trp/-Leu/-His/-Ade) ausgestrichen und diese für 5 bis 8 Tage bei 30°C inkubiert. Auf diesen Platten gewachsene Klone sind Ade<sup>+</sup> und His<sup>+</sup> und enthalten damit Proteine, die mit dem *bait*-Protein interagieren.

### 2.2.7.2 Ermittlung der Mating-Effizienz

Für die Ermittlung der Mating-Effizienz des *bait*- und des *prey*-Plasmid tragenden Hefestammes, werden 1:10.000, 1:1.000, 1:100 und 1:10 - Verdünnungen der Mating-Kultur je auf drei verschiedenen 100 mm - SD-Selektionsplatten ausplattiert (SD-Leu; SD-Trp; SD-Leu/-Trp). Diese werden für 5 Tage bei 30°C inkubiert und der cfu-Wert (*colony forming unit*; Anzahl der Kolonien pro Platte) für jeden Selektionstyp bestimmt. Hieraus wird die Anzahl lebender cfu/ml nach der folgenden Formel berechnet (Matchmaker Library Construction & Screening Kit User Manual, 2001):

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{cfu} \times 1.000 \text{ } \mu\text{l/ml}}{\text{ausplattiertes Volumen (}\mu\text{l)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Der cfu/ml-Wert für die SD-Leu-Platten gibt dabei die Überlebensrate des Y187-Partners an, der cfu/ml-Wert auf den SD-Trp-Platten die Überlebensrate für den AH109-Partner und der cfu/ml-Wert auf den SD-Trp/-Leu-Platten die Überlebensrate für die Diploiden. Der cfu/ml-

Wert der beiden Mating-Partner wird verglichen; der Partner mit dem geringeren Wert war der „limitierende Faktor“ bei dem durchgeführten Mating. Für ein optimales Mating sollte der AH109-Partner, also die gescreente Bank, der limitierende Faktor sein; hierdurch wäre sicher gestellt, dass die maximale Anzahl an Hefezellen der Bank einen Mating-Partner gefunden hat. Die Mating-Effizienz wird in dem Prozentsatz an Diploiden angegeben, der nach folgender Formel berechnet wird (Matchmaker Library Construction & Screening Kit User Manual, 2001):

$$\% \text{ Diploide} = \frac{\text{cfu/ml-Wert der Diploiden}}{\text{cfu/ml-Wert des limitierenden Partners}}$$

Die Mating-Effizienz sollte über 2% liegen; ist dies nicht der Fall, sollte das Screening mit einem neuen 1 ml - Aliquot der GAL4-AD-FusionsproteinBank wiederholt werden. Nach erfolgreichem Mating lässt sich die Anzahl der gescreenten Klone mit folgender Formel berechnen (Matchmaker Library Construction & Screening Kit User Manual, 2001):

$$\text{Anzahl gescreenter Klone} = \text{cfu/ml-Wert der Diploiden} \times \text{Resuspensionsvolumen}$$

### 2.2.8 $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Kolonie-Filter-Assay (Breedon & Nasmyth, 1985) dient in einem Yeast Two-Hybrid Screening der Überprüfung von Klonen, die die *HIS3-/ADE2*-Selektion überlebt haben. Diese Klone werden mittels des Assays auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und damit auf die Expression des *LacZ*-Gens hin überprüft. Diese wird hierbei durch die Umsetzung des Substrates X-Gal durch die vom *LacZ*-Gen kodierte  $\beta$ -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff sichtbar.

Für den Filterassay wird Whatman-Filterpapier in Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkt und in 20 mm-Petrischalen gelegt. Passend geschnittene, sterile Whatman-Filterpapierstreifen werden mit einer Pinzette auf die Oberfläche der Platten gedrückt, die die zu analysierenden Kolonien enthalten. Hierdurch wird ein Teil der Kolonien auf die Filterpapierstreifen überführt. Die Lage des Filters auf den Platten wird markiert, um eine spätere Zuordnung der Klone zu ermöglichen. Die Filterpapierstreifen werden für 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Durch diesen Prozess werden die Zellwände der Hefezellen aufgeschlossen. Die Filterpapierstreifen werden dann vorsichtig mit der Kolonie-Seite nach oben, luftblasenfrei auf die mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkten Whatman-Filter gelegt. Die Filter werden bei 30°C inkubiert und

regelmäßig auf eine Blaufärbung der Kolonien hin untersucht. Diejenigen Hefe-Klone, bei denen es zu einer Aktivierung des *LacZ*-Reportergens kommt, bilden eine aktive  $\beta$ -Galaktosidase, die das in der Z-Puffer/X-Gal-Lösung enthaltene Substrat spaltet. Die Spaltprodukte reagieren mit Sauerstoff zu dem blauen Farbstoff Indigo. Klone mit einer positiven Interaktion sind somit an der Blaufärbung der Kolonien zu erkennen. Mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidase-Kolonie-Filter-Assay lässt sich die Qualität der Interaktion zweier Proteinen überprüfen.

### 2.2.9 $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigkulturassay

Zur Quantifizierung der Interaktion dient der sensitivere  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigkultur-Assay (Yeast Protocols Handbook, 2001). Im Gegensatz zum Filterassay ist das Substrat für die  $\beta$ -Galaktosidase hierbei nicht X-Gal, sondern ONPG, dessen Umsetzung zu o-Nitrophenol und D-Galaktose durch eine Gelb-Färbung der Proben sichtbar wird und photometrisch messbar ist. Für den  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigkultur-Assay wird eine 5 ml  $\bar{u}$ N-Kultur der Hefen in entsprechendem SD-Selektionsmedium angezogen. Von dieser Kultur werden 2 ml in 8 ml YPD-Medium gegeben. Die Kultur wird bei 30°C und 200 rpm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 - 0,8 pro ml Kultur angezogen und der exakte  $OD_{600}$ -Wert notiert. Während der Inkubationszeit wird ONPG in einer Konzentration von 4 mg/ml Z-Puffer gelöst und für 1 - 2 Stunden gerührt. Hat die Hefekultur die erforderliche  $OD_{600}$  erreicht, werden je 1,5 ml der Kultur in drei 1,5 ml-Reaktionsgefäße gegeben und diese für 30 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände werden entfernt und die Zell-Pellets in 1,5 ml Z-Puffer resuspendiert. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm), nach der die Pellets in 300  $\mu$ l Z-Puffer resuspendiert werden (hieraus ergibt sich ein Konzentrierungsfaktor von  $1,5/0,3 = 5$ ). Diese Suspensionen werden in 0,1 ml - Aliquots in frische Reaktionsgefäße überführt und die Ansätze für je 1 Minute in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Zyklus aus Einfrieren und Auftauen wird noch zweimal wiederholt.

Als Referenz (*blank*-Wert) für die spätere photometrische Messung der Proben werden 100  $\mu$ l Z-Puffer in ein Reaktionsgefäß überführt und im Folgenden wie die Proben-Ansätze weiter behandelt. Der Start der enzymatischen Reaktion erfolgt durch die Zugabe von 700  $\mu$ l Z-Puffer +  $\beta$ -Mercaptoethanol (270  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol pro 100 ml Z-Puffer) zu den Proben-Ansätzen und dem *blank*-Ansatz. Die Zeitmessung wird gestartet, sofort 160  $\mu$ l ONPG in Z-Puffer als Substrat hinzugesetzt und die Ansätze bei 30°C inkubiert. Sobald sich

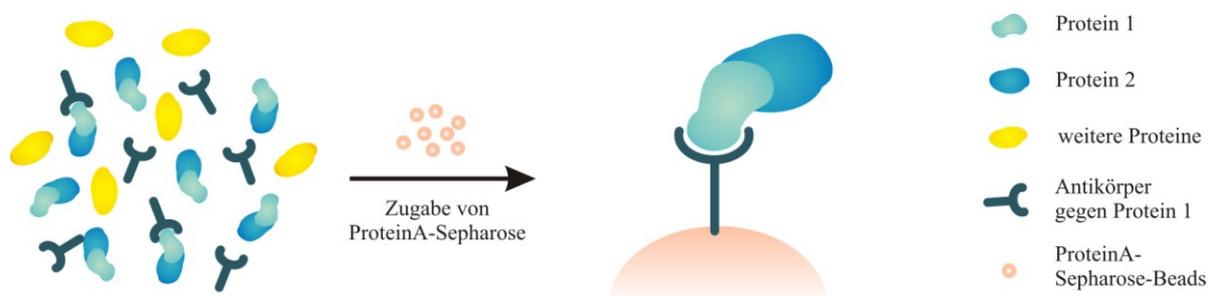
eine Gelbfärbung der Proben (einige Minuten - 24 Stunden bei schwächeren Interaktionen) einstellt, wird die Reaktion durch die Zugabe von 400 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zu den Proben-Ansätzen und dem *blank*-Ansatz gestoppt und die gemessene Inkubationszeit notiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion werden die Ansätze für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Überstände in saubere Küvetten überführt. Die Proben werden bei 420 nm (OD<sub>420</sub>) gegen die Referenz-Probe (*blank*-Probe) gemessen. Die gemessenen OD<sub>420</sub>-Werte sollten zwischen 0,02 und 1,0 liegen, um im linearen Messbereich des Assays zu liegen. Ist dies nicht der Fall, werden die Proben entsprechend verdünnt. Aus den gemessenen Werten werden die β-Galaktosidase-Units nach der folgenden Formel berechnet. Eine Unit β-Galaktosidase ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol ONPG pro Minute und pro Zelle zu o-Nitrophenol und D-Galaktose hydrolysiert (Miller, 1972; Miller, 1992).

$$\beta\text{-Galaktosidase-Units} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{(t \times V \times \text{OD}_{600})}$$

[t = Inkubationszeit der Proben (in min); V = 0,1 ml × Konzentrationsfaktor (hier: 5); OD<sub>420</sub> = Absorption der Probe bei 420 nm; OD<sub>600</sub> = gemessene Absorption bei 600 nm von 1 ml Kultur]

### 2.2.10 Co-Immunopräzipitation in Hefe

Mit Hilfe der Immunopräzipitation können spezifische Proteine durch die Zugabe eines entsprechenden Antikörpers aus einem Gesamtlysat isoliert werden. Dabei wird der Fc-Teil des Antikörpers an unlösliches Trägermaterial wie Protein A-Sepharose-Beads gekoppelt. An das Protein in einem Komplex assoziierte, weitere Proteine werden dabei ebenfalls isoliert (Co-Immunopräzipitation; Ausubel et al., 2006; Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2:** Prinzip der Co-Immunopräzipitation

Ein Proteinlysat wird mit einem gegen das Protein 1 gerichteten, spezifischen Antikörper inkubiert. Der Antikörper bindet an das Protein. Durch die Zugabe von Protein A-Sepharose-Beads kann der Komplex aus Antikörper und Protein präzipitiert werden. Mit dem Protein 1 in einem Komplex assoziierte Proteine (Protein 2) werden dabei co-präzipitiert.

Zur Vorbereitung der Hefekulturen werden Hefen des Stamms YPH501 mit einem pESC-His-Konstrukt (Stratagene) transformiert, das über zwei MCS (*multiple cloning sites*) für die beiden zu untersuchenden Proteine kodiert. Die Selektion der Hefen erfolgt auf SD-His-Selektionsplatten. Erhaltene Klone werden zunächst in SD-His-Flüssigmedium üN angezogen (30°C, 150 rpm). Die Zellen der üN-Kultur werden zur Induktion der Expression durch Galaktose in SG -His-Flüssigmedium überführt. Die Expression erfolgt üN (30°C, 150 rpm).

Zur Präparation von Hefe-Lysaten wird eine 10 mL üN-Kultur des Hefeklones durch Zentrifugation (1 Minute, 14.000 rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für den Aufschluss der Zellen werden 150 µl „low salt“ Lysispuffer sowie 150 µl Glasperlen (*acid washed*, 0,5 mm, Sigma) hinzugegeben und 90 Sekunden gevortext. Das Lysat wird für 5 Minuten auf Eis gestellt, bevor es für weitere 90 Sekunden gevortext wird. Um die Glasperlen zu entfernen, schließt sich eine Zentrifugation an (1 Minute, 14.000 rpm, 4°C), nach der der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wird. Das Lysat wird erneut zentrifugiert (5 Minuten, 14.000 rpm, 4°C), um Zelltrümmer zu pelletieren und schließlich auf Eis gestellt. Für eine Western-Blot-Analyse werden 25 - 50 µl des Überstandes mit SDS-Probenpuffer gemischt und bis zur Analyse bei -80°C verwahrt. 75 - 100 µl des verbleibenden Überstandes werden mit 25 µl 2 M Sucrose vorsichtig gemischt. Die Proteinkonzentration unterschiedlicher Lysate werden über einen Bradford-Assay bestimmt (vgl. 2.2.11.4) und die Proben mit „low salt“ Lysispuffer auf gleiche Konzentrationen eingestellt, so dass alle Lysate die Konzentration der meist verdünnten Probe haben. An diesem Punkt können die Lysate bei -80°C gelagert werden.

Zur Äquilibrierung der Protein A-Sepharose wird 50% (w/v) Protein A-Sepharose (Amersham) in „low salt“ Lysispuffer gelöst und für 5 Minuten bei RT zum Quellen inkubiert. Die Äquilibrierung mit „low salt“ Lysispuffer wird dreimal wiederholt (Zentrifugation für 1 Minute bei 3.000 rpm). Die Sepharose wird final im entsprechenden Volumen „low salt“ Lysispuffer aufgenommen. Bei den Protein A-Sepharose-Beads handelt es sich um sehr kleine, unlösliche, kugelförmige Zuckerstrukturen einer Dichte >1, die mit ProteinA aus *Staphylococcus aureus* Stämmen ummantelt sind. Das ProteinA ist in der Lage, die Fc-Enden von Antikörpern des IgA-, IgM- und IgG-Typs zu binden.

Für die Vorinkubation mit Protein A-Sepharose werden 70 µl des Hefelysates (s.o.) mit 30 µl der Protein A-Sepharose-Lösung inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen (30 min, 4°C, Schwenker). Die Sepharose wird schließlich abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben.

Für die Antikörper-Antigen-Bindung wird zu dem Lysat eine definierte Menge (1 - 4 µg) eines spezifischen Antikörpers, verdünnt in „low salt“ Lysispuffer (Gesamtvolumen 10 µl) gegeben. Die Antikörper-Antigen-Bindung erfolgt bei 4°C unter Schwenken für 1,5 - 12 Stunden. Als Kontrolle wird hierbei eine Probe ohne Antikörper angesetzt.

Für die Bindung des Antikörper-Antigen-Komplexes an Protein A-Sepharose werden zu den Ansätzen jeweils 50 µl der Protein A-Sepharose-Lösung hinzugegeben und für weitere 2 Stunden auf dem Schwenker bei 4°C inkubiert.

Zur Aufreinigung der Immunopräzipitate werden die Ansätze zentrifugiert (15 Sekunden, 3.000 rpm) und die Überstände verworfen. Die Protein A-Sepharose-Beads werden dreimal mit je 400 µl „Bead“ Puffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Die Resuspension der Beads erfolgt schließlich in 30 µl 2× SDS-Probenpuffer. Die Beads werden für 5 Minuten bei 98°C gekocht, zentrifugiert (15 Sekunden, 14.000 rpm) und der Überstand für eine Analyse über SDS-PAGE und Western-Blot verwendet.

## **2.2.11 Isolation und Analyse von Proteinen**

### **2.2.11.1 Isolation von Proteinen aus Hefen**

Die zwei wichtigsten Aspekte der Isolation von Proteinen aus Hefen (Yeast Protocols Handbook, 2001) sind zum einen die Zerstörung der Hefen-Zellwände und zum zweiten die Inhibierung der vielen endogenen Hefe-Proteasen. Die Zellwände von Hefen sind stark und müssen daher durch eine Kombination physikalischer und chemischer Methoden aufgeschlossen werden. Die endogenen Proteasen der Hefen müssen bei dem Aufschluss der Zellen durch einen Cocktail von Proteaseinhibitoren unterdrückt werden.

### **2.2.11.2 Präparation von Hefekulturen für die Proteinextraktion**

Für die Isolation von Proteinen aus transformierten Hefe-Stämmen werden, ausgehend von einer Einzel-Kolonie, zunächst 5 ml üN-Kulturen in dem entsprechenden SD-Selektionsmedium angesetzt. Als Negativ-Kontrolle wird eine 10 ml üN-Kultur des nicht-transformierten Stammes in YPD-Medium angesetzt. Diese üN-Kulturen werden für eine Minute gevortext, um die Hefezellen zu vereinzeln. Für jeden zu analysierenden Klon sowie für die Negativ-Kontrolle werden 50 ml-Kulturen (in YPD-Medium) mit der gesamten üN-Kultur angesetzt. Die Kulturen werden weiter inkubiert (30°C, 200 rpm) bis sie eine OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 erreicht haben. Ausgehend von der gemessenen OD<sub>600</sub> wird die Gesamtzahl der OD<sub>600</sub>-Einheiten bestimmt, in dem die gemessene OD<sub>600</sub> von 1 ml Kultur mit

dem Gesamt-Volumen der Kultur multipliziert wird. Die Hefekulturen werden in 100 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis abgekühlt und die Hefezellen durch eine sich anschließende Zentrifugation (5 Minuten, 1.000 g, 4°C) gesammelt. Das Zellpellet wird nach Verwerfen des Überstandes in 50 ml eiskaltem dH<sub>2</sub>O resuspendiert und anschließend noch einmal zentrifugiert (5 Minuten, 1.000 g, 4°C). Nach Entfernung des Überstandes wird das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und kann bis zur Isolation der Plasmide bei -80°C gelagert werden.

### 2.2.11.3 Präparation von Proteinextrakten - Urea/SDS-Methode

Für die eigentliche Isolation der Proteine über die Urea-SDS-Methode (Yeast Protocols Handbook, 2001) wird zunächst der Aufschlusspuffer frisch angesetzt und auf 60°C vorgewärmt. Es sollte hierbei jeweils nur soviel Puffer vorbereitet werden, wie direkt verbraucht wird, da das im Puffer enthaltene PMSF schnell degradiert. Pro 7,5 OD<sub>600</sub>-Einheiten von Hefezellen werden 100 µl Aufschlusspuffer verwendet. Die eingefrorenen Zellpellets werden separat in dem vorgewärmten Puffer resuspendiert. Um das Lösen der Zellpellets zu beschleunigen, können die Ansätze bei 60°C inkubiert werden. Allerdings sollte diese Inkubation 2 Minuten nicht überschreiten, um dem Risiko der Proteolyse zu entgehen. Aufgrund der schnellen Degradation des PMSF werden zu jedem Aliquot Zellen je 1 µl 100× PMSF pro 100 µl Aufschlusspuffer gegeben; dieser Vorgang wird bis zum Ende der Prozedur alle 7 Minuten wiederholt. Die Zellsuspensionen werden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in denen jeweils 80 µl Glasperlen pro 7,5 OD<sub>600</sub>-Einheiten Hefezellen vorgelegt sind. Die Ansätze werden für 10 Minuten bei 70°C erhitzt, um Membran-assoziierte Proteine für die Isolation zu bewahren. Anschließend werden die Ansätze 1 Minute gevortext und die Zellreste und nicht-aufgeschlossene Zellen durch eine Zentrifugation (5 Minuten, 13.000 rpm, 4°C) pelletiert. Die Überstände werden in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis verwahrt (1. Überstände). Die Pellets werden wie folgt weiterbehandelt: Inkubation für 3 - 5 Minuten bei 100 °C im Wasserbad, 1 Minute Vortexen und Zentrifugation (5 Minuten, 13.000 rpm, 4°C) zur Pelletierung von Zellresten und nicht-aufgeschlossenen Zellen. Die Überstände werden erneut in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis verwahrt (2. Überstände). Die Protein-haltigen Überstände (jeweils 1. und 2. Überstände) des jeweiligen Ansatzes werden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben auf ein SDS-Gel werden diese für 5 Minuten aufgekocht.

#### 2.2.11.4 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay (Bradford, 1976) beruht auf der Bindung des im Bradford-Reagenz enthaltenen Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine; das Coomassie bindet hierbei hauptsächlich an basische (besonders Arginin) und aromatische Aminosäurereste. Coomassie Brilliant Blue G-250 tritt in drei verschiedenen Formen auf: der kationischen (rot), der neutralen (grün) und der anionischen (blau). Unter sauren Bedingungen liegt das Coomassie hauptsächlich in der zweifach protonierten kationischen Form vor ( $A_{\max} = 470 \text{ nm}$ ). Bindet das Coomassie an Proteine, wird es in die stabile unprotonierte Form ( $A_{\max} = 595 \text{ nm}$ ) umgewandelt. Diese unprotonierte Form des Coomassie Brilliant Blue G-250 wird im Bradford-Assay bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Je mehr Protein in der Probe enthalten ist, desto mehr Coomassie liegt in der unprotonierten Form vor und desto höher die Absorption der Probe bei 595 nm.

Für den Bradford-Assay wird ein Aliquot der Proteinlösung (2 - 100  $\mu\text{l}$ ) mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 800  $\mu\text{l}$  Endvolumen versetzt. Zu dieser Proteinlösung werden 200  $\mu\text{l}$  des Bradford-Reagenz (Carl Roth) gegeben und die Proben für 10 Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend werden die Proben im Spektralphotometer gegen eine Referenz (Wasser + Bradford-Reagenz) bei 595 nm gemessen. Um aus der gemessenen Absorption der Probe bei 595 nm die Proteinmenge bestimmen zu können, wird die gemessene Absorption mit einer Eichgerade verglichen. Diese Eichgerade wird mit BSA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration erstellt.

#### 2.2.11.5 Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld erfolgt über eine SDS-PAGE (*Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid Gelelectrophoresis*) (Laemmli, 1970). Hierbei werden die Proteine in einer Polyacrylamid-Gel-Matrix allein nach der Größe der Proteine aufgetrennt, unabhängig von ihrer Nettoladung. Dies wird durch die Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat; *sodium dodecylsulfate*), einem anionischen Detergenz, erreicht. Es denaturiert die Proteine, wobei sich etwa alle zwei Aminosäuren ein Molekül SDS an das Protein anlagert. Zur Denaturierung der Proteine in Vorbereitung für die SDS-PAGE werden diese im Überschuss mit einem SDS- und  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen Probenpuffer versetzt und aufgeköcht. Hierbei werden Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen und das Strecken der Moleküle aufgelöst. Durch das zugesetzte  $\beta$ -Mercaptoethanol werden zusätzlich Disulfidbrücken im Protein reaktiv gespalten. Die Proteine liegen nach dem Aufkochen in Probenpuffer in einer

denaturierten Form vor und haben eine einheitliche negative Nettoladung durch die angelagerten SDS-Moleküle, so dass die Auftrennung bei der sich anschließenden SDS-Gelelektrophorese allein nach der Masse der Proteine erfolgt. Die Proteine wandern bei der Elektrophorese mit einer Geschwindigkeit durch die Polyacrylamid-Matrix, die proportional ist zum Logarithmus ihrer Masse.

Für die SDS-Gelelektrophorese werden zwei Gele zwischen zwei gereinigte und durch Spacer voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Zunächst wird ein Trenngel gegossen (Zusammensetzung s.u.) und mit n-Butanol (wassergesättigt) überschichtet. Die Prozentigkeit des Trenngels (6% - 13%) richtet sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. Nachdem das Trenngel vollständig auspolymerisiert ist, wird das Butanol abgegossen und mit Wasser nachgespült. Anschließend wird das Sammelgel (Zusammensetzung s.u.) auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisierung des Gels wird dieses in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt, die mit 1× SDS-Laufpuffer gefüllt wird. Die Proteine werden mit 5× SDS-Probenpuffer (Endkonzentration 1×) für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt, bevor sie auf das Gel aufgetragen werden. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode.

Das Trenn- und Sammelgel für eine SDS-PAGE setzen sich wie folgt zusammen:

Prozentigkeit	Trenngel							Sammelgel
	6	7	8	9	10	12	13	3,9
Polyacrylamid-Lösung [ml]	3	3,5	4	4,5	5	6	6,5	0,65
Sammelgel-/Trenngelpuffer [ml]	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	1,25
dH <sub>2</sub> O [ml]	8,25	7,75	7,25	6,75	6,25	5,25	4,75	3,05
+ 50 µl 10% APS, 10 µl TEMED								

### 2.2.11.6 Färbung von Proteinen in der SDS-PAGE

Proteine, die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, werden durch eine Inkubation des Gels in einer Färbelösung sichtbar gemacht. Zu den am häufigsten verwendeten Methoden zählt dabei die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250, mit der Proteinbanden mit mehr als 50 ng Protein detektiert werden können. Hierfür werden die SDS-Gele in der Coomassie-Färbelösung für 2 Stunden (bis üN, RT) unter leichtem Schwenken

inkubiert. Dabei lagert sich der Farbstoff unspezifisch an die Proteine an. Da zunächst auch der Gel-Hintergrund gefärbt wird, muss das Gel anschließend in dem Coomassie-Entfärber inkubiert werden (1 - 2 Stunden, RT), bis der Hintergrund wieder klar wird.

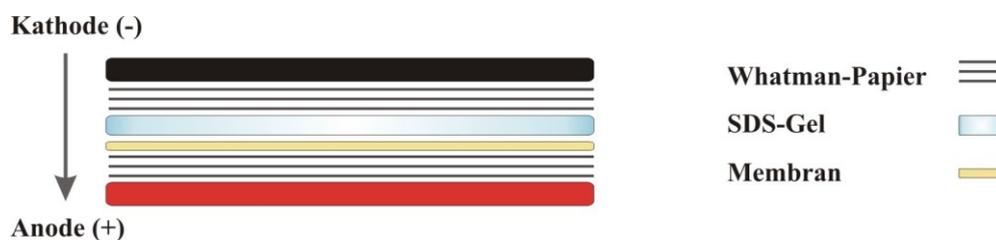
Alternativ können Proteine in SDS-Gelen auch mit kommerziell erhältlichen Coomassie-Lösungen wie z.B. Roti®-Blue (Carl Roth) gefärbt werden. Dieser Farbstoff bindet aufgrund seiner kolloidalen Eigenschaften mit hoher Spezifität an die Proteine und nur minimal an die Gelmatrix. Somit ist keine Entfärbung des Gels notwendig. Durch diese Färbemethode können Proteinmengen von weniger als 30 ng angefärbt werden, da der Farbstoff sensitiver ist als Standard-Coomassie-Lösungen. Die Färbelösung wird nach den Angaben des Herstellers (Carl Roth) eingesetzt und das Gel unter leichtem Schütteln (RT) inkubiert. Innerhalb von 30 Minuten tritt eine Oberflächenfärbung und durch längere Inkubation eine Tiefenfärbung der Proteine ein.

Für eine inverse Proteinfärbung in SDS-Gelen kann der Farbstoff Roti®-White (Carl Roth) verwendet werden. Hierbei handelt es sich um eine Zink-basierte, inverse Färbung, mit der Proteinmengen unter 15 ng detektiert werden können. Bei der Färbung wird der Gel-Hintergrund weiß, während die Stellen im Gel, an denen Proteine sind, transparent bleiben. Diese Färbung erlaubt daher die präparative Isolierung von Proteinen aus einem SDS-Gel, wobei das Isolat frei von störenden Farbstoffen bleibt. Die Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Carl Roth).

#### **2.2.11.7 Western-Blot (*semi-dry* Elektroblot)**

Um die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteine im weiteren Verlauf immunochemisch mit Antikörpern nachweisen zu können, müssen die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Matrix (Nitrocellulosemembran) überführt werden. Diesen Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine feste Trägermatrix bezeichnet man als Western-Blot. Für den Transfer wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung des SDS-Gels angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran übertragen und dort gebunden werden. Beim *semi-dry* Western-Blot (Jacobson & Karnas, 1990) werden Gel und Membran sandwichartig von Filterpapieren eingerahmt, die bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienen (Abbildung 2.3). Methanol im Anoden- und Kathoden-Puffer dient dazu, das SDS aus den Protein-Detergenz-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen. Um die Proteine aus dem Gel auf die Membran zu übertragen, wird das Gel nach der SDS-PAGE zunächst vorsichtig aus den Glasplatten gelöst und das Sammelgel abgetrennt. Als unterste

Lage dienen 6 Whatman-Papiere, die in Anodenpuffer getränkt sind. Auf diese wird die ebenfalls in Anodenpuffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt und darauf das SDS-Gel. Schließlich werden weitere sechs Whatman-Papiere aufgelegt, die mit Kathodenpuffer getränkt sind (Abbildung 2.3). Der gesamte Aufbau wird in eine Elektrobplot-Apparatur eingespannt und ein Strom angelegt, durch den die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung der Anode auf die Membran wandern. Die maximale Stromstärke liegt bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gel. Die Dauer des Blots richtet sich nach der Größe der Proteine und der Dicke des Gels (Richtwert: 1- 3 Stunden).



**Abbildung 2.3:** Aufbau eines Western-Blots (*semi-dry* Blot)

Schematische Darstellung des Aufbaus eines *semi-dry* Western-Blots. Der Pfeil gibt die Richtung des Proteintransfers nach Anlegen eines elektrischen Stroms wieder.

Nach dem Blotten können die an die Nitrocellulosemembran gebundenen Proteine durch eine Ponceau-Rot-Färbung sichtbar gemacht werden (Morcol & Subramanian, 1999). Hierfür wird die Membran für 10 Minuten in Ponceau-Rot S-Lösung inkubiert. Nach dem Färben wird sie so lange mit  $\text{dH}_2\text{O}$  entfärbt, bis die einzelnen Proteinbanden deutlich zu erkennen sind. Die Membran wird zur Dokumentation eingescannt bevor der Marker abgetrennt (der Marker wird zur späteren Zuordnung der Bandengrößen bei  $4^\circ\text{C}$  verwahrt) und die Membran vollständig in  $\text{dH}_2\text{O}$  entfärbt wird.

### 2.2.11.8 Immunoblot

Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgt über einen indirekten Antikörper-Nachweis. Hierbei wird ein primärer Antikörper verwendet, der spezifisch gegen das gesuchte Protein, bzw. gegen ein Epitop von diesem gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper ist gegen den konstanten Teil des ersten Antikörpers gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt, das einen Farb- oder Chemilumineszenz-Nachweis der Proteinlokalisierung erlaubt.

Für den Antikörper-Nachweis wird die Nitrocellulosemembran zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 1× Roti-Block (Blockierungslösung, Carl Roth) inkubiert. Dieser Inkubationsschritt dient der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Nach dem Blockieren der Membran erfolgt die Hybridisierung mit dem primären Antikörper, der in 0,5× Roti-Block auf die gewünschte Konzentration verdünnt wird. Die Hybridisierung mit dem primären Antikörper erfolgt üN bei 4°C. Am nächsten Tag wird die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran dreimal für 10 Minuten mit 1× PBST gewaschen. Für die Hybridisierung mit dem sekundären Antikörper, der in dieser Arbeit jeweils Peroxidasegekoppelt war, wird dieser zunächst in 0,5× Roti-Block auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Nach der Hybridisierung für 2 Stunden bei Raumtemperatur wird die Membran dreimal für 10 Minuten in 1× PBST und einmal für 10 Minuten in 1× PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Membran wird leicht angetrocknet bevor sie für 5 Minuten mit einem Chemilumineszenz-Reagenz (PIERCE ECL Western-Blotting Substrat) inkubiert wird. Es dient als Substrat für die Peroxidase und damit als Nachweisreagenz für die Enzymgekoppelte Reaktion. Im Bereich der Peroxidase und damit im Bereich des gesuchten Proteins kommt es zur Chemilumineszenz. Das Substrat wird abgenommen, und zur Detektion der Chemilumineszenz über Autoradiographie ein Röntgenfilm aufgelegt. Der erste Film wird nach 1 Minute entwickelt, weitere Filme nach zwei und fünf Minuten.

#### **2.2.11.9 INDIA INK - Färbung von Nitrocellulosemembranen**

Nach dem Western-Blot können die Proteine auf der Nitrocellulosemembran vor oder nach der Immunodetektion mit INDIA INK angefärbt werden (Hancock & Tsang, 1983). Für eine Färbung mit anschließender Immunodetektion wird die Membran nach dem Blotten für 5 Minuten in 2,2 M NaOH geschwenkt. Anschließend wird sie viermal für je 10 Minuten in PBS (+ 0,05% Tween 20) inkubiert. Die Färbung mit der INDIA INK-Lösung erfolgt für 2 Stunden bis üN. Vor der Immunodetektion wird die Membran mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Soll die Färbung im Anschluss an die Immunodetektion erfolgen, wird die Membran zunächst zweimal für je 30 Minuten in 200 mM Glycin (pH 2,8) inkubiert, um die gebundenen Antikörper abzulösen (*strippen*). Im Anschluss wird die Membran viermal für je 10 Minuten in PBS (+ 0,05% Tween 20) gewaschen und schließlich in der INDIA INK-Lösung inkubiert. Nach erfolgter Färbung (2 Stunden bis üN) wird die Membran mit dH<sub>2</sub>O gewaschen.

### 2.2.12 *in vitro* - Expression eines Proteins

Für die *in vitro* - Expression eines rekombinanten Proteins in *E. coli* wurde u.a. der Vektor pBAD-TOPO/Thio (Invitrogen) verwendet. Ausgehend von diesem Vektor wird das Protein als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Thioredoxin-Teil sowie einem C-terminalen V5-Epitop und His-Tag exprimiert.

Für die Klonierung des Expressionskonstruktes wird der pBAD-TOPO/Thio-Vektor sowie das DNA-Fragment, das die kodierende Sequenz für das zu exprimierende Protein enthält, mit entsprechenden Enzymen restringiert, so dass eine gerichtete Ligation möglich ist. Dabei ist darauf zu achten, dass das Fragment im richtigen Leseraster integriert wird. Das Ligationsprodukt wird in *E. coli* - Zellen transformiert (M15, SG, DH5 $\alpha$  oder XL1-Blue). Zur Überprüfung der Ligation und des Leserasters wird eine Sequenzierung durchgeführt.

Von Kandidatenklonen werden zunächst 50 mL  $\bar{u}$ N-Kulturen (LB-Medium + Ampicillin) angesetzt. Am Folgetag werden diese 1:100 verdünnt und 500 mL Expressionskulturen (LB-Medium + Ampicillin) angesetzt, die bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C und 200 rpm inkubiert werden. Nach Erreichen dieser OD<sub>600</sub> wird die Expression durch die Zugabe von 20%iger Arabinoselösung (steril) in einer Endkonzentration von 0,2% induziert. Die Expression erfolgt für 6 - 12 Stunden bei RT und 200 rpm. Die Zellen werden schließlich durch Zentrifugation der Kulturen gesammelt und bis zur Lyse bei -80°C gelagert.

#### 2.2.12.1 Aufreinigung eines *in vitro* - exprimierten Proteins

Zu dem Zellpellet werden 10 mL Lysispuffer gegeben, der eine Tablette Complete Mini (Roche) und 100  $\mu$ l PMSF zur Inhibition von Proteasen sowie 30 mg Lysozym zur Lyse der Zellen enthält. Das Pellet wird durch Vortexen resuspendiert und mit Lysispuffer auf 30 ml aufgefüllt, so dass sich eine Lysozym-Konzentration von 1 mg/ml ergibt. Es folgt eine Inkubation für 30 Minuten bei 37°C, an die sich drei Zyklen von 15 Minuten -80°C und anschließendem Auftauen bei 37°C im Wasserbad zur weiteren Lyse anschließen. Zum Entfernen der Nukleinsäuren werden RNaseA (final 10  $\mu$ g/ml) und DNaseI (final 5  $\mu$ g/ml) zu den Zelllysaten hinzugegeben und diese für 40 - 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 120  $\mu$ l PMSF werden die Lysate zentrifugiert (20 Minuten, 14.000 rpm, 4°C) um verbliebene Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wird durch die Zugabe von 1 M Imidazol auf eine Endkonzentration von 20 mM Imidazol eingestellt.

Für die Aufreinigung des His-getaggten, exprimierten Proteins aus dem Überstand werden 600 - 1.000  $\mu$ l Ni-NTA-Agarose-Suspension (50%, Qiagen) zu dem Überstand hinzugegeben und in einem 50 ml - Falcon  $\bar{u}$ N bei 4°C auf einem über-Kopf-Schwenker

inkubiert. Am Folgetag werden die Ni-NTA-Agarose-Beads durch Zentrifugation (500 g, 3 min, 4°C) pelletiert. Die Waschung der Ni-NTA-Agarose-Beads und die Elution des gebundenen Proteins erfolgt in Gravitations-Säulen (Qiagen). Hierfür werden zunächst etwa 2 ml des Überstandes auf die Membran in der Säule gegeben, die unten verschlossen ist. Die Beads werden mit einer Pasteur-Pipette vom Boden des Falkons abgesaugt und ebenfalls auf die Säule gegeben. Diese wird dann unten geöffnet, so dass die Flüssigkeit abtropfen kann und sich die Beads absenken. Es ist darauf zu achten, dass die Säule rechtzeitig wieder verschlossen wird, so dass sie nicht trocken läuft. Auf die abgesenkten Beads wird eine weitere Membran gegeben und diese vorsichtig angedrückt, so dass die Beads in den weiteren Wasch- und Elutions-Schritten nicht aufwirbeln können. Um nicht-gebundene Proteine von den Beads zu entfernen, werde diese 12× mit jeweils 600 µl Waschpuffer gewaschen (die Wasch-Fractionen werden zur Analyse in separaten 1,5 ml - Reaktionsgefäßen aufgefangen). Die Elution des exprimierten Proteins von den Beads erfolgt 8× mit jeweils 600 µl Elutionspuffer, wobei sie jeweils in separaten 1,5 ml - Reaktionsgefäßen aufgefangen werden (modifiziert nach QIAexpressionist, 2006). Für die Überprüfung der Aufreinigung werden jeweils 7 µl verschiedener Wasch- und Elutions-Fractionen mittels einer 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt und diese anschließend mit Coomassie gefärbt.

#### **2.2.12.2 Elektroelution zur Aufreinigung eines exprimierten Proteins**

Die Elutions-Fractionen von der Ni-NTA-Agarose sind meist nicht absolut rein, d.h. sie bestehen nicht nur aus dem rekombinant exprimierten Protein, sondern auch aus verschiedenen Histidin-reichen *E. coli* - Proteinen, die mit aufgereinigt wurden. Wenn das rekombinant exprimierte Protein als Antigen für eine Immunisierung eingesetzt werden soll, muss sich daher eine weitere Aufreinigung anschließen. Hierfür werden die Elutions-Fractionen (siehe 2.2.12.1) auf SDS-Maxi-Gele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die Gele mit Roti®-White gefärbt (Carl Roth). Die Bande des exprimierten Proteins wird nach der Färbung möglichst exakt mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

Um das Protein aus dem Gelstück zu isolieren, schließt sich eine Elektroelution mit Hilfe von D-Tube-Maxi-Säulen (Novagen) an. Hierfür werden die Gelstücke mit dem exprimierten Protein vorsichtig in die Elutionssäulen gegeben, diese mit 1× SDS-Laufpuffer aufgefüllt und verschlossen. Die Säulen werden in ihren Halter eingespannt und so in einer Elektrophoresekammer (ebenfalls gefüllt mit 1× SDS-Laufpuffer) platziert, dass sich die Membranen an den Seiten befinden und der elektrische Strom ungehindert durch das Gefäß und das Gelstück fließen kann. Die Elution des Proteins erfolgt durch Anlegen einer

elektrischen Spannung von 100 Volt. Nach zwei Stunden wird der Puffer in der Elutionssäule erneuert und für weitere zwei Stunden eluiert. Die gesammelten Eluate werden im Anschluss durch Ultrazentrifugation mittels Zentrifugalkonzentratoren (Amicon) aufkonzentriert, wobei auch der Austausch des SDS-Laufpuffers gegen einen physiologischen Puffer (1× PBS, pH 7,4) erfolgt. Die Konzentrate können schließlich für eine Immunisierung eingesetzt werden.

### **2.2.13 Immunoaffinitätsreinigung von Antiseren**

Für eine Immunoaffinitätsreinigung von Antiseren wird das entsprechende Antigen zunächst über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach der Ponceau-Rot-Färbung der Membran wird die Bande mit dem Antigen möglichst exakt ausgeschnitten. Das Membranstück wird 30 Minuten in Blockierungslösung (1× PBS mit 1% RotiBlock, 0,05% Tween 20) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. 1 ml des Antiserums werden mit 9 ml Antikörper-Inkubationslösung (1× PBS mit 0,5% RotiBlock) gemischt und mit dem Membranstück in einem 15 ml - Falcon üN bei 4°C unter Rotation inkubiert. Das Membranstück wird nach erfolgter Antigen-Antikörper-Bindung dreimal für 10 Minuten mit einer Waschlösung (1× PBS mit 0,05% Tween 20) gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Zum Lösen der Antigen-Antikörper-Bindung wird das Membranstück für 10 Minuten in 2,2 ml 0,1 M Zitronensäure (pH 2,2) inkubiert. Das Membranstück wird herausgenommen und die Antikörperlösung durch die Zugabe von 2,8 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,2) neutralisiert. Zur Stabilisierung wird die Antikörperlösung mit etwas BSA versetzt und bei -20°C gelagert.

### **2.2.14 Isolation von Nukleinsäuren (DNA und RNA)**

#### **2.2.14.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien-Zellen erfolgte über das „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ von PeqLab (Mini-Präparation) oder das „Plasmid Midi Kit“ von Qiagen (Midi-Präparation) nach den Angaben des Herstellers.

Neben diesen, auf Säulenchromatographie beruhenden Isolations-Methoden, erfolgte die Isolation von Plasmid-DNA alternativ auch über Alkalische Lyse (Mini-Präparation). Hierfür werden 4 ml einer üN-Bakterienkultur für 5 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Bakterien-Pellet in 60 µl Glucoselösung resuspendiert. Zu der Bakteriensuspension werden 200 µl einer frisch angesetzten Denaturierungslösung

gegeben und das Gemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Die Ausfällung der bei der Zellyse freigesetzten, genomischen DNA erfolgt durch die Zugabe von 150 µl Acetat-Mix und der Inkubation für 5 Minuten auf Eis. Es schließt sich eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 rpm an, um die Zellreste und die genomische DNA zu pelletieren und damit von der Plasmid-DNA zu trennen. Der Plasmid-haltige Überstand wird anschließend einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung unterzogen. Hierfür wird diesem zunächst ½ Volumen Phenol zugesetzt, gemischt und für 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wird langsam abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit ½ Volumen Chloroform versetzt. Es wird wieder gemischt und für 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-haltige Oberphase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Fällung der Plasmid-DNA wird 1 ml eiskalter, 96%iger Ethanol hinzugegeben und das Gemisch für 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Es schließt sich eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C an. Der Überstand wird dann abgenommen und die pelletierte DNA mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen. Es folgt eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wird abgenommen, das DNA-Pellet an der Luft oder in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet und schließlich in 40 µl dH<sub>2</sub>O mit RNase A (Endkonz. 20 µg/ml) aufgenommen.

#### **2.2.14.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefen**

Für die Isolation von Plasmiden aus Hefezellen (Robzyk & Kassir, 1992) wird eine 5 ml Kultur der Hefen in entsprechendem SD-Selektionsmedium angesetzt und üN bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Die Hefezellen der üN-Kultur werden durch Zentrifugation gesammelt (5 Minuten, 5.000 rpm) und das Zellpellet in 100 µl STET-Puffer resuspendiert. Zu dieser Hefezell-Suspension werden 0,2 g Glasperlen (0,45 mm Durchmesser) hinzu gegeben und für 5 Minuten gevortext. Nach Zugabe weiterer 100 µl STET-Puffer wird erneut für 5 Minuten gevortext. Der Ansatz wird für 3 Minuten im Wasserbad gekocht und dann auf Eis abgekühlt, bevor für 10 Minuten bei 13000 rpm (4°C) zentrifugiert wird. Von dem Überstand werden 100 µl in ein neues Reaktionsgefäß mit 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat überführt. Die Fällung der genomischen DNA und restlichen Proteine erfolgt für 60 Minuten bei -20°C und einer sich anschließenden Zentrifugation (10 Minuten, 13.000 rpm, 4°C). Für die Fällung der Plasmid-DNA werden 100 µl des Überstandes mit 500 µl 96%igem Ethanol versetzt und für 20 Minuten bei -20°C inkubiert, bevor die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (30 Minuten, 13.000 rpm, 4°C) pelletiert wird. Das Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen und die Plasmid-DNA schließlich in 20 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.14.3 Isolation von genomischer DNA aus adulten Schistosomen

Für die Isolation genomischer DNA aus Schistosomen (Grevelding, 1995) werden etwa 100 Adulte in 300 µl DNA-Extraktionspuffer aufgenommen und 3× 15 Sekunden auf höchster Stufe homogenisiert (ULTRA TURRAX). Es schließt sich eine Proteinase K - Behandlung (Endkonz. 500 µg/ml) üN bei 37°C an. Das Homogenisat wird Phenol-Chloroform gereinigt (vgl. 2.2.14.1) bevor die genomische DNA durch die Zugabe von ½ Volumen Ammoniumacetat (7,5 M) und 2,5 Volumen 96%igem, eiskaltem Ethanol sowie einer Inkubation üN bei -20°C ausgefällt wird. Durch eine Zentrifugation (30 Minuten, 13.000 rpm, 4°C) wird die DNA pelletiert. Das Pellet wird zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und die genomische DNA in dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.2.14.4 Isolation von RNA und DNA aus adulten Schistosomen

Die Isolation von RNA aus adulten Schistosomen erfolgte mit dem „Nucleospin RNA II - Kit“ von Macherey & Nagel nach den Angaben des Herstellers. Abweichend zu dem Protokoll des Herstellers wurde der DNA-haltige Durchfluss nach der Zentrifugation des Lysates über die Ionenaustauschersäule aufgehoben, um hieraus später die DNA zu extrahieren. Hierfür wird dem Durchfluss 500 µl eiskalter 96%iger Ethanol zugesetzt und das Gemisch für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet (DNA, Proteine) an der Luft oder in der Speedvac getrocknet. Das Pellet wird anschließend in 400 µl 1× PBS resuspendiert und 20 µl ProteinaseK-Lösung hinzugegeben und der Ansatz für 3 - 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgt über eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung (vgl. 2.2.14.1). Nach dieser folgt die Fällung der DNA durch die Zugabe von ½ Volumen Ammoniumacetat (7,5 M) und 2 Volumen eiskaltem 96%igen Ethanol, sowie einer Inkubation für 20 Minuten bei -20°C. Es schließt sich eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C an. Das Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 40 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Alternativ erfolgte die Präparation von RNA über TRIzol<sup>®</sup> (GIBCO) oder TRIFast (PeqLab). Hiermit ist es möglich, gleichzeitig RNA, DNA und Proteine zu isolieren, wobei die unterschiedliche Löslichkeit der Komponenten in organischen und wässrigen Lösungsmitteln ausgenutzt wird. Für die RNA-Präparation über Trizol wird zu den in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Schistosomen 1 ml Trizol (pro ca. 100 Würmer) gegeben und 3× 15 Sekunden auf höchster Stufe homogenisiert (ULTRA TURRAX), mit zwischenzeitlicher Kühlung auf Eis. Zur eigentlichen RNA-Isolation wird das Homogenat 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Protein-Nukleinsäure-Komplexe dissoziieren

können. Anschließend werden 200 µl Chloroform pro ml Trizol zugesetzt, gut geschüttelt, 2 - 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 Minuten zentrifugiert (12.000 rpm, 4°C), um eine Phasentrennung zu erhalten. Nach der Zentrifugation erhält man drei Phasen: Die geringe Menge an Chloroform hat sich im Phenol gelöst, verdrängt das Wasser von den Proteinen, so dass diese in der Interphase ausgefallen sind. Die DNA ist in der unteren Phenol-Phase geblieben, während sich die RNA in der oberen wässrigen Phase gesammelt hat. Die wässrige Phase wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt; der Rest, also die Phenolphase mit der DNA und die Interphase mit den Proteinen kann bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden. Für die Ausfällung der RNA werden 500 µl Isopropanol pro ml Trizol hinzugesetzt, für mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die RNA schließlich durch Zentrifugation (10 Minuten, 11.500 rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das RNA-haltige Pellet wird mindestens einmal mit 1 ml 70%igem Ethanol-DEPC gewaschen (Zentrifugation für 5 Minuten, 9.000 rpm, 4°C). Das RNA-Pellet wird an der Luft getrocknet und in einer entsprechenden Menge RNase-freiem dH<sub>2</sub>O oder DEPC-dH<sub>2</sub>O gelöst. Für die vollständige Resuspension der RNA wird für 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Vor der weiteren Verwendung der RNA muss eine DNaseI - Behandlung erfolgen, um eventuell noch vorhandene Reste an DNA zu entfernen.

#### **2.2.14.5 Isolation von RNA aus Hefen**

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Hefe-Zellen wird eine 5 ml üN-Kultur der entsprechenden Hefen angesetzt. Die Hefezellen werden durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm) gesammelt und einmal mit 1× PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren. Die Hefezellen werden durch dreimalige Inkubation der Zellpellets für 1 Minute in flüssigem Stickstoff und 1 Minute bei 37°C im Wasserbad grob aufgeschlossen. Das Zellpellet wird anschließend mit 1 ml Trizol-Reagenz versetzt und die Hefezellen zum weiteren Aufschluss für 30 Sekunden homogenisiert (ULTRA TURRAX). Die weitere Präparation der RNA erfolgt wie unter 2.2.14.4 beschrieben.

#### **2.2.15 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Bestimmung der Konzentration isolierter DNA oder RNA erfolgte über die Messung der Absorption mit einem Spektralphotometer oder über eine elektrophoretische Auftrennung der DNA oder RNA im Vergleich zu einem Standard bekannter Konzentration.

Für die spektroskopische Bestimmung der Konzentration wird ein Aliquot der isolierten Nukleinsäuren verdünnt und die Absorption dieser Verdünnung im Spektralphotometer bei 260 nm und 280 nm gemessen. Diese Methode basiert auf der Absorption von DNA oder RNA bei 260 nm durch die heteroaromatischen Ringe der Basen. Durch den Vergleich mit der Absorption bei 280 nm, also im Bereich des Absorptionsmaximums der Proteine (Absorption durch die aromatischen Ringe der Aminosäurereste), lässt sich zudem die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt ein  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis von 1.8, eine reine RNA-Lösung ein Verhältnis von 2.0. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen verunreinigt, so ist der Wert kleiner.

Der spektroskopischen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen liegt das Lambert-Beersche-Gesetz zu Grunde, mit dem man anhand der gemessenen Absorption der Nukleinsäurelösung deren Konzentration bestimmen kann.

$$\text{Lambert-Beersche-Gesetz: } c = E \times \varepsilon^{-1} \times d^{-1}$$

[c: Konzentration der Nukleinsäuren; E: Extinktion;  $\varepsilon$ : spezifischer Extinktionskoeffizient; d: Schichtdicke der Küvette]

Bei einer Schichtdicke  $d = 1 \text{ cm}$  und einer Wellenlänge  $\lambda = 260 \text{ nm}$  gelten die folgenden Näherungswerte für  $\varepsilon$ :  
 doppelsträngige DNA :  $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$   
 einzelsträngige DNA/RNA:  $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA in einer Lösung berechnet sich damit nach folgender Formel:  $c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Die zweite Möglichkeit zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung basiert auf der Eigenschaft der Fluoreszenz von in Nukleinsäuren eingelagerten Ethidiumbromid-Molekülen. Ein Aliquot der Nukleinsäurelösung sowie eine Nukleinsäurelösung bekannter Konzentration und bekannten Volumens wird gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch den Vergleich der Intensität der Fluoreszenz der Probe mit der Intensität der Fluoreszenz der Lösung bekannter Konzentration kann die DNA-Konzentration der Nukleinsäurelösung abgeschätzt werden. Auf diesem Prinzip basieren auch quantitative DNA-Größenstandards, wie z.B. HyperLadderI (Bioline). Wird eine definierte Menge dieses Standards auf einem Agarosegel aufgetrennt und dieses mit Ethidiumbromid gefärbt, so entspricht die Intensität einzelnen Banden spezifischen DNA-Mengen.

### 2.2.16 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die analytische oder präperative Auftrennung von Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe erfolgt über die Elektrophorese in Agarosegelen (Sambrook et al., 1989). Die gelelektrophoretische Auftrennung basiert auf dem Laufverhalten von Nukleinsäuren in einer festen Matrix (i.d.R. Agarosegel) in einem angelegten elektrischen Feld. Die aufgrund der Phosphatreste des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladenen Nukleinsäuren orientieren sich im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Wanderung der Nukleinsäuren durch die Gelmatrix hängt von der Größe und der Konformation der Nukleinsäuremoleküle ab. So wandern kleinere Moleküle schneller durch die Poren der Gelmatrix als große Moleküle.

#### 2.2.16.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Für die Auftrennung von DNA werden in der Regel horizontale 0,7 - 2,0%ige Agarosegele verwendet, über die DNA-Fragmente im Größenbereich von 100 bp bis 60 kb aufgetrennt werden können (Sambrook et al., 1989). 1%ige Agarosegele sind z.B. in ihrer Auflösung für lineare DNA-Fragmente von 0,5 - 10 kb optimal. Für die Herstellung dieser Gele wird die entsprechende Menge Agarose (0,7 - 2,0% w/v) in 1× TAE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Als Laufpuffer für die Elektrophorese dient ebenfalls 1× TAE mit der gleichen Endkonzentration Ethidiumbromid. Alternativ können die Agarosegele auch Ethidiumbromid-frei vorbereitet werden und die Gele im Anschluss an die Elektrophorese in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml in 1× TAE) für 10 Minuten nachgefärbt werden. Das hinzugesetzte Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht und dient dazu, die aufgetrennten DNA-Banden in den Gelen sichtbar zu machen. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel werden diese mit Blaumarker (Endkonzentration 1×) versetzt. Dieser enthält Bromphenol-Blau und Glycerin. Das Glycerin erhöht die Dichte der DNA-Lösung und lässt dadurch die Proben in die Geltaschen absinken. Der Farbstoff Bromphenol-Blau dient als Indikator, wandert während der Elektrophorese ebenfalls in Richtung der Anode und zeigt damit die zurückgelegte Laufstrecke im Gel an. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 - 140 Volt, je nach Prozentigkeit des Gels. Die aufgetrennte DNA wird durch Betrachtung des Gels auf einer UV-Platte (312 nm) sichtbar gemacht.

### 2.2.16.2 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Für die Elektrophorese von RNA-Molekülen (Sambrook et al., 1989) müssen denaturierende Bedingungen gewählt werden, da einzelsträngige RNA dazu neigt, durch intra- und intermolekulare Bindungen Sekundärstrukturen und Aggregate auszubilden. Diese unterschiedlichen Konformationen besitzen ein unterschiedliches Laufverhalten im Gel. Um jedoch ein einheitliches Laufverhalten der RNA zu gewährleisten, werden denaturierende Gele verwendet, in denen die Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst werden und das Laufverhalten der RNA-Moleküle so ihrem Molekulargewicht entspricht.

Für die Elektrophorese von RNA werden in der Regel Formaldehyd-haltige, 1,2%ige Agarosegele verwendet. Für die Herstellung der Gele werden 1,8 g Agarose in 110 ml dH<sub>2</sub>O und 15 ml 10× MOPS-Puffer gelöst und mit 25 ml Formaldehyd (37%) versetzt. Das Formaldehyd besitzt eine denaturierende Wirkung, die auf der Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen der Aldehyd-Gruppe und den Aminogruppen der Basen Adenin, Guanin und Cytosin beruht (Lottspeich & Zorbas, 1998). Durch diese Bindung stehen die Aminogruppen damit nicht mehr für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung; die Bildung von Sekundärstrukturen und Aggregaten wird verhindert. Da das Formaldehyd jedoch auch mit der Aminogruppe von Tris reagiert, kann als Laufpuffer nicht, wie für die DNA-Elektrophorese, TAE-Puffer verwendet werden. Für Formaldehyd-Gele wird daher MOPS-Puffer verwendet, ein Gemisch aus Morpholinopropansulfonsäure und Natriumacetat. Vor dem Auftragen werden die Proben mit dem Formamid-haltigen RNA-Loading-Puffer (Endkonzentration 1×) aufgekocht. Hierbei wird die RNA in Gegenwart von MOPS, Formamid und Formaldehyd denaturiert. Das Formamid zerstört dabei die Basenpaarungen der RNA und ermöglicht so die Reaktion der Basen mit Formaldehyd. Trotz der denaturierenden Bedingungen bildet die RNA noch schwache Sekundärstrukturen aus; in diese doppelsträngigen Bereiche lagern sich die im RNA-Loading-Puffer enthaltenen Ethidiumbromid-Moleküle ein und machen so die Detektion der RNA im Gel möglich. Die RNA-Gele werden ebenfalls auf einer UV-Platte (312 nm) betrachtet.

### 2.2.16.3 Elution von DNA aus Agarosegelen und „reaction clean up“

Die Elution von DNA aus Agarosegelen sowie die Aufreinigung von DNA aus PCR- oder anderen Reaktionsansätzen („reaction clean up“) erfolgt mit dem „peqGOLD Gel Extraction Kit“ von PeqLab nach den Angaben des Herstellers.

#### **2.2.16.4 Densitometrische Messung von DNA-Signalintensitäten**

Die Signalintensität von DNA in Agarosegelen, wie beispielsweise von PCR-Produkten, kann densitometrisch gemessen werden. DNA-Signale in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen werden zunächst auf einer UV-Platte (312 nm) sichtbar gemacht und mit einem Video Imaging-System dokumentiert und digitalisiert. Mit Hilfe des Programms ImageJ können dann die Signalintensitäten am Computer gemessen und quantifiziert werden.

#### **2.2.17 Enzymatische Reaktionen an Nukleinsäuren**

##### **2.2.17.1 Restriktion von DNA**

Die enzymatische Spaltung von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen vom Typ II unter den für das jeweilige Enzym optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen. Für die Restriktion von DNA werden in einen 20 µl Restriktionsansatz 10 - 20 Units des jeweiligen Enzyms, 2 µl des entsprechenden 10× Restriktionspuffers, 1 - 5 µg DNA sowie dH<sub>2</sub>O ad 20 µl eingesetzt. Zur Restriktion größerer Mengen DNA werden entsprechende größere Restriktionsansätze mit 1/10 Volumen 10× Restriktionspuffer und der entsprechenden Menge Enzym, die 10% des Ansatzes nicht überschreiten sollte, angesetzt. Die Restriktion erfolgt je nach eingesetzter DNA-Menge und Enzym für 1 - 4 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur, i.d.R. 37°C. Für die Restriktion von DNA mit mehreren ( $\geq 2$ ) Enzymen, die nicht unter den gleichen Pufferbedingungen schneiden können, wird die DNA zunächst mit einem Enzym geschnitten, dann über Phenol-Chloroform aufgereinigt, gefällt, resuspendiert und dann mit dem zweiten Enzym geschnitten. Für die Überprüfung der Restriktion wird der gesamte Ansatz oder ein Aliquot von diesem mit Blaumarker versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel vollständig aufgetrennt.

##### **2.2.17.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Für die spätere Ligation eines Inserts in ein restringiertes Vektor-Plasmid ist es von Vorteil, die Enden des Plasmides vor der Ligation mittels alkalischer Phosphatase (CIP = Calf Intestinal Mucosa Phosphatase) zu dephosphorylieren. Hierdurch wird eine Religation des Vektors ohne Insertaufnahme bei der Ligations-Reaktion vermindert (Ukai et al., 2002).

Für die Dephosphorylierung der Enden eines geschnittenen Plasmid-Vektors werden in einem 20 µl Ansatz 1/10 Volumen des entsprechenden Puffers sowie 20 Units einer Alkalischen Phosphatase gegeben und der Ansatz für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Dephosphorylierung der Vektor-Enden wird der Ansatz vor der weiteren Verwendung der

Plasmid-DNA zunächst aufgereinigt. Alternativ kann die Alkalische Phosphatase auch direkt zu dem Restriktionsansatz gegeben und dieser für weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert werden. Der Restriktionsansatz wird in diesem Fall gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Gel-eluierte DNA dann direkt in die Ligation eingesetzt.

### 2.2.17.3 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in entsprechende Vektoren, werden diese sowie das Insert mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt, so dass an beiden aufeinander passende *sticky ends* entstehen. In die Ligation werden Insert und Vektor meist im Verhältnis 3:1 eingesetzt. In der Regel wird von 50 - 100 ng Vektor-DNA ausgegangen und die Menge an einzusetzender Insert-DNA nach folgender, vereinfachter Formel berechnet (QIAGEN PCR Cloning Handbook, 2001):

$$\text{ng Insert-DNA} = \frac{[\text{ng Vektor-DNA} \times \text{Insertgröße (bp)} \times 3]}{\text{Vektorgröße (bp)}}$$

Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase von Fermentas verwendet, die die Bildung von Phosphordiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden katalysiert. In einen 20 µl - Ligationsansatz werden 25 - 100 ng Vektor-DNA, die entsprechende Menge Insert-DNA, 2 µl eines 10× Reaktionspuffers, 1 µl der T4-DNA-Ligase (5 U/µl) sowie dH<sub>2</sub>O ad 20 µl eingesetzt. Der Ansatz wird für 60 Minuten bis üN bei 4 - 22°C inkubiert und anschließend direkt in eine Bakterien-Transformation eingesetzt.

### 2.2.17.4 A-Addition

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgt meist in Vektoren mit U-Überhängen, wie zum Beispiel der Vektor pDrive (Qiagen). Aufgrund der Eigenschaft von *Taq*-Polymerasen, A-Überhänge zu erzeugen, verlaufen diese Klonierungen i.d.R. problemlos. Zur Klonierung von *blunt end* - Fragmenten oder zur Optimierung der Klonierung von PCR-Produkten in Vektoren mit U-Überhängen, können vor der Klonierung an die Enden der PCR-Produkte A-Nukleotide angehängt werden. Dies erfolgte mit dem „A-Addition's Kit“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Der Ansatz für die A-Addition setzt sich aus 2 µl des 5× Qiagen A-Addition Master Mixes, ≤ 8 µl aufgereinigtes PCR-Produkt sowie dH<sub>2</sub>O ad 10 µl zusammen. Der Ansatz wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die mit A-Überhängen versehenen DNA-Fragmente können dann direkt in die Klonierung in einen U-Vektor eingesetzt werden.

### 2.2.17.5 *Fill in* - Reaktion

Für die Erzeugung von *blunt ends* an restringierten DNA-Fragmenten für eine Klonierung in *blunt end*-Vektoren wie z.B. pST-Blue1 (Novagen) wird eine so genannte *fill in* - Reaktion durchgeführt. Bei dieser werden die bei der Restriktion entstandenen Einzelstrangenden aufgefüllt. Für die *fill in* - Reaktion werden in einen 20 µl - Ansatz 1/10 Volumen *Eco*PolI-Puffer, 1 Unit Klenow-Enzym (DNA-Polymerase I - großes Fragment) pro µg DNA und dNTPs in der Endkonzentration 33 µM gegeben und der Ansatz 15 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wird durch eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 Minuten bei 75°C gestoppt. Nach Aufreinigung der DNA aus dem Ansatz kann diese direkt für eine *blunt end*-Klonierung verwendet werden.

### 2.2.17.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte gemäß der Sangermethode (Sanger et al., 1977) automatisiert bei der Firma AGOWA in Berlin.

### 2.2.18 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*; PCR) dient dem Nachweis und der Vermehrung geringster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis et al., 1986; White et al., 1989). Das Prinzip der PCR beruht auf einer enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an den komplementären Strängen der DNA gebunden sind und als Start für die DNA-Polymerase dienen. Die Primer werden dabei so gewählt, dass sie die zu amplifizierende Sequenz flankieren.

Die PCR ist ein zyklischer Prozess, der in der Regel 30 - 35 Zyklen umfasst, wobei jeder Zyklus drei Temperaturstufen beinhaltet. Im ersten Schritt erfolgt zunächst eine Denaturierung der DNA für 2 - 5 Minuten bei 95°C, um DNA-Strukturen aufzulösen und die DNA-Doppelstränge zu trennen. Danach erfolgt zu Beginn jedes Zyklus eine Denaturierung der DNA für 30 Sekunden bei 93°C, um die neu-synthetisierten DNA-Stränge wieder voneinander zu trennen. Im zweiten Schritt eines jeden Zyklus erfolgt das Annealing der Primer an die DNA bei einer für die verwendeten Primer spezifischen Temperatur. Diese ist abhängig von Länge und Sequenz der Primer und kann mit Hilfe der Formel  $T_m = [2 \times (A + T)] + [4 \times (G + C)]$  berechnet werden. Im dritten Schritt erfolgt die Extension der an die DNA-gebundenen Primer durch die DNA-Polymerase bei dem Temperatur-

Optimum des verwendeten Enzyms (72°C für die *Taq*-Polymerase). Die Zeit für die Primer-Extension richtet sich nach der Geschwindigkeit des eingesetzten Enzyms (für die *Taq*-Polymerase  $\geq 1000$  Basen/min) und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Diese drei Reaktionsschritte (Denaturierung, Annealing und Extension) werden in der PCR zyklisch wiederholt, wobei in jedem Zyklus der zu amplifizierende DNA-Bereich verdoppelt wird. Da das Elongationsprodukt eines Zyklus als *template* für den nächsten Zyklus dienen kann, wird der von den Primern flankierte DNA-Bereich exponentiell amplifiziert.

In eine PCR-Reaktion werden in einen 25  $\mu$ l-Ansatz neben der *template*-DNA (ca. 10 ng bei Plasmid-DNA und 100 ng bei genomischer DNA) die restlichen Komponenten wie folgt eingesetzt:

10 - 100 ng	<i>template</i> -DNA
2,0 $\mu$ l	5'-Primer (10 $\mu$ M)
2,0 $\mu$ l	3'-Primer (10 $\mu$ M)
0,5 $\mu$ l	dNTPs (10 mM)
2,5 $\mu$ l	10 $\times$ Reaktionspuffer
0,5 $\mu$ l	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu$ l)
ad 25 $\mu$ l	dH <sub>2</sub> O

Alternativ zu einer *Taq*-Polymerase wurde für die Amplifikation längerer DNA-Fragmente die TripleMaster-*Taq*-Polymerase von Eppendorf verwendet, die DNA-Fragmente bis zu 40 kb zu amplifizieren kann und aufgrund ihrer *proof reading* - Aktivität eine geringere Fehlerrate besitzt. Die PCR-Reaktion erfolgt in einem Thermo-Cycler (Eppendorf), der automatisch das programmierte Temperaturprofil durchläuft. Zur Überprüfung der PCR werden 5 - 12,5  $\mu$ l des Ansatzes mit der entsprechenden Menge Blaumarker versetzt und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.2.18.1 Kolonie-PCR

Die Überprüfung eines Klonierungserfolges kann schnell und sequenzspezifisch über eine PCR erfolgen (Zon et al., 1989). Hierfür werden die gewachsenen Bakterienkolonien zunächst mit einer Pipettenspitze auf eine Replikaplatte überführt und der Rest der Kolonie direkt in einem 25  $\mu$ l PCR-Ansatz resuspendiert. Als Primer werden hierbei solche verwendet, die gegen die Sequenz der nachzuweisenden Insert-DNA gerichtet sind, oder gegen Insert-flankierende Sequenzen des Plasmides.

### 2.2.18.2 RT-PCR

Im Gegensatz zu einer herkömmlichen PCR dient bei einer RT-PCR, die dem Nachweis von Transkripten dient, RNA als primäres Ausgangsmaterial für die Amplifikation. Im ersten Teil der Reaktion werden RNA-Moleküle über das Enzym Reverse Transkriptase in cDNAs umgeschrieben (Sambrook et al., 1989). Hierfür werden je nach Reverser Transkriptase 90 ng bis zu 1 - 2 µg Total-RNA eingesetzt. Abhängig von der Qualität der verwendeten RNA sollte diese vor der RT-Reaktion zunächst mit DNaseI behandelt werden, um eventuell bei der RNA-Isolation co-isolierte DNA-Moleküle zu entfernen. Für die DNaseI-Behandlung wird die entsprechende Menge RNA in einem Volumen von 12,5 µl mit 1,5 µl 10× Reaktionspuffer und 1,5 µl einer RNase-freien DNaseI (Fermentas) versetzt. Der Ansatz wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion durch die Zugabe von 1,5 µl Stop-Lösung (enthält EDTA) und einer Inkubation für 10 Minuten bei 70°C gestoppt und der Ansatz anschließend auf Eis inkubiert. Es empfiehlt sich jedoch die Reaktion nur durch eine Hitze-Inaktivierung abzustoppen. Das in der Stop-Lösung enthaltene EDTA kann in der sich anschließenden PCR inhibitorisch wirken, da es Mg<sup>2+</sup>-Kationen abfangen kann, die als Co-Faktoren für die Polymerase benötigt werden.

Der vollständige Ansatz für eine RT-Reaktion setzt sich wie folgt zusammen:

90 ng - 2 µg	DNaseI-behandelte RNA
2,0 µl	3'-Primer (10 µM)
2,5 µl	dNTPs (10 mM)
2,5 µl	10× FSB
1,0 µl	RNasin (40U/µl)
1,0 µl	DTT
1,0 µl	Reverse Transkriptase (200 U/µl)
ad 25 µl	dH <sub>2</sub> O

Die Synthese der cDNA erfolgt für 60 Minuten bei Enzym-spezifischer Temperatur (zwischen 37°C und 55°C je nach verwendeter Reverser Transkriptase). Die Reaktion wird durch eine Hitze-Inaktivierung des Enzyms gestoppt (je nach Enzym 10 Minuten bei 70°C oder 5 Minuten bei 95°C). Die in der RT-Reaktion synthetisierten cDNA-Moleküle dienen in der sich anschließenden PCR als *template*. Hierfür werden 2,5 µl bis 5 µl des RT-Ansatzes eingesetzt und weitere PCR-Komponenten wie bereits in Abschnitt 2.2.18 beschrieben hinzugefügt. Das Ergebnis der RT-PCR wird nach erfolgter Reaktion auf einem Gel überprüft, indem 5 - 12,5 µl des PCR-Ansatzes mit der entsprechenden Menge Blaumarker versetzt und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden.

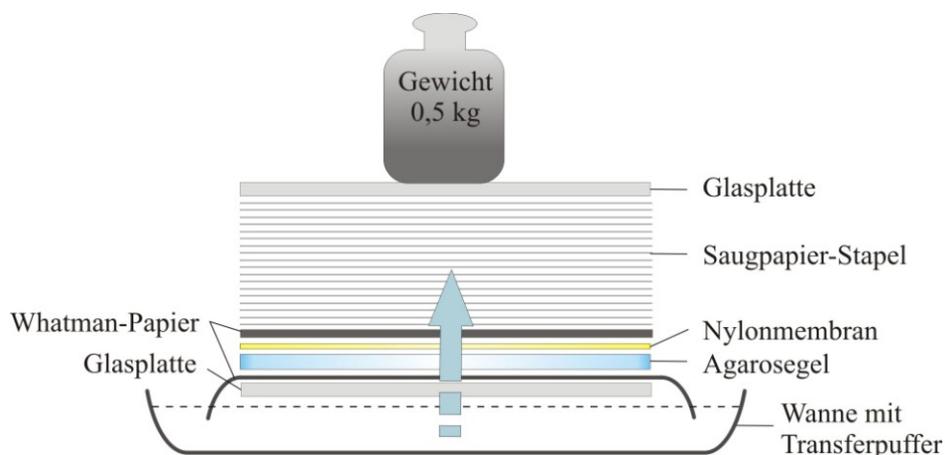
### 2.2.19 Klonierung von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten werden diese in geeignete Plasmid-Vektoren eingebaut und mit diesen dann Bakterienzellen transformiert. Die Ligation von PCR-Produkten erfolgte mit dem PCR-Cloning-Kit (Qiagen) oder alternativ mit dem „perfectly blunt end cloning“ - Kit (Novagen) nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.20 Transfer von DNA auf Membranen (Southern-Blot)

Der Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham) erfolgt nach Sambrook et al. (1989) mit einigen Modifikationen. DNA-haltige Agarosegele für Southern-Blot Analysen werden nach der Elektrophorese zur Depurinierung für zweimal 10 Minuten mit 0,2 M HCl behandelt und erst dann einer Denaturierung unterzogen. Diese erfolgt für dreimal 20 Minuten in Denaturierungspuffer. Die anschließende Neutralisierung erfolgt durch Inkubation für dreimal 30 Minuten in Neutralisierungspuffer. Die Äquilibriumierung der Gele vor dem Transfer erfolgt in 10× SSC. Die Nylonmembran wird in dH<sub>2</sub>O vorinkubiert. Der Southern-Blot wird als Kapillartransfer-Blot aufgebaut (Abbildung 2.4). Der Transfer der DNA erfolgt über den Flüssigkeitsstrom des Transferpuffer (10× SSC) aus der Wanne durch das Gel auf die Membran, an der die DNA zurück gehalten wird.

Nach dem Transfer wird die Membran für mindestens 30 Minuten an der Luft getrocknet. Zur Fixierung wird die Membran für eine Stunde bei 80°C gebacken woran sich ein „UV-Crosslinking“ (12.000 Joule) anschließt. Die Membran kann anschließend direkt für die Hybridisierung mit einer DNA-Sonde (2.2.20.1) verwendet oder bei RT gelagert werden.



**Abbildung 2.4:** Aufbau eines Southern-Blots

Schematische Darstellung eines Southern-Blots. Der Pfeil gibt die Richtung des DNA-Transfers an.

### 2.2.20.1 Hybridisierung der Membran

Vor der eigentlichen Hybridisierung wird die Membran zunächst für 4 - 6 Stunden in 0,2 ml Hybridisierungslösung pro cm<sup>2</sup> bei 50°C inkubiert. Die eigentliche Hybridisierung mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde (100 - 200 ng/ml; vgl. 2.2.20.2) erfolgt in Hybridisierungslösung  $\mu$ N bei 50°C im Hybridisierungsöfen. Die Membran wird im Anschluss zweimal für je 15 Minuten mit 2×SSC + 0,1% SDS, einmal für 15 Minuten mit 0,2×SSC + 0,1% SDS bei RT und schließlich für weitere 15 Minuten mit 0,2×SSC + 0,1% SDS bei 40°C gewaschen. Zur Erhöhung der Stringenz kann ein weiterer Waschschrift in 0,1×SSC + 0,1% SDS bei 65°C erfolgen. Vor der Detektion der DIG-markierten Sonde wird die Membran in Maleinsäurepuffer äquilibriert und für 1 Stunde blockiert (2% Blockierungslösung). Es folgt die Inkubation mit einem anti-DIG-Antikörper (1:2.500; Alkalische-Phosphatase gekoppelt; in 2% Blockierungslösung) für 2 Stunden bei RT. Die Membran wird dreimal für 10 Minuten mit Maleinsäurepuffer + 0,3% Tween 20 gewaschen und kurz mit Maleinsäurepuffer gespült, bevor die Umsetzung mit einem geeigneten Substrat erfolgt (NBT/BCIP, Roche).

### 2.2.20.2 Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde

Die für einen Southern-Blot benötigte Digoxigenin (DIG)-markierte DNA Sonde wird über eine PCR synthetisiert. Hierbei wird in eine PCR (siehe 2.2.18) anstelle der dNTPs ein PCR DIG *labeling mix* (Roche) eingesetzt. Dieser enthält je 2 mM dATP, dCTP, dGTP sowie 1,9 mM dTTP und 0,1 mM Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP). Für einen stärkeren Einbau von DIG-dUTP können alternativ die dNTPs aus je 2 mM dATP, dCTP, dGTP sowie 1 mM dTTP und 1 mM DIG-dUTP (Roche) gemischt werden. Bei der PCR wird das DIG-markierte Nukleotid direkt in das Amplifikationsprodukt eingebaut. Dieses wird aufgereinigt (siehe 2.2.16.3) und als Hybridisierungs-Sonde eingesetzt. Vor der Inkubation mit der Membran wird die Sonde für 10 Minuten aufgekocht, um den DNA-Doppelstrang zu trennen, anschließend direkt in flüssigen Stickstoff gegeben und auf Eis langsam aufgetaut.

### 2.2.21 *In situ* - Hybridisierung

#### 2.2.21.1 Fixierung nach Bouin

Adulte *S. mansoni* werden zur Fixierung für 90 Minuten bei Raumtemperatur in Bouin-Fixativ inkubiert. Es folgt eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 30 Minuten (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol). Zur Anfärbung werden dem

96%igen Ethanol 2 Tropfen Chromotrop 2R zugegeben. Für die anschließende Einbettung in Paraffin (siehe 2.2.21.2) werden die Schistosomen üN zusätzlich in Methylbenzoat und anschließend für 2× 5 Minuten in Benzol inkubiert.

#### **2.2.21.2 Einbettung in Paraffin**

Die Bouin-fixierten Schistosomen werden zunächst in warmem Paraplast (Reichert-Jung Histowax) vorinkubiert und dann in kleine Rechteck-Formen mit neuem, filtrierten, warmen (60°C) Paraplast überführt. Nach der Gewebeeinfiltration üN erfolgt die Aushärtung des Einbettmediums bei 4°C.

#### **2.2.21.3 Beschichtung der Objektträger und Deckgläser**

Um die Objektträger zu entfetten, werden diese üN in Ethanol/Aceton (1:1) inkubiert, anschließend mit dH<sub>2</sub>O gespült und getrocknet. Die Silikonisierung der Objektträger erfolgt mit TESPA (3-Aminopropyltriethoxysilan; Sigma) nach den Angaben des Herstellers. Die für die *in situ* - Hybridisierung verwendeten Deckgläser werden zur Silikonisierung mit Repel-Silican behandelt. Die Deckgläser werden hierfür in dieser Lösung 10 Minuten inkubiert, 2× mit dH<sub>2</sub>O gespült und bei 180°C für 2 Stunden sterilisiert.

#### **2.2.21.4 Herstellung von Semidünnschnitten**

Die Paraffin-Blöcke mit den eingebetteten Adulten werden trapezförmig getrimmt, wobei die spätere Schnittfläche möglichst klein sein sollte. Mit Hilfe eines Microtoms (Leica, Histoslid 2000 R) werden von diesen Paraffinblöcken 5 µm - Schnitte hergestellt. Diese werden auf die Oberfläche eines Wassertropfens auf einen Objektträger überführt. Die Objektträger werden auf einer Heizplatte (40°C) inkubiert, bis sich die Schnitte entfaltet und ausgebreitet haben. Das überschüssige Wasser wird anschließend vorsichtig von dem Objektträger abgenommen. Die Präparate werden zur Fixierung für 1 Stunde bei 60°C inkubiert und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **2.2.21.5 *In vitro* - Transkription**

Für die *in situ* - Hybridisierung müssen geeignete Sonden über *in vitro* - Transkription hergestellt werden. Die als Matrize für die Transkription dienende Plasmid-DNA wird zunächst auf der vom Promotor abgewandten Seite mittels Restriktionsendonukleasen linearisiert. Bei der Wahl der jeweiligen Restriktionsendonuklease sollte darauf geachtet

werden, dass ausschließlich solche verwendet werden, die *blunt ends* oder Enden mit 5'-Überhängen erzeugen, da so ausschließlich „run off“-Transkripte erzeugt werden können. Der Restriktionsansatz wird durch Fällung der linearisierten DNA und anschließender Resuspension in dH<sub>2</sub>O aufgereinigt.

Die Herstellung nicht-radioaktiver *in vitro* - Transkripte erfolgte mit Hilfe des Digoxygenin-Kits (Roche). In die Transkriptsynthese wird 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Für die *in situ* - Hybridisierung werden sowohl *antisense*- als auch *sense*-Transkripte zur Kontrolle hergestellt. Der Ansatz für die Transkriptionherstellung setzt sich wie folgt zusammen:

1,0 µg	linearisierte Plasmid-DNA
2,0 µl	10× Transkriptionspuffer
2,0 µl	10× DIG-rNTP Labeling Mix (Roche)
0,5 µl	RNasin (40 U/µl)
1,0 µl	T7- , T3- oder SP6-RNA-Polymerase (20 U/µl; Roche)
ad 20 µl	dH <sub>2</sub> O

Der Reaktionsansatz wird für 1 - 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die DNA aus dem Ansatz zu entfernen, wird dieser nach erfolgter Reaktion einer DNaseI-Behandlung unterzogen. Hierfür werden dem Transkriptionsansatz 20 Units einer RNase-freien DNaseI hinzugefügt und der Ansatz für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Präzipitation der Transkripte erfolgt anschließend über die Zugabe von 1/10 Volumen 2 M Li-Acetat, 2,5 Volumen 96%igem Ethanol und einer Inkubation für 1 Stunde bei -80°C mit anschließender Pelletierung der RNA durch Zentrifugation (30 Minuten, 13.000 rpm, 4°C). Das Pellet wird getrocknet und die Transkripte in 10 - 20 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur Überprüfung der Qualität wird ein Aliquot der Sonde einem Transkript-Blot (siehe 2.2.21.6) unterzogen.

#### 2.2.21.6 Transkript-Blot

Für den Transkript-Blot werden 2 - 5 µl der Transkripte auf einem denaturierenden Agarosegel (siehe 2.2.16.2) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Dokumentation wird das Gel 3× kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen und für 10 Minuten in 10× SSC geschwenkt. Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran findet über einen Northern-Blot mit 20× SSC als Transferpuffer statt. Der Northern-Blot erfolgt üN als Kapillartransfer-Blot und entspricht in seinem Aufbau dem eines Southern-Blots (vgl. Abbildung 2.4). Die Membran wird nach erfolgtem Transfer für 30 Minuten an der Luft getrocknet und die RNA durch

„UV-Crosslinking“ im Stratalinker an der Membran fixiert; die Spur mit dem Marker wird abgetrennt.

Zur Überprüfung der Digoxigenierung der Transkripte wird die Membran im Anschluss mit einem entsprechenden Antikörper behandelt. Hierfür wird sie zunächst in 2% Blockierungslösung (Roche; verdünnt in Maleinsäurepuffer) inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Zum Nachweis des Digoxigenins in den Transkripten wird der Filter mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-DIG-Antikörper (1:2.500 verdünnt in 2% Blockierungslösung) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membran 2× für 15 Minuten mit Maleinsäure-Waschlösung und 1× für 5 Minuten mit Substratpuffer I gewaschen. Für die Farbumsetzung werden Naphthol-AS-Phosphat (10 mg gelöst in 200 µl DMSO) und Fast Red TR (50 mg gelöst in 50 ml Substratpuffer I) gemischt, filtriert und auf die Membran gegeben. Die Färbung erfolgt innerhalb weniger Sekunden. Zum Stoppen der Reaktion wird der Filter in dH<sub>2</sub>O geschwenkt und anschließend getrocknet.

#### **2.2.21.7 Hybridisierung**

Für die spätere Hybridisierung müssen die Dünnschnittpräparate zunächst 2× 5 Minuten in Xylol deparaffiniert werden. Hieran schließt sich eine Hydrierung des Gewebes in einer absteigenden Alkoholreihe (2× Isopropanol, je 1× 96%, 70%, 50%, 30% Ethanol) für je 5 Minuten an. Es folgt eine 5-minütige Äquilibrierung in 37°C-warmem Proteinase K-Puffer und eine Proteinase K-Behandlung (Endkonz. 1µg/ml in Proteinase K-Puffer) für 30 Minuten bei 37°C. Nach dieser Behandlung werden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten 30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol) dehydriert und an der Luft getrocknet. Für die Prähybridisierung werden je 200 µl vorgewärmte Lösung S auf die Schnitte gegeben und diese in einer feuchten Kammer für 1 Stunde inkubiert. Die Lösung wird vorsichtig abgenommen und durch die Hybridisierungslösung (1 µg Transkripte in Lösung S pro Schnitt) ersetzt. Auf die Schnitte werden silikonisierte Deckgläschen aufgelegt. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer bei geeigneter Temperatur (Richtwert: 52°C).

#### **2.2.21.8 Detektion**

Nach erfolgter Hybridisierung werden die Deckgläschen in Waschlösung I (2× SSC, 0,1% Tween 20; für 15 Minuten) abgeschwemmt. Dieser Waschschrift wird ein zweites Mal wiederholt. Es schließen sich weitere Waschschrte in den Waschlösungen II (1× SSC),

III (0,5× SSC) und IV (0,1× SSC) für jeweils 20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur an, bevor die Objektträger für 5 Minuten (bei RT) in Maleinsäurepuffer gewaschen werden. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen werden die Schnitte anschließend in 4% Blockierungslösung (Roche; in Maleinsäurepuffer) für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Die Detektion der Digoxigenin-markierten Sonde erfolgt mittels anti-Digoxigenin-AP-Konjugaten (1:2.500 verdünnt in 2% Blockierungslösung), etwa 200 µl pro Schnittinsel, für 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Objektträger werden anschließend 2× 20 Minuten in Maleinsäurepuffer und einmal für 5 Minuten in Substratpuffer I gewaschen. Der Farbnachweis erfolgt mit Naphthol-AS-Phosphat (C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClNO<sub>5</sub>P; Serva) und Fast Red (4-Chlor-2-Methylbenzendiazonium; Sigma) in Substratpuffer I oder II für max. 1 Stunde bei Raumtemperatur. Hierfür werden 100 mg Fast Red-Farbstoff (gelöst in 100 ml Substratpuffer I) und 20 mg Naphthol-AS-Phosphat (gelöst in 500 µl DMSO) gemischt, filtriert und je 100 µl dieses Farbreagenz auf die Schnitte gegeben. Die Farbentwicklung wird dabei unter dem Mikroskop beobachtet. Zum Stoppen der Farbreaktion werden die Präparate in dH<sub>2</sub>O gegeben und schließlich mit AquaTex (Merck) eingedeckelt (modifiziert nach Köster et al., 1988).

## **2.2.22 Karminrot-Färbung von *S. mansoni***

### **2.2.22.1 Fixierung adulter und larvaler Schistosomen**

Adulte sowie Larven (Miracidien, Cercarien) von *S. mansoni* werden zur Fixierung für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur in AFA-Fixativ inkubiert und können im Anschluss mehrere Tage in dieser Lösung dunkel gelagert werden.

### **2.2.22.2 Whole mount - Färbung mit Karminrot und Einbettung**

Die fixierten Schistosomen werden für die Färbung in Karminrot-Lösung überführt und in dieser für bis zu 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfärbung erfolgt für 2 - 10 Minuten in sauren Ethanol (70%ig; 2,5% konz. HCl) wobei darauf zu achten ist, dass die Färbung nicht zu stark ausgewaschen wird. Vor der Einbettung werden die Schistosomen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%; je 5 Minuten) dehydriert und in Kanadabalsam (2:1 mit Xylol; Merck) eingedeckelt (modifiziert nach Machado-Silva et al., 1998).

### 2.2.22.3 Konfokale Lasermikroskopie Karminrot-gefärbter Schistosomen

Die Auswertung der mit Karminrot gefärbten Schistosomen erfolgt am konfokalen *laser scanning* Mikroskop (KLSM, Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus bei einer He/Ne-Laseranregung von 48% bei 488 nm und einem 470 nm *long pass* Filter zur Detektion.

### 2.2.23 Transformation von *S. mansoni*

Die Transformation adulter sowie larvaler Schistosomen erfolgt über Particle Bombardment (Wippersteg, 2002). Das Prinzip dieser Transformationsmethode beruht auf einem ballistischen DNA-Transfer (MacKenzie et al., 1966; Sanford et al., 1993). Für das Particle Bombardment wird die DNA an kleine Goldpartikel als Mikrocarrier gebunden. Diese werden mit hohem Druck auf die zu transformierenden Schistosomen (Adulte oder Larvenstadien) geschossen und damit die DNA mit den Goldpartikeln eingebracht.

#### 2.2.23.1 DNA-Gold-Präparation

In Vorbereitung des Particle Bombardments muss die einzubringende DNA an Goldpartikel (Mikrocarrier) gebunden werden. Hierfür muss das Gold zunächst wie folgt vorbereitet werden. 10 - 30 mg Goldpartikel (Durchmesser 0,6 µm oder 1,6 µm; BioRad) werden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß abgewogen und in 1 ml 70% Ethanol resuspendiert. Die Goldsuspension wird 3 - 5 Minuten gevortext und dann für 15 Minuten sedimentiert. Anschließend wird bei 13.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Goldpellet mit sterilem dH<sub>2</sub>O gewaschen. Hierfür wird das Pellet in 1 ml dH<sub>2</sub>O resuspendiert, worauf eine Minute Sedimentation und 5 Sekunden Zentrifugation (13.000 rpm) folgen. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschen werden die Goldpartikel in 50%igem Glycerin aufgenommen (Endkonzentration: 60 mg/ml). Das so vorbereitete Gold kann bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert werden.

Bei der DNA-Gold-Präparation wird das in Glycerin gelagerte Gold zunächst für 3 - 5 Minuten gevortext. Pro Bombardment werden 10 µl der Goldsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Unter Vortexen werden der Goldsuspension 0,5 - 5 µg der DNA, 10 µl CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) und 4 µl Spermidin (0,1 M) zugesetzt und für 3 Minuten gevortext. Nach einer Sedimentation für eine Minute bei Raumtemperatur wird der Ansatz anzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Gold-DNA-Pellet in 40 µl 100%igem Ethanol aufgenommen und resuspendiert. Zur besseren Resuspension folgt eine Behandlung für 10 Sekunden im Ultraschallbad (50 kHz; SONOREX TK30, Bandelin). Die Goldpartikel werden erneut durch

Zentrifugation pelletiert und mit 40 µl 100%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Gold-Pellet wird anschließend in 10 µl 100%igem Ethanol aufgenommen.

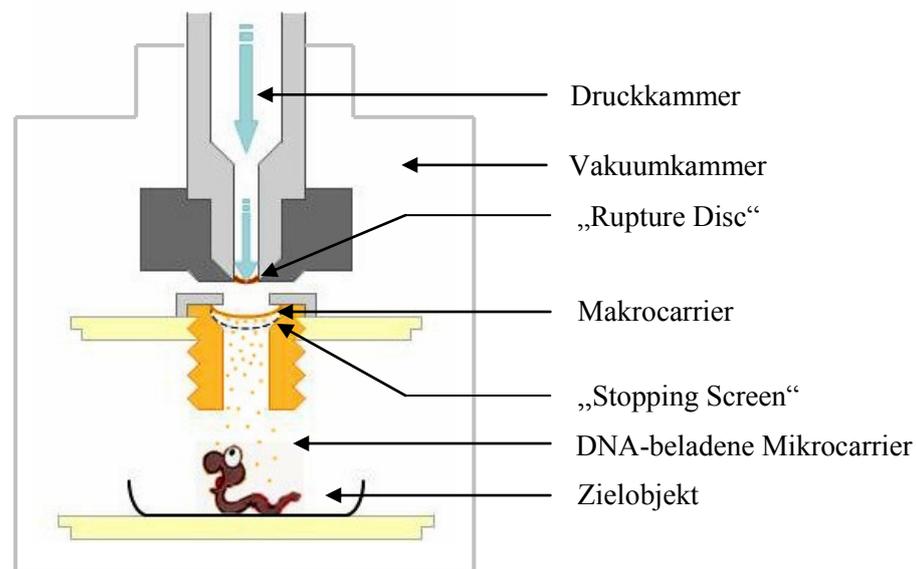
Um die Beladung des Goldes zu kontrollieren wird ein Aliquot der DNA-Gold-präparation anzentrifugiert und das Pellet in 20 µl Tris (10 mM; pH 8,0) resuspendiert. Unter gelegentlichem Vortexen wird der Ansatz 10 - 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA von den Goldpartikeln wieder abzulösen. Der Ansatz wird erneut zentrifugiert, der Überstand mit Blaumarker versetzt und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

### **2.2.23.2 Particle Bombardment adulter und larvaler Schistosomen**

Das Particle Bombardment adulter und larvaler Schistosomen erfolgte mit der Biolistic PDS1000/He<sup>®</sup> von BioRad. Für das Particle Bombardment werden 10 µl der DNA-Goldpartikel-Suspension auf die Unterseite eines Makrocarriers pipettiert. Nach Verdunsten des Ethanols wird der Gold-beladene Makrocarrier zusammen mit einem „Stopping Screen“ in die dafür vorgesehene Halterung der PDS1000 eingesetzt. Die zu transformierenden adulten Schistosomen, Miracidien oder Muttersporocysten werden in der Mitte einer Kulturschale gesammelt (von adulten Schistosomen wird zuvor weitestgehend das Medium abgenommen). Die Kulturschale wird dann in der Vakuum-Kammer auf oberster Stufe in den Focus des Schussbereiches eingesetzt. Um den Beschuss mit einem definierten Helium-Druck zu ermöglichen, wird in die Druckkammer der PDS1000 eine „Rupture Disc“ eingesetzt, die bei einem bestimmten Gasdruck bricht. Die Kammer wird für den Beschuss unter ein Vakuum von 15 Inch Hg gesetzt. Über Heliumgas wird in der Druckkammer der benötigte Druck bis zum Zerschneiden der „Rupture Disc“ erzeugt. Ist diese zerbrochen, gelangt der Gasdruck auf den Makrocarrier und beschleunigt ihn. Der zwischen Makrocarrier und Zielobjekt platzierte „Stopping Screen“ hält den Makrocarrier zurück, so dass nur die DNA-beladenen Mikrocarrier (Goldpartikel) diesen passieren und mit unvermittelter Geschwindigkeit auf das Zielobjekt treffen können. Abhängig von der Höhe des verwendeten Druckes und der gewählten Goldpartikel-Größe wird die Eindringtiefe der DNA-Goldpartikel in das Zielobjekt eingestellt. Nach dem Bombardment wird das Vakuum aus der Kammer entlassen und zu den adulten Schistosomen, Miracidien oder Muttersporocysten frisches Medium gegeben. Die Verteilung des Goldes und die Vitalität der Adulten bzw. Larven werden am Lichtmikroskop überprüft. Adulten Schistosomen werden 1 - 2 Stunden nach dem Bombardment in Kulturschalen mit frischem Medium M199 umgesetzt und weiter kultiviert. Transformierte Muttersporocysten werden ebenfalls nach dem Bombardment in frisches

Bge-Medium gegeben und weiter in der *in vitro* - Kultur gehalten. Transformierte Miracidien werden unmittelbar nach dem Bombardment für die Infektion von Schnecken eingesetzt.

Der Aufbau und das Prinzip des Particle Bombardments mit der PDS1000/He<sup>®</sup> (BioRad) sind in Abbildung 2.5 schematisch wiedergegeben.



**Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung des Particle Bombardments mit der PDS1000/He<sup>®</sup> (BioRad)

Schematisch dargestellt ist das Prinzip des Particle Bombardments mit der PDS1000. Das Helium-Gas gelangt nach dem Zerbrechen der „Rupture Disc“ auf den Makrocarrier und beschleunigt die auf der Unterseite von diesem befindlichen, DNA-beladenen Mikrocarrier durch den „Stopping Screen“ auf das Zielobjekt.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transformations-Experimenten wurden Schistosomen-Männchen mit 0,6 µm großen Goldpartikeln und Gasdrücken von 1.500 - 1.800 psi beschossen. Larvale Schistosomen (Muttersporocysten) hingegen mit 1,6 µm großen Goldpartikeln bei Drücken von 1.100 - 1.350 psi.

### 2.2.23.3 Konfokale Lasermikroskopie zum Nachweis der GFP-Reportergen-Aktivität

Als Reportergen bei der Transformation adulter oder larvaler Schistosomen diene das Grün Fluoreszierende Protein (GFP; ursprünglich aus *Aequorea victoria*) (Chalfie et al., 1994; Reichel et al., 1996). Der Nachweis der GFP-bedingten Fluoreszenz erfolgt am konfokalen *laser scanning* Mikroskop (KLSM, Leica TSC SP2).

Für die Mikroskopie werden die adulten Schistosomen in einen Tropfen Medium auf einem Objektträger überführt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Gleiches gilt für die

Muttersporocysten, die ebenfalls in einem Tropfen Medium auf den Objektträger überführt werden. Die Mikroskopie findet unter GFP-Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm statt. Die Detektion der Emission bei einer Wellenlänge von etwa 525 nm erfolgt mit einem entsprechenden Bandpassfilter.

## 2.2.24 dsRNA-Behandlung adulter *S. mansoni* zur RNA-Interferenz (RNAi)

### 2.2.24.1 Synthese der dsRNA

Die Synthese der einzelsträngigen RNA (ssRNA) erfolgte mit Hilfe des MEGAscript<sup>®</sup>-Kits (Ambion, T7/SP6). Als *template* für die Synthese der einzelsträngigen RNA dient Plasmid-DNA mit der entsprechenden Sequenz als Insert sowie einem flankierenden T7- und SP6-Promotor. Die Plasmid-DNA wird zunächst auf der vom Promotor abgewandten Seite mit einem Restriktionsenzym linearisiert, dass Enden mit 5'-Überhängen erzeugt. Je 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA wird als *template* in die Synthese der *sense*- und *antisense*-ssRNA mit der T7- bzw. SP6-RNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Für die „Annealing“-Reaktion werden äquivalente Mengen an *sense*- und *antisense*-ssRNA in 1× „Annealing“-Puffer (Gesamtvolumen 20 µl) gemischt und für 15 Minuten bei 68°C inkubiert. Der Erfolg des „Annealings“ wird auf einem Agarosegel im Vergleich zu den einzelsträngigen RNAs überprüft. Dabei sollte die doppelsträngige RNA (dsRNA) ein im Vergleich zu den ssRNAs verlangsamtes Laufverhalten im Gel zeigen.

### 2.2.24.2 Elektroporation von *S. mansoni* - Pärchen mit dsRNA

Für die Transformation adulter Schistosomen über Elektroporation werden jeweils 10 Pärchen in 50 µl Elektroporationspuffer (siPORT<sup>™</sup> siRNA Electroporation Buffer; Ambion), der 25 µg dsRNA enthält, in einer 4 mm Küvette (BioRad) inkubiert. Die Elektroporation erfolgt durch Anlegen eines einzelnen *square wave* - Impulses von 125 V für 20 ms bei Raumtemperatur (Ndegwa et al., 2007). Anschließend werden die Pärchen mit dem dsRNA-haltigen Elektroporationspuffer in 3 ml Kulturmedium überführt und weiter *in vitro* kultiviert. Täglich wird die Vitalität und die Paarungsstabilität kontrolliert. Nach 5 - 6 Tagen wird ein Teil der Schistosomen für molekulare Analysen eingefroren und die verbleibenden Würmer für die Untersuchung ihrer Morphologie in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt (vgl. 2.2.22).

### 3. ERGEBNISSE

In den letzten Jahren konnten verschiedene Signaltransduktionsmoleküle in *S. mansoni* identifiziert werden. Einige dieser Moleküle, wie die zelluläre Syk-Tyrosinkinase SmTK4, werden in den Reproduktionsorganen adulter Schistosomen exprimiert und sind in diesen möglicherweise an Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Aufklärung der Signalwege, an denen SmTK4 beteiligt ist, um so Hinweise auf eine Funktion dieses Moleküls zu erhalten. Hierfür wurde die bereits bekannte Interaktion mit der Src-Kinase SmTK6 über Co-Immunopräzipitationsexperimente bestätigt (Abschnitt 3.1), weitere an diesem Signalweg beteiligte Signalmoleküle identifiziert (Abschnitt 3.2 - 3.4) und Interaktionen mit bereits bekannten Rezeptoren über Yeast Two-Hybrid Analysen untersucht (Abschnitt 3.5, 3.6).

#### 3.1 Co-Immunopräzipitationsexperimente mit SmTK4 und SmTK6

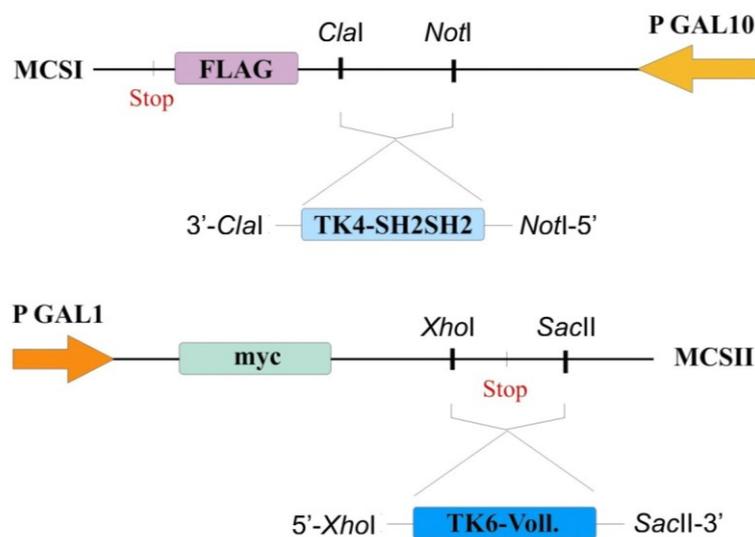
In der vorausgegangenen Diplomarbeit wurde in einem Yeast Two-Hybrid Screening mit der Tandem-SH2-Domäne der Syk-Kinase SmTK4 die Src-Kinase SmTK6 als ein *upstream* - Interaktionspartner identifiziert. Des Weiteren wurde eine Interaktion von SmTK4 mit der bereits bekannten Src-Kinase SmTK3 festgestellt. Eine Verifizierung und Quantifizierung der Interaktion zeigte, dass SmTK6 der stärkste und vermutlich spezifischste, in diesem Screening gefundene Interaktionspartner von SmTK4 war.

Um die im Yeast Two-Hybrid System identifizierte Interaktion der beiden Kinasen zu bestätigen, wurden in der vorliegenden Arbeit Co-Immunopräzipitationsexperimente im Hefe-System durchgeführt. Als Grundlage für diese Experimente wurde der Vektor pESC-HIS (Novagen) verwendet. Dieser besitzt den Vorteil, dass er zwei gegenläufige *multiple cloning sites* (MCS) besitzt, und damit ausgehend von einem GAL10- und einen GAL1-Promoter die simultane, Galaktose-induzierbare Expression von zwei verschiedenen Fusionsproteinen in Hefen erlaubt. Das ausgehend von dem GAL10-Promotor (MCSI) exprimierte Protein wird mit einem FLAG-Tag und das ausgehend von dem GAL1-Promotor (MCSII) exprimierte Protein mit einem c-Myc-Tag versehen. Gegen beide Tags sind kommerzielle Antikörper erhältlich, die für eine Co-Immunopräzipitation von zwei interagierenden Proteinen eingesetzt werden können, gegen die keine spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen, wie es bei SmTK4 und SmTK6 zu diesem Zeitpunkt der Fall war.

### 3.1.1 Klonierung des pESC-HIS-Konstruktes

Das pESC-HIS-Konstrukt wurde so konzipiert, dass die Sequenz für die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 in die MCSI von pESC-HIS kloniert wurde, so dass diese als Fusionsprotein mit C-terminalem FLAG-Tag exprimiert werden konnte. Die Volllänge-Sequenz von SmTK6 wurde hingegen in die MCSII kloniert, so dass diese als Fusionsprotein mit N-terminalem c-Myc-Tag exprimiert werden konnte (Abbildung 3.1).

Die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 wurde mit dem Primerpaar TK4-SH2SH2-pESC-His-5'/-3' und die Volllänge-Sequenz von SmTK6 (experimentell bedingt ohne die N-terminalen 250 bp) mit dem Primerpaar TK6-Voll.-pESC-His-5'/-3' amplifiziert. Die Primer enthielten jeweils die für die weitere Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen. Als *template* für die PCR wurde ein Volllänge-Klon von SmTK4 bzw. SmTK6 verwendet. Die Amplifikationsprodukte der erwarteten Größe von 824 bp (TK4-SH2SH2) bzw. 1475 bp (TK6-Volllänge) wurden zunächst in den Klonierungsvektor pDrive kloniert. Die Sequenz für die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 wurde dann über *NotI* und *ClaI* in die MCSI von pESC-HIS umklont. Die Volllänge-Sequenz von SmTK6 wurde anschließend in die MCSII des entstandenen Konstruktes TK4-SH2SH2-pESC-HIS über *XhoI* und *SacII* gerichtet und *in frame* kloniert, so dass sich das fertige Konstrukt TK4-SH2SH2 + TK6-Voll.-pESC-HIS ergab. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung überprüft.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des Konstruktes TK4-SH2SH2 + TK6-Voll.-pESC-HIS

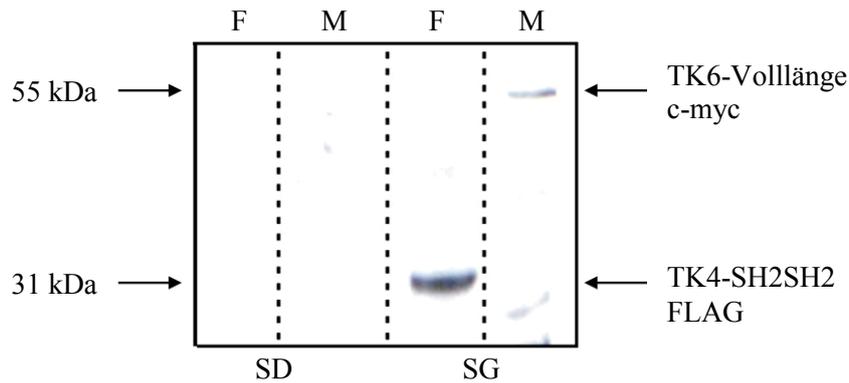
Die kodierende Sequenz für die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 wurde über *ClaI* und *NotI* in die MCSI von pESC-His 5'-wärts der Sequenz für den FLAG-Tag kloniert. Die kodierende Sequenz für SmTK6 wurde hingegen über *XhoI* und *SacII* in die MCSII von pESC-His 3'-wärts der Sequenz für den c-Myc-Tag kloniert (nähere Erläuterungen siehe Text).

Das so erstellte Konstrukt TK4-SH2SH2 + TK6-Voll.-pESC-HIS ermöglichte die simultane Expression der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 mit C-terminalen FLAG-Tag und der Vollängensequenz von SmTK6 mit N-terminalem c-Myc-Tag in Hefen für Co-Immuno-präzipitationsexperimente.

### 3.1.2 Transformation in Hefen und Überprüfung der Fusionsprotein-Expression

Das Konstrukt TK4-SH2SH2 + TK6-Voll.-pESC-HIS wurde in Hefen des Stammes YPH501 mit dem Paarungstyp Mat a/ $\alpha$  transformiert. Da der Vektor pESC-His als Wachstumsselektionsmarker ein Gen für die Synthese von Histidin trägt, erfolgte die Selektion der Klone auf SD-His-Selektionsplatten für 5 Tage bei 30°C. Erhaltene Kolonien wurden über Nacht in SD-His-Flüssigmedium angezogen. Zur Galaktose-induzierten Expression der beiden Fusionsproteine wurden die Zellen am nächsten Tag in SG-His-Flüssigmedium überführt und für weitere 5 Stunden inkubiert. Aus den Zellen einer 10 ml - Flüssigkultur wurden die Proteine isoliert und ihre Konzentration ermittelt. 10  $\mu$ g des Proteinlysates (pro Spur) wurden mittels einer 10%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und über einen Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Detektion der exprimierten Fusionsproteine erfolgte über einen Immunoblot mit einem anti-FLAG- (2,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) und einem anti-c-Myc-Antikörper (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) als Erst-Antikörper und einem *goat anti-rabbit-HRP* Zweitantikörper (1:70.000). Als Negativ-Kontrolle diente Proteinlysate aus einer Kultur mit Glucose anstatt Galaktose als Kohlenstoffquelle.

Die Expression der FLAG-getaggten Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 war in dem Proteinlysate der Galaktose-induzierten Kultur (SG) nachzuweisen. Von dem anti-FLAG-Antikörper wurde eine spezifische Proteinbande der erwarteten Größe von 31 kDa erkannt (Abbildung 3.2). In dem Proteinlysate der nicht-induzierten Kultur (SD), die als Negativ-Kontrolle diente, konnte durch denselben Antikörper kein Protein detektiert werden. Auch die Expression der c-Myc-getaggten SmTK6 konnte in dem Proteinlysate der Galaktose-induzierten Kultur nachgewiesen werden (Abbildung 3.2). Hier wurde von dem anti-c-Myc-Antikörper ein Protein der erwarteten Größe von 55 kDa erkannt, das in dem Lysate der nicht-induzierten Kultur nicht nachgewiesen werden konnte.

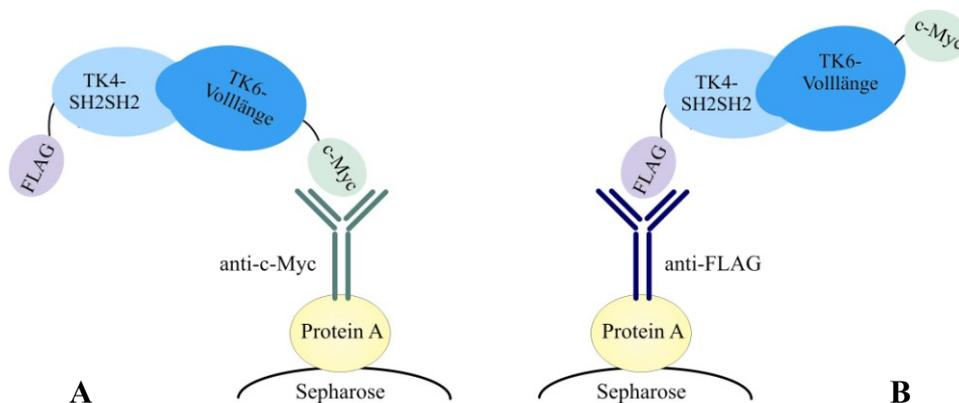


**Abbildung 3.2:** Nachweis der Expression von TK4-SH2SH2-FLAG und TK6-Volllänge-c-Myc

Die FLAG-getaggte Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 (31 kDa) und die c-Myc-getaggte SmTK6 (55 kDa) wurden in dem Proteinlysate einer durch Galaktose induzierten Kultur (SG) über einen anti-FLAG- (F) bzw. einen anti-c-Myc-Antikörper (M) nachgewiesen. Als Negativ-Kontrolle diente das Proteinlysate einer nicht-induzierten Kultur (SD).

### 3.1.3 Co-Immunopräzipitation in Hefen

Nach dem Nachweis der Expression beider Proteine erfolgte die eigentliche Co-Immunopräzipitation. Da die beiden Proteine mit einem unterschiedlichen Tag versehen waren, konnte die Co-Immunopräzipitation zum einen mit einem anti-c-Myc- (Abbildung 3.3 A) und zum anderen mit einem anti-FLAG-Antikörper (Abbildung 3.3 B) erfolgen.



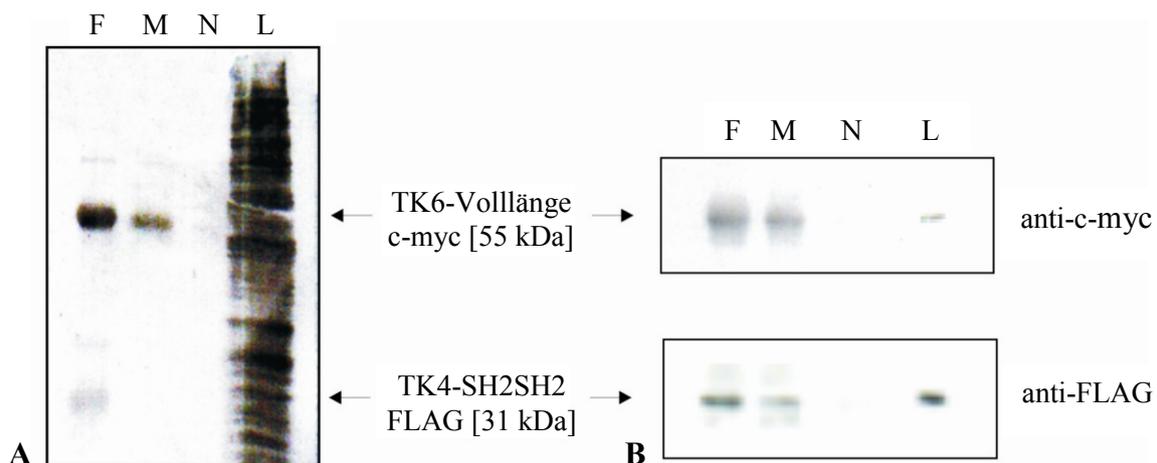
**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung der Co-Immunopräzipitation von SmTK4 und SmTK6

**A:** Co-Immunopräzipitation mit einem anti-c-Myc-Antikörper, gerichtet gegen den N-terminalen c-Myc-Tag von SmTK6. **B:** Co-Immunopräzipitation mit einem anti-FLAG-Antikörper, gerichtet gegen den C-terminalen FLAG-Tag der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4.

Für die Co-Immunopräzipitation wurden 70 µl des Proteinlysates aus der Galaktose-induzierten Kultur mit 30 µl Protein A-Sepharose zunächst vorinkubiert, um unspezifisch an die Protein A-Sepharose bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Das präinkubierte

Lysat wurde dann in zwei Aliquots aufgeteilt und mit 4 µg anti-FLAG-Antikörper bzw. 1 µg anti-c-Myc-Antikörper inkubiert, um die getaggen Proteine zu binden. Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz ohne Antikörperzugabe. Nach erfolgter Antikörper-Antigen-Bindung wurde der Komplex mittels Protein A-Sepharose präzipitiert. Die von der Sepharose abgelösten Proteine wurden mittels einer 10%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und über einen Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte über einen Immunoblot mit einem anti-FLAG- (2,5 µg/µl) und einem anti-c-Myc-Antikörper (1 µg/µl) als Erst-Antikörper und einem *goat anti-rabbit-HRP* Zweitantikörper (1:70.000) (Abbildung 3.4 B). Die Membran wurde im Anschluss zusätzlich mit INDIA INK gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen (Abbildung 3.4 A).

In der INDIA INK-Färbung der Membran, zeigten sich zwei prominente Banden, die in ihrer Größe den erwarteten Größen für die FLAG-getaggte Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 und der c-Myc-getaggen SmTK6 entsprachen (Abbildung 3.4 A). Durch den Immunoblot mit einem spezifischen anti-FLAG- bzw. anti-c-Myc-Antikörper wurde bestätigt, dass es sich bei diesen beiden Banden tatsächlich um die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 und um SmTK6 handelte (Abbildung 3.4 B). Die Co-Immunopräzipitation war sowohl mit dem anti-FLAG- als auch mit dem anti-c-Myc-Antikörper erfolgreich, wobei der Ansatz mit dem anti-FLAG-Antikörper die besseren Ergebnisse lieferte.



**Abbildung 3.4:** Co-Immunopräzipitation von TK4-SH2SH2-FLAG und TK6-Volllänge-c-Myc

**A:** INDIA INK-Färbung der Nitrocellulosemembran. **B:** Immunoblot mit einem anti-c-Myc- (oben) und anti-FLAG-Antikörper (unten). In den Spuren aufgetragen sind Proteine aus der **F:** Immunopräzipitation mittels anti-FLAG-Antikörper, **M:** Immunopräzipitation mittels anti-c-Myc-Antikörper, **N:** Negativ-Kontrolle ohne Antikörperzugabe. **L:** Proteine des eingesetzten Gesamtlisates.

Die zunächst im Yeast Two-Hybrid System identifizierte Interaktion der beiden zellulären Tyrosinkinasen SmTK4 und SmTK6 konnte somit auch über Co-Immuno-präzipitationsexperimente bestätigt werden.

### 3.2 Identifizierung von Bindungspartnern der Src-Kinase SmTK6

Um den Signalweg, in dem SmTK4 und SmTK6 involviert sind, weiter aufzuklären, sollten *upstream* - Bindungspartner von SmTK6 identifiziert werden. Hierfür wurde ein Yeast Two-Hybrid Screening mit Hefestämmen eines GAL4-basierenden Systems (Matchmaker, Clontech) durchgeführt. Die potentiellen Interaktionspartner wurden von einer *S. mansoni* cDNA-Bank in einem GAL4-Aktivierungsdomänen-Vektor kodiert (Knobloch, 2002).

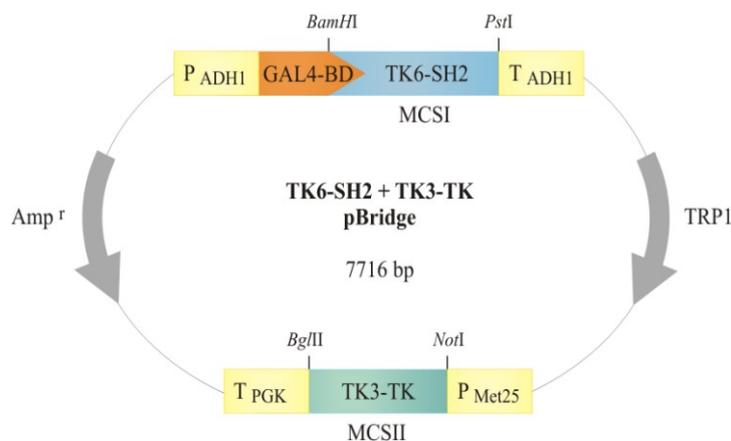
Die spezifische Interaktion einer Src-Kinase mit einem im Signalweg *upstream* liegenden Molekül erfolgt über die SH2-Domäne, die phosphorylierte Tyrosinreste des Bindungspartners erkennt (Hubbard & Till, 2000). Dementsprechend wurde die SH2-Domäne von SmTK6 in einen GAL4-DNA-Bindedomänen-Vektor kloniert und als *bait*-Protein eingesetzt. Das Screening fand unter der zusätzlichen Expression der Tyrosinkinase-Domäne (TK-Domäne) der schistosomalen Src-Kinase SmTK3 statt, so dass es sich faktisch um ein Yeast Three-Hybrid Screening handelte (Tirode et al., 1997). Durch die Expression dieser spezifischen, schistosomalen TK-Domäne sollte die posttranslationale Modifikation potentieller Interaktionspartner (*prey*-Proteine) sicher gestellt werden, da Hefen selber keine spezifische Tyrosinkinase-Aktivität besitzen (Ptacek et al., 2005). Eine Phosphorylierung von Tyrosinresten ist jedoch für eine Interaktion notwendig, da Tyrosine nur im phosphorylierten Zustand gute Bindungsstellen für SH2-Domänen darstellen. Ein erhöhtes Phosphorylierungsmuster von Tyrosinresten in den Hefen durch die Expression der TK-Domäne von SmTK3 wurde im Vorfeld bereits bestätigt (Philipp, 2004).

#### 3.2.1 Klonierung des *bait*-Konstruktes TK6-SH2 + TK3-TK pBridge

Für das Yeast Three-Hybrid Screening musste zunächst ein geeignetes *bait*-Konstrukt kloniert werden, über das die SH2-Domäne von SmTK6 sowie die TK-Domäne von SmTK3 in Hefen exprimiert werden konnten. Als Grundlage für die Klonierung diente der Vektor pBridge (Clontech), der zwei Klonierungsstellen besitzt und so die Expression von zwei Proteinen ermöglicht – ein konstitutiv exprimiertes Fusionsprotein mit der DNA-Binde-

domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (MCSI) unter der Kontrolle eines ADH1-Promotors ( $P_{ADH1}$ ) sowie ein zusätzliches Protein (MCSII) unter der Kontrolle eines Methionin-reprimierbaren Promotors ( $P_{Met25}$ ). Der verwendete pBridge-Vektor enthielt in der MCSII bereits die kodierende Sequenz für die TK-Domäne von SmTK3 (Philipp, 2004).

Die kodierende Sequenz für die SH2-Domäne von SmTK6 musste in die MCSI des pBridge-Vektors kloniert werden. Hierfür wurde sie über eine PCR mit spezifischen Primern amplifiziert, welche die für die spätere Klonierung in pBridge benötigten Restriktions-schnittstellen enthielten (TK6-SH2-5'-*Bam*HI, TK6-SH2-3'-*Pst*I). Als *template* für die PCR wurde ein Vollängenklon von SmTK6 verwendet. Das PCR-Produkt von 355 bp wurde zunächst in den Klonierungsvektor pDrive kloniert und schließlich über *Bam*HI und *Pst*I gerichtet in die MCSI von pBridge *in frame* hinter die GAL4-DNA-Bindedomäne umkloniert. Zur Kontrolle wurde das *bait*-Konstrukt sequenziert. Das komplette *bait*-Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK pBridge enthielt die Sequenzen für die SH2-Domäne von SmTK6 in der MCSI und für die TK-Domäne von SmTK3 in der MCSII (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5:** Schematische Darstellung des *bait*-Konstruktes TK6-SH2 + TK3-TK pBridge

[TK6-SH2: Src-Homologie-Domäne 2 von SmTK6 (355 bp) in der MCSI; TK3-TK: Tyrosinkinase-Domäne von SmTK3 (861 bp) in der MCSII; GAL4-BD: GAL4-DNA-Bindedomäne (540 bp);  $P_{ADH1}$ : ADH1-Promoter,  $P_{Met25}$ : Methionin-reprimierbarer Promotor,  $T_{ADH1}$ : ADH1-Terminator,  $T_{PGK}$ : PGK-Terminator; TRP1: Tryptophan-Gen 1 (Wachstumsselektionsmarker für Hefen),  $Amp^r$ : Ampicillin-Resistenz-Gen (Selektion in Bakterien)]

Um den Einfluss der Expression der Tyrosinkinase-Domäne von SmTK3 auf die Interaktion eines *prey*-Proteins mit der SH2-Domäne von SmTK6 vergleichend überprüfen zu können, wurde zusätzlich das *bait*-Konstrukt TK6-SH2 pBridge ohne TK-Domäne von SmTK3 in der MCSII erstellt.

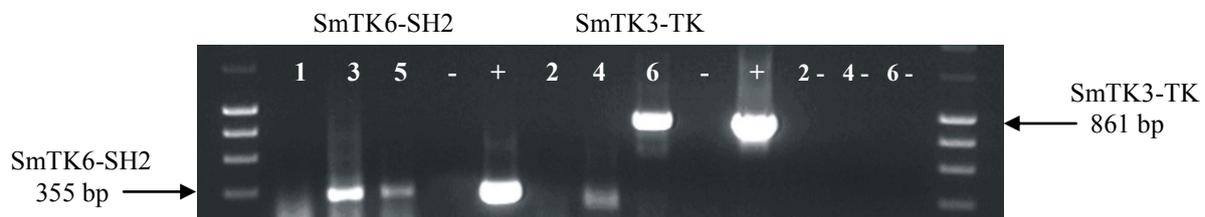
### 3.2.2 Überprüfung der Funktionalität des *bait*-Konstruktes TK6-SH2 + TK3-TK

Vor Beginn des Yeast Three-Hybrid Screenings musste zunächst überprüft werden, ob die *bait*-Konstrukte auf der Basis des Matchmaker GAL4-Systems für das Screening der *S. mansoni* Yeast Two-Hybrid Bank eingesetzt werden können. Die beiden Konstrukte TK6-SH2 + TK3-TK pBridge und TK6-SH2 pBridge wurden separat in Hefezellen des Stammes AH109 transformiert und diese auf Tryptophan-Mangelplatten selektioniert. Der Hefestamm AH109 ist tryptophan-auxotroph – erst durch die Aufnahme des *bait*-Plasmids ist er durch das auf dem Plasmid liegende *TRP1*-Gen in der Lage, Tryptophan zu synthetisieren und damit auf den Mangelplatten zu wachsen.

Da der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen im Matchmaker-System durch die Expression der Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *LacZ* der Hefestämme (AH109, Y187) erfolgt, ist es notwendig, zu prüfen, ob diese Gene möglicherweise durch das *bait*-Protein autonom in den Hefezellen aktiviert werden. Dazu wurden beide Hefeklonen separat auf Selektionsplatten ausgestrichen, denen neben Tryptophan auch Adenin und Histidin fehlte. Da innerhalb eines Zeitraums von zehn Tagen bei einer Inkubationstemperatur von 30°C kein Kolonienwachstum beobachtet werden konnte, wurde eine autonome Aktivierung der Reportergene durch die *bait*-Konstrukte ausgeschlossen. Anschließend wurde mit Hefeklonen auf SD-Trp-Selektionsplatten ein  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay durchgeführt, bei dem die Expression der durch das *LacZ*-Reportergen kodierten  $\beta$ -Galaktosidase durch die Umsetzung des Substrats X-Gal in einen blauen Indigo-Farbstoff sichtbar gemacht wird. Da auch nach 24-stündiger Inkubation keine Blaufärbung detektiert werden konnte, wurde auch für dieses Reportergen eine autonome Aktivierung durch die *bait*-Konstrukte ausgeschlossen.

Für den Nachweis der Expression der beiden Proteine (TK6-SH2, TK3-TK) in Hefen auf der Ebene der Transkription, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst aus den Hefeklonen, die mit den *bait*-Konstrukten TK6-SH2 + TK3-TK pBridge bzw. TK6-SH2 pBridge transformiert waren, Total-RNA isoliert. Als Negativ-Kontrolle diente Total-RNA aus untransformierten Hefen. Die isolierten RNAs wurden als *templates* für RT-PCRs verwendet, bei denen TK6-SH2-Domänen-spezifische (TK6-SH2-5'/-3') bzw. TK3-TK-Domänen-spezifische (TK3-TK-5'/-3') Primer eingesetzt wurden. Die RT-Reaktionen erfolgten mit jeweils 90 ng der isolierten RNAs, dem jeweiligen 3'-Primer und der Reversen Transkriptase SensiScript (Qiagen). Ein Viertel der Reaktionen wurden als *templates* in die sich anschließenden PCRs eingesetzt.

Die Transkription der SH2-Domäne von SmTK6 konnte in den Hefen, die mit den *bait*-Konstrukten transformiert waren, nachgewiesen werden. In beiden Reaktionen wurden Amplifikate der erwarteten Größe von 355 bp nachgewiesen (Abbildung 3.6; Spuren 3, 5). Die Expression der TK-Domäne von SmTK3 konnte wie erwartet nur in Hefen nachgewiesen werden, die mit dem *bait*-Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK pBridge transformiert waren (Abbildung 3.6; Spur 6). In dieser Reaktion wurde das erwartete Amplifikationsprodukt von 861 bp erhalten. In der Reaktion mit RNA aus Hefen, die mit dem *bait*-Konstrukt TK6-SH2 pBridge transformiert waren, wurde lediglich ein unspezifisches Produkt geringerer Größe erhalten (Abbildung 3.6; Spur 4). Die Expression der beiden Proteine in den Hefen und die Funktionalität der *bait*-Konstrukte waren damit auf transkriptioneller Ebene erwiesen.



**Abbildung 3.6:** Nachweis der Expression der *bait*-Konstrukte auf transkriptioneller Ebene

Ergebnis der RT-PCR-Analysen zum Nachweis der Transkription der SH2-Domäne von SmTK6 (1, 3, 5) bzw. der TK-Domäne von SmTK3 (2, 4, 6) (nähere Erläuterungen siehe Text). Als *templates* dienen Total-RNAs aus Hefen, die mit TK6-SH2 pBridge (3, 4) bzw. TK6-SH2 + TK3-TK pBridge (5, 6) transformiert waren, sowie als Kontrolle aus untransformierten Hefen (Stamm AH109) (1, 2). Bei den RT-Negativ-Kontrollen ohne initiale cDNA-Synthese diente RNA aus den gleichen Hefeklonen als *template* (2-, 4-, 6-). -: PCR-Negativ-Kontrolle ohne *template*. + : PCR-Positiv-Kontrolle mit TK6-SH2 + TK3-TK pBridge als *template*. Je 12,5 µl der Ansätze wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die erwarteten PCR-Produkte besaßen eine Größe von 355 bp (TK6-SH2) bzw. 861 bp (TK3-TK). Größenstandard: HyperLadderI (Bioline).

### 3.2.3 Yeast Three-Hybrid Screening mit dem *bait*-Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK

Nachdem eine autonome Aktivierung der Reportergene durch das *bait*-Protein ausgeschlossen werden konnte und die Transkription der erstellten *bait*-Konstrukte in Hefen überprüft worden war, wurde mit dem sukzessiven Screening der *S. mansoni* Yeast Two-Hybrid Bank begonnen. Der initiale Schritt bestand in dem Mating der *bait*- und *prey*-Plasmid tragenden Stämme entgegengesetzten Paarungstyps. Die *prey*-Plasmide (*S. mansoni* cDNA-Bank in pGADT/-Rec; Selektionsmarker *LEU2*) lagen im Hefestamm AH109 vor, der den Paarungstyp Mat a besitzt (Reportergene *ADE2*, *HIS3*, *LacZ*). Daher wurden das *bait*-Plasmid TK6-SH2 + TK3-TK pBridge (Selektionsmarker *TRP1*) in den Hefestamm Y187 mit dem Paarungstyp Mat α transformiert (Reportergene *HIS3*, *LacZ*).

### 3.2.3.1 Mating mit der *S. mansoni* Yeast Two-Hybrid Bank

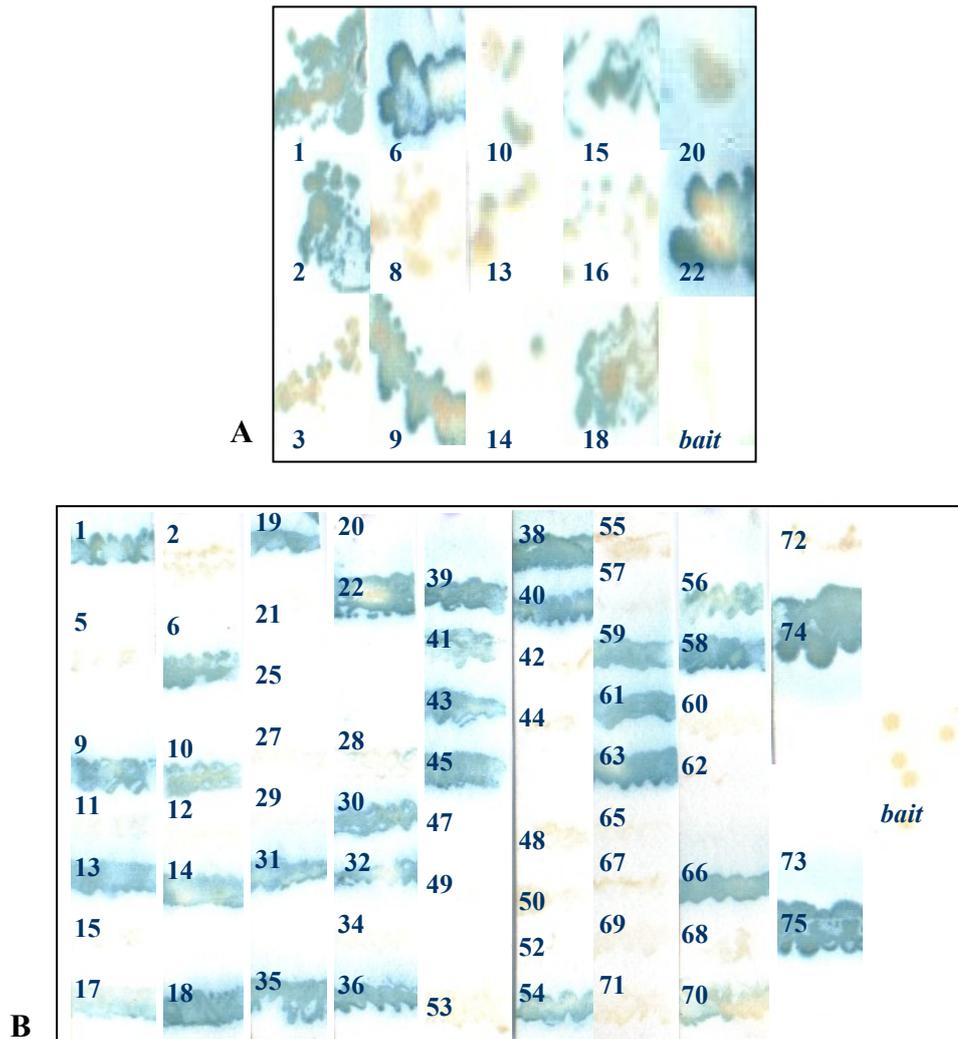
Für das Mating wurde eine 5 ml - Kultur des *bait*-Plasmid-tragenden Klonen des Hefestammes Y187 auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml eingestellt und mit einem 1 ml - Aliquot der *S. mansoni* Yeast Two-Hybrid Bank (Stamm AH109) über Nacht inkubiert. Durch das Mating zwischen den beiden Stämmen unterschiedlichen Paarungstyps entstanden diploide Hefezellen, die sowohl *bait*- als auch *prey*-Plasmide enthielten und die Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *LacZ* besaßen. Zum Nachweis einer Interaktion zwischen *prey*- und *bait*-Protein wurde die Mating-Kultur auf Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin ausgestrichen (SD-Trp/-Leu/-His). Durch das Fehlen dieser Aminosäuren konnten nur diploide Hefezellen wachsen, die beiden Typen von Plasmiden enthielten, und bei denen es durch die Interaktion der beiden Proteine zur Expression des *HIS3*-Reportergens im Hefegenom gekommen war.

Das Mating wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Auswertung der Einzel-Selektionsplatten zur Bestimmung der Mating-Effizienz ergab bei dem ersten Screening eine Effizienz von 10,7% und bei dem zweiten Screening von 2,5%, was die im Protokoll geforderten  $\geq 2\%$  erfüllte.

Auf den Selektionsplatten (SD-Trp/-Leu/-His), auf denen die Mating-Kultur ausgestrichen wurden, waren nach 10 Tagen Inkubation bei 30°C im ersten Screening 22 Klone und im zweiten Screening 77 Klone gewachsen. Diese wurden nummeriert und für eine weitere Überprüfung auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade Selektionsplatten umgestrichen, durch die nicht nur auf die Expression des Reportergens *HIS3* sondern auch des *ADE2*-Reportergens selektioniert wurde. Von den 22 Klonen aus dem ersten Screening waren nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C noch 14 Klone und von den 77 Klonen aus dem zweiten Screening noch 62 Klone zum Wachstum auf den Selektionsplatten befähigt.

### 3.2.3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Kolonie-Filterassay

Über einen  $\beta$ -Galaktosidase-Kolonie-Filterassay wurde in den selektionierten Klonen die Expression des dritten Reportergens im Hefegenom, des *LacZ*-Gens, überprüft, die als wichtigster Hinweis auf eine positive Interaktion von einem *prey*- mit dem *bait*-Protein dient. Der Assay wurde mit Kolonien der 14, bzw. 62 Hefeklone durchgeführt, die ein positives Wachstum auf den Selektionsplatten zeigten. Als Negativ-Kontrolle dienten Hefe-Kolonien des Stammes Y187, die ausschließlich mit dem *bait*-Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK pBridge transformiert waren (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7 :** β-Galaktosidase-Filterassays mit den Klonen aus den TK6-SH2 + TK3-TK Screenings

Ergebnis der β-Galaktosidase-Filterassays mit X-Gal als Substrat zur Überprüfung der Protein-Protein-Interaktionen (**A:** 1. Screening, **B:** 2. Screening). Als Negativ-Kontrollen dienten Hefen, die ausschließlich mit dem *bait*-Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK pBridge transformiert waren (*bait*). Hefeklone, bei denen durch eine Interaktion zwischen dem *bait*-Protein mit einem *prey*-Protein das *LacZ*-Reportergen und somit die β-Galaktosidase exprimiert wurde, zeigten eine deutliche Blaufärbung der Kolonien (5 - 20 Stunden Inkubation bei 30 °C). Die Nummern repräsentieren die Hefe-Klonnummern.

Die Filter wurden 5 - 20 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach dieser Zeit zeigten die Kolonien der Negativ-Kontrolle (Y187, transformiert mit dem *bait*-Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK pBridge) keine Färbung. Die erhaltenen Blaufärbungen bei den übrigen Hefeklonen wurden daher als spezifisch für die Interaktion von einem *prey*- mit dem *bait*-Protein eingestuft. Nach der Inkubation wiesen 7 der 14 Klone aus dem ersten und 29 der 62 Klone aus dem zweiten Screening eine deutliche Farbreaktion auf (siehe Tabelle 3.1). Diese Klone wurden als positiv eingestuft und weiter analysiert.

**Tabelle 3.1:** Übersicht über die Klone aus dem sukzessiven Screening mit TK6-SH2 + TK3-TK

	SD-Trp/-Leu/-His Selektionsplatten	SD-Trp/-Leu/-His/-Ade Selektionsplatten	$\beta$ -Galaktosidase-Filterassay
<b>1. Screening</b>	22 Klone	14 Klone	7 Klone: 1, 2, 6, 9, 15, 18, 22
<b>2. Screening</b>	77 Klone	62 Klone	29 Klone: 1, 6, 9, 10, 13, 14, 18, 19, 22, 30, 31, 32, 35, 36, 38, 40, 41, 43, 45, 54, 56, 58, 59, 61, 63, 66, 74, 75

### 3.2.3.3 Identifizierung der putativen *upstream*-Bindungspartner von SmTK6

Die im  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay positiv getesteten Hefeklone wurden in Selektionsmedium ohne Leucin angezogen, um durch die Verringerung des Selektionsdrucks auf das *bait*-Plasmid (Selektionsmarker *TRP1*) bei simultaner Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks auf das *prey*-Plasmid (Selektionsmarker *LEU2*) selektiv dessen Anreicherung zu bewirken. Aus diesen Hefen wurde die Gesamtplasmid-DNA isoliert und in eine Transformation von *E. coli* Zellen eingesetzt, die auf LB<sup>Amp</sup>-Platten selektioniert wurden. Gewachsene Bakterienklone wurden über eine Kolonie-PCR mit dem *prey*-spezifischen Primerpaar pGADT7-5’/-3’ (alternativ wurden auch die Primerpaare pGADT-neu-5’/-3’ oder *prey*-5’/-3’ eingesetzt) auf das Vorhandensein von *prey*-Plasmiden überprüft. Aus PCR-positiven Bakterien-Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert.

Die Bestimmung der Insertgröße in den isolierten *prey*-Plasmiden erfolgte zum einen über eine PCR mit dem Primerpaar pGADT7-5’/-3’, welches die MCS im Vektor flankiert, und zum anderen über einen Restriktionsverdau der Plasmide mit *EcoRI* und *XhoI*, die die Inserts herausschneiden.

Zur Identifizierung der für die interagierenden Proteine kodierenden Sequenzen, wurden die *prey*-Plasmide mit dem Primer pGADT7-5’ sequenziert, der 5’-wärts des Inserts im Vektor pGADT7-Rec (*prey*) bindet. Die Insertsequenzen der einzelnen Klone sind im Anhang wiedergegeben (Anhang 5.1). Mit den ermittelten Sequenzen wurden Vergleiche mit der *S. mansoni* Genom- und Transkriptomdatenbank ([www.sagner.ac.uk](http://www.sagner.ac.uk), [www.tigr.org](http://www.tigr.org)) durchgeführt und homologe Proteine mit Hilfe des Programms BlastX (Altschul et al., 1997) identifiziert. Die erhaltenen Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabellen 3.2 und 3.3).

**Tabelle 3.2:** Ergebnisse der Identifizierung der putativen Bindungspartner von SmTK6 (1. Screening)  
\*: bekannt als falsch-positive Bindungspartner im Yeast Two-Hybrid System

Gruppe	Klon Nr.	Insertgröße (bp)	Sequenzierter Bereich (bp)	Homologie
1	22	1500	1266	Mucin
2	6	650	615	Cytochrom P450 (2c)*
	9	850	815	Dynein*
	15	900	903	Prefoldin $\alpha$ (c-myc Bindeprotein)
3	1, 2, 18			Isolierung der <i>prey</i> -Plasmide nicht erfolgreich

**Tabelle 3.3:** Ergebnisse der Identifizierung der putativen Bindungspartner von SmTK6 (2. Screening)

Gruppe	Klon Nr.	Insertgröße (bp)	Sequenzierter Bereich (bp)	Homologie
1	1	2000	1167	Mucin
	6	1200	1083	
	9	1500	1096	
	10	1500	1127	
	18	1500	1090	
	36	2000	1140	
	38	1500	932	
	40	1800	1050	
	43	1800	918	
	45	2000	1174	
	54	1300	1069	
	59	2000	1075	
	63	2000	1062	
2	50	2500	1052	TK3 aus <i>S. mansoni</i>
	56	2500	946	
	58	2500	1039	
3	41	1500	1160	Discs-large Protein
4	17	1500	1118	keine signifikante Homologie
	66	1500	147	keine signifikante Homologie
5	13, 14, 19, 30, 31, 32, 35, 61			Isolierung der <i>prey</i> -Plasmide nicht erfolgreich
6	74, 75			Sequenzierung nicht erfolgreich

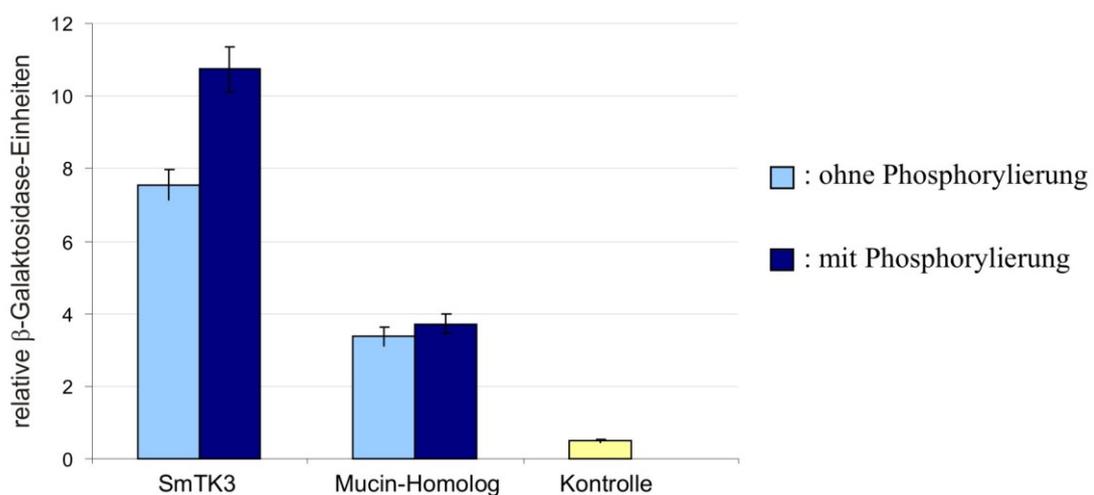
Einige der identifizierten Proteine wurden als falsch-positive Bindungspartner eingestuft, da sie dafür bekannt sind, in Yeast Two-Hybrid Screenings unspezifische Bindungen mit einer Vielzahl verschiedener *bait*-Proteine einzugehen (in Tabelle 3.2 mit einem Stern markiert; [www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html](http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html)).

### 3.2.3.4 Verifizierung der Interaktion

Zur Verifizierung der Interaktion und zum Ausschluss falsch-positiver Klone wurden die isolierten *prey*-Plasmide zusammen mit dem *bait*-Plasmid in Hefen des Stammes AH109 co-transformiert und die Interaktion der beiden, von den Plasmiden kodierten Proteine, über Wachstumsselektion (SD-Trp/-Leu/-Ade/-His) überprüft. Für eine vergleichende Analyse der Phosphorylierungs-Abhängigkeit der Protein-Interaktionen erfolgte die Co-Transformation der *prey*-Plasmide zusammen mit dem ursprünglichen *bait*-Plasmid TK6-SH2 + TK3-TK pBridge sowie parallel mit dem *bait*-Plasmid TK6-SH2 pBridge. Durch das Wachstum aller Doppeltransformatanten auf Selektionsplatten wurde die Interaktion verifiziert.

### 3.2.3.5 Quantifizierung der Interaktion

Mit dem zuvor durchgeführten  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay war lediglich eine qualitative Überprüfung der Protein-Protein-Interaktion möglich. Zur Quantifizierung der Interaktionsstärken und zur Beurteilung der Phosphorylierungs-Abhängigkeit der jeweiligen Interaktionen wurden  $\beta$ -Galaktosidase-Assays in Flüssigkultur mit 2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galacto-pyranosid (ONPG) als Substrat durchgeführt. Hierfür wurde exemplarisch jeweils ein Klon ausgewählt, der für den potentiellen SmTK6-Interaktionspartner SmTK3 bzw. das Mucin-Homolog kodierte. Die weiteren Klone wurden vernachlässigt, da sie zuvor als falsch-positive Interaktionspartner eingestuft wurden (vgl. 3.2.3.3). Als Negativ-Kontrolle dienten untransformierte Hefen des Stammes AH109 (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:**  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Protein-Protein-Interaktionsstärken

Dargestellt sind die ermittelten Bindungsstärken zwischen der SH2-Domäne von SmTK6 und SmTK3 bzw. dem Mucin-ähnlichen Protein in Abhängigkeit von einer Phosphorylierung (n = 6). Nicht-transformierte Hefen (Stamm AH109) dienten als Negativ-Kontrolle.

Die SH2-Domäne von SmTK6 und das partielle SmTK3-Expressionsprodukt zeigten die stärkste der gemessenen Interaktionen. Die Stärke dieser Interaktion wurde zudem durch die zusätzliche Tyrosin-Phosphorylierung über die Expression der SmTK3-TK-Domäne signifikant erhöht. Die Interaktion der SH2-Domäne von SmTK6 mit dem (partiellen) Mucin-Expressionsprodukt war etwa um den Faktor 2 - 3 schwächer. In diesem Fall konnte die Bindungsstärke durch die zusätzliche Expression der SmTK3-TK-Domäne nur schwach verstärkt werden.

### 3.3 Identifizierung von Bindungspartnern der Syk-Kinase SmTK4

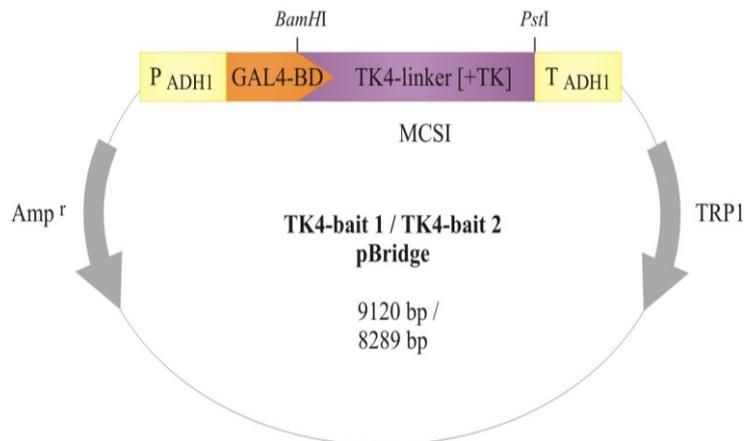
In einem vorausgegangen Screening zur Identifizierung von Bindungspartnern der Syk-Kinase SmTK4 aus *S. mansoni* wurden die beiden tandemartig angeordneten SH2-Domänen als *bait*-Protein eingesetzt. Da die SH2-Domänen der Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste in *upstream*-Interaktionspartnern dienen, sollten auf diesem Weg in der Signalkaskade oberhalb der SmTK4 agierende Moleküle identifiziert werden. Bei diesem Screening wurden die Src-Kinasen SmTK6 und SmTK3 als Interaktionspartner identifiziert.

Für die weitere Aufklärung des Signalweges, an dem diese Tyrosinkinase potentiell beteiligt sind, wurde ein Yeast Two-Hybrid Screening durchgeführt, über das *downstream* der SmTK4 gelegene Moleküle identifiziert werden sollten. Für Syk-Kinasen ist beschrieben, dass *downstream*-Interaktionspartner an die Tyrosinkinase-Domäne binden, wobei die Spezifität der Interaktion von der „linker“-Region, dem Bereich zwischen den beiden SH2-Domänen und der Tyrosinkinase-Domäne, bestimmt wird (Moon et al., 2005). Anderen Untersuchungen zufolge binden Interaktionspartner jedoch nur an Aminosäurereste in der „linker“-Region (Moon et al., 2005). Um eine differenzierte Aussage bezüglich der beiden unterschiedlichen Hypothesen treffen zu können, wurden zwei verschiedene *bait*-Konstrukte erstellt, die zum einen für die „linker“-Region und die TK-Domäne und zum anderen ausschließlich für die „linker“-Region als *bait*-Protein kodierten.

#### 3.3.1 Klonierung der *bait*-Konstrukte TK4-bait1 und TK4-bait2 pBridge

Für die Konstruktion der *bait*-Plasmide wurde über eine PCR zum einen mit dem Primerpaar TK4-bait1-5'/TK4-bait1-3' die „linker“-Region mit der TK-Domäne und zum anderen mit dem Primerpaar TK4-bait1-5'/TK4-bait2-3' ausschließlich die „linker“-Region von SmTK4 amplifiziert. Als *template* für die PCR diente ein Volllängenklon von SmTK4.

Die erhaltenen Amplifikationsprodukte von 2620 bp (TK4-bait1) bzw. 1789 bp (TK4-bait2) wurden zunächst in den Klonierungsvektor pDrive kloniert und schließlich gerichtet über *Bam*HI und *Pst*I in die MCSI von pBridge *in frame* hinter die GAL4-DNA-Bindedomänensequenz umkloniert. Die Konstrukte wurden zur Überprüfung sequenziert. Nachfolgend sind die kompletten *bait*-Konstrukte, TK4-bait1 pBridge bzw. TK4-bait2 pBridge, welche die Sequenzen für die „linker“-Region und TK-Domäne bzw. nur für die „linker“-Region von SmTK4 in der MCSI enthielten zusammengefasst dargestellt (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9:** Schematische Darstellung der *bait*-Konstrukte TK4-bait1 bzw. TK4-bait2 pBridge [TK4-linker + TK: „linker“-Region und Tyrosinkinase-Domäne von SmTK4 (2620 bp) in der MCSI (TK4-bait1); TK4-linker: „linker“-Region von SmTK4 (1789 bp) in der MCSI (TK4-bait2); GAL4-BD: GAL4-DNA-Bindedomäne (540 bp); P<sub>ADHI</sub>: ADH1-Promoter, T<sub>ADHI</sub>: ADH1-Terminator; TRP1: Tryptophan-Gen 1 (Wachstumsselektionsmarker für Hefen), Amp<sup>r</sup>: Ampicillin-Resistenz-Gen (Selektion in Bakterien)]

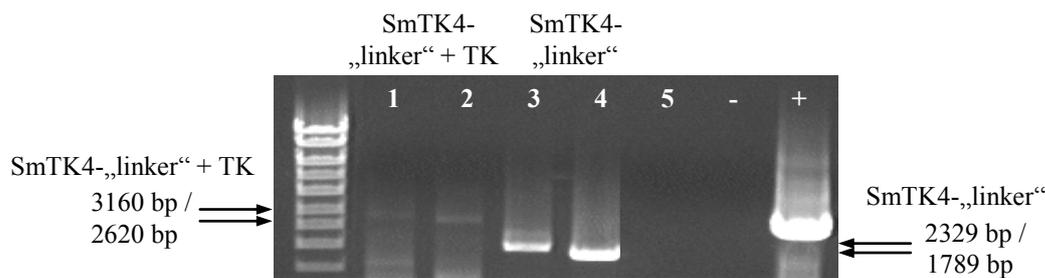
### 3.3.2 Überprüfung der Funktionalität der *bait*-Konstrukte TK4-bait1 und TK4-bait2

Für das Screening der *S. mansoni* Yeast Two-Hybrid Bank wurden die *bait*-Konstrukte TK4-bait1 pBridge bzw. TK4-bait2 pBridge separat in AH109 Hefezellen transformiert. Eine autonome Aktivierung der Reportergenexpression in den Hefen durch die *bait*-Proteine wurde auch in diesem Fall ausgeschlossen, da entsprechende Hefeklonen auch nach zehn Tagen Inkubation bei 30°C nicht zum Wachstum auf Selektionsplatten, denen Tryptophan, Adenin und Histidin fehlte, befähigt waren. In einem β-Galaktosidase-Filterassay konnte die autonome Expression des *LacZ*-Gens ebenfalls ausgeschlossen werden, da auch nach 24-stündiger Inkubation keine Blaufärbung detektiert werden konnte.

Der Nachweis der Expression der beiden *bait*-Proteine (TK4-bait1, TK4-bait2) in Hefen auf der Ebene der Transkription, erfolgte über RT-PCR-Analysen. Hierfür wurde

zunächst aus AH109-Hefeklonen, die mit den *bait*-Konstrukten TK4-bait1 pBridge bzw. TK4-bait2 pBridge transformiert waren, Total-RNA isoliert. Diese wurden als *templates* für RT-PCRs verwendet, bei denen zum einen gegen die „linker“-Region mit der TK-Domäne der SmTK4 (TK4-bait1-5’/-3’) bzw. nur gegen die „linker“-Region der SmTK4 gerichtet Primer (TK4-bait1-5’/bait2-3’) eingesetzt wurden. Durch die Verwendung des Primers GAL4-DNA-BD-5’ als 5’-Primer konnte zudem die Expression als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-BD überprüft werden. Die RT-Reaktionen erfolgten mit jeweils 90 ng der isolierten RNAs, dem jeweiligen 3’-Primer und der Reversen Transkriptase SensiScript (Qiagen). Ein Viertel der Reaktionen wurden als *templates* in die sich anschließenden PCRs eingesetzt.

Die durchgeführten RT-PCR-Analysen zeigten, dass beide *bait*-Konstrukte in den Hefen transkribiert wurden. In den Reaktionen wurden Amplifikationsprodukte der erwarteten Größen erhalten (Abbildung 3.10). Bei dem Nachweis der Transkription der „linker“-Region und der TK-Domäne der SmTK4 (TK4-bait1) wurde das erwartete Amplifikationsprodukt von 2620 bp erhalten (Abbildung 3.10; Spur 2), das in der RT-PCR mit dem GAL4-DNA-BD 5’-Primer eine erwartete Größe von 3160 bp besaß (Abbildung 3.10; Spur 1). Auch der Nachweis der Expression der „linker“-Region der SmTK4 (TK4-bait2) führte zu dem erwarteten Amplifikationsprodukt von 1789 bp bzw. 2329 bp mit Einbeziehung der GAL4-DNA-BD (Abbildung 3.10; Spuren 4, 3).



**Abbildung 3.10:** Nachweis der Expression der *bait*-Konstrukte auf transkriptioneller Ebene

Ergebnis der RT-PCR-Analysen zum Nachweis der Transkription der „linker“-Region + TK-Domäne (1, 2) bzw. nur der „linker“-Region (3, 4) von SmTK4 (nähere Erläuterungen siehe Text). Als *templates* dienen Total-RNAs aus Hefen, die mit TK4-bait1 pBridge (1 GAL4-DNA-BD-5’/TK4-bait1-3’, 2 TK4-bait1-5’/-3’) bzw. TK4-bait2 pBridge (3 GAL4-DNA-BD-5’/TK4-bait2-3’, 4 TK4-bait1-5’/bait2-3’) transformiert waren. Die RT-Negativ-Kontrolle ohne initiale cDNA-Synthese erfolgte mit Total-RNA, gemischt aus den jeweiligen Hefen (5). - : PCR-Negativ-Kontrolle ohne *template*. + : PCR-Positiv-Kontrolle mit TK4-bait1 pBridge als *template*. Je 12,5 µl der Ansätze wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die erwarteten PCR-Produkte besaßen eine Größe von 3,2 kb (1) / 2,6 kb (2) bzw. 2,3 kb (3) / 1,8 kb (4). Größenstandard: HyperLadderI (Bioline).

### 3.3.3 Yeast Three-Hybrid Screening mit den *bait*-Konstrukten TK4-bait1 und TK4-bait2

Nachdem überprüft worden war, dass die beiden *bait*-Konstrukte TK4-bait1 pBridge und TK4-bait2 pBridge (Selektionsmarker *TRP1*) in Hefen transkribiert werden und eine Reportergenexpression nicht autonom induzieren, wurden sie für das Screening der *S. mansoni* Yeast Two-Hybrid Bank verwendet. Dazu wurden sie zunächst in den Hefestamm Y187 (Paarungstyp Mat  $\alpha$ ) transformiert (Reportergene *HIS3*, *LacZ*). Erhaltene Klone wurden für das Mating mit dem Hefestamm AH109 (Paarungstyp Mat a) verwendet, der die *prey*-Plasmide (*S. mansoni* cDNA-Bank in pGADT/-Rec; Selektionsmarker *LEU2*) trägt.

#### 3.3.3.1 Mating mit der *S. mansoni* Yeast Two-Hybrid Bank

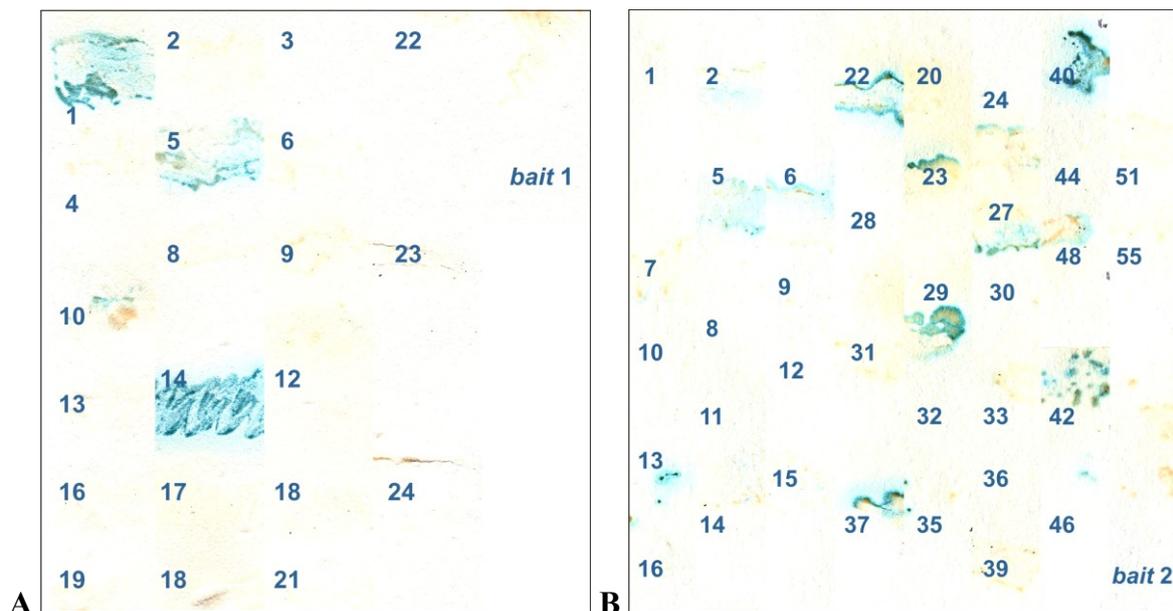
Für das Mating wurde eine 5 ml - Kultur des *bait*-Plasmid-tragenden Klones mit einem 1 ml - Aliquot der *S. mansoni* Yeast Two-Hybrid Bank über Nacht inkubiert. Durch das Mating der beiden Stämme unterschiedlichen Paarungstyps entstanden diploide Hefezellen, die sowohl *bait*- als auch *prey*-Plasmide enthielten. Diese wurden zur Überprüfung der Reportergenexpression auf Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (SD-Trp/-Leu/-His) ausgestrichen. Auf Grund der Auxotrophie der verwendeten Hefen für essentielle Aminosäuren konnten nur Hefezellen wachsen, die sowohl *bait*- als auch *prey*-Plasmide (*TRP1*, *LEU2*) enthielten, und bei denen es durch die Interaktion der beiden Proteine zur Expression des *HIS3*-Reportergens im Hefegenom gekommen war.

Das Mating wurde in zwei getrennten Experimenten mit dem TK4-bait1 („linker“-Region und TK-Domäne) und dem TK4-bait2 (ausschließlich „linker“-Region) durchgeführt. Die Auswertung der Einzelselektionsplatten ergab bei Verwendung des TK4-bait1 eine Mating-Effizienz von 2,06% und für das Screening mit dem TK4-bait2 von 14,67%, was die im Protokoll geforderten  $\geq 2\%$  erfüllte.

Auf den SD-Trp/-Leu/-His Selektionsplatten waren nach 10 Tagen Inkubation bei 30°C im Screening mit dem TK4-bait1 24 Klone und im Screening mit dem TK4-bait2 55 Klone gewachsen. Diese wurden nummeriert und für eine weitere Überprüfung auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade Selektionsplatten umgestrichen. Von den 24 Klonen aus dem Screening mit dem TK4-bait1 waren nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C noch 20 Klone und von den 55 Klonen aus dem Screening mit dem TK4-bait2 noch 36 Klone zum Wachstum auf den Selektionsplatten befähigt.

### 3.3.3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Kolonie-Filterassay

Mit den selektionierten Klonen wurde im Anschluss ein  $\beta$ -Galaktosidase-Kolonie-Filterassay durchgeführt, über den die Expression des *LacZ*-Gens überprüft wurde, die als eindeutigster Hinweis auf eine positive Interaktion eines *prey*- mit einem *bait*-Protein dient. Der Assay wurde mit Kolonien der Hefeklone durchgeführt, die ein positives Wachstum auf den Selektionsplatten zeigten. Als Negativ-Kontrolle dienten Kolonien des Stammes Y187, die mit TK4-bait1 bzw. TK4-bait2 pBridge transformiert waren (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11** :  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassays mit den Klonen aus den TK4-bait1/-bait2-Screenings

Ergebnis der  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassays mit X-Gal als Substrat zur Überprüfung der Protein-Protein-Interaktionen [A: Screening TK4-bait1, B: Screening TK4-bait2]. Als Negativ-Kontrollen dienten Hefen des Stammes Y187, die ausschließlich mit dem *bait*-Konstrukt TK4-bait1 bzw. TK4-bait2 transformiert waren (*bait* 1, 2). Hefeklone, bei denen durch eine Interaktion zwischen dem *bait*-Protein mit einem *prey*-Protein das *LacZ*-Reportergen und somit die  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert wurde, zeigten eine deutliche Blaufärbung der Kolonien (5 - 20 Stunden Inkubation bei 30 °C). Die Nummern repräsentieren die Hefe-Klonnummern.

Nach 5 - 20 Stunden Inkubation der Filter bei 30°C zeigten die Kolonien der Negativ-Kontrolle (Y187, transformiert mit TK4-bait1 bzw. TK4-bait2 pBridge) keine Färbung. Die erhaltenen Blaufärbungen bei den übrigen Hefeklonen wurden daher als spezifisch für die Interaktion von einem *prey*- mit dem *bait*-Protein eingestuft (Abbildung 3.11). Nach der Inkubation wiesen 4 der 20 Klone aus dem Screening mit dem TK4-bait1 und 16 der 36 Klone aus dem Screening mit dem TK4-bait2 eine deutliche Farbreaktion auf (siehe Tabelle 3.4). Diese Klone wurden als positiv eingestuft und weiter analysiert.

**Tabelle 3.4:** Übersicht über die Klone aus dem sukzessiven Screening mit TK4-bait 1 / TK4-bait 2

	SD-Trp/-Leu/-His Selektionsplatten	SD-Trp/-Leu/-His/-Ade Selektionsplatten	$\beta$ -Galaktosidase-Filterassay
<b>Screening TK4-bait 1</b>	24 Klone	20 Klone	4 Klone: 1, 5, 10, 14
<b>Screening TK4-bait 2</b>	55 Klone	36 Klone	16 Klone: 2, 5, 6, 13, 20, 22, 23, 24, 27, 29, 37, 40, 42, 44, 46, 48

### 3.3.3.3 Identifizierung der putativen *downstream*-Bindungspartner von SmTK4

Aus den im  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay positiv getesteten Hefeklonen wurde die Gesamtplasmid-DNA isoliert, in eine Transformation von *E. coli* - Zellen eingesetzt und diese auf LB<sup>Amp</sup>-Platten selektioniert. Gewachsene Bakterien-Kolonien wurden über eine Kolonie-PCR mit dem *prey*-spezifischen Primerpaar pGADT7-5’/-3’ auf das Vorhandensein von *prey*-Plasmiden überprüft und aus PCR-positiven Bakterien-Klonen die Plasmid-DNA isoliert.

Die Bestimmung der Insertgröße in den isolierten *prey*-Plasmiden erfolgte über eine PCR mit dem Primerpaar pGADT7-5’/-3’ oder über einen Restriktionsverdau der Plasmide mit *EcoRI* und *XhoI*.

Zur Identifizierung der für die interagierenden Proteine kodierenden Sequenzen, wurden die *prey*-Plasmide mit dem Primer pGADT7-5’ sequenziert (Sequenzen der einzelnen Klone sind im Anhang 5.2 wiedergegeben). Die ermittelten Insertsequenzen wurden anschließend mit den *S. mansoni* Genom- und Transkriptomdaten ([www.sagner.ac.uk](http://www.sagner.ac.uk), [www.tigr.org](http://www.tigr.org)) verglichen und homologe Proteine mit Hilfe des Programms BlastX (Altschul et al., 1997) identifiziert. Die erhaltenen Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabellen 3.5 und 3.6).

**Tabelle 3.5:** Ergebnisse der Identifizierung der putativen Bindungspartner von SmTK4 (*downstream*) TK4-bait1: „linker“-Region und TK-Domäne von SmTK4

Gruppe	Klon Nr.	Insertgröße (bp)	Sequenzierter Bereich (bp)	Homologie
1	1	1000	967	Hitzeschock-Protein; p40 aus <i>S. mansoni</i>
	5	1200	1139	
	14	1300	1247	
2	10	2500	1149	Mucin

**Tabelle 3.6:** Ergebnisse der Identifizierung der putativen Bindungspartner von SmTK4 (*downstream*) TK4-bait 2: „linker“-Region von SmTK4  
\*: bekannt als falsch-positive Bindungspartner im Yeast Two-Hybrid System

Gruppe	Klon Nr.	Insertgröße (bp)	Sequenzierter Bereich (bp)	Homologie
1	6	1700	1224	Hitzeschock-Protein; p40 aus <i>S. mansoni</i>
	23	1200	1141	
	29	1700	1217	
	37	900	1238	
	40	1200	1164	
2	2	1500	1230	GlcNAc-Transferase
	5	1500	1094	Alkoholdehydrogenase*
	20	1200	1217	Zinkfinger-Protein*
	24	800	1197	Eischal-Vorläuferprotein p48 aus <i>S. mansoni</i>
	42	1500	1210	Cytochrom C1*
	46	2500	1226	Pol Polyprotein aus <i>S. mansoni</i>
4	22	1200	166	keine signifikante Homologie
	44	2000	768	keine signifikante Homologie
5	13			Isolierung der <i>prey</i> -Plasmide nicht erfolgreich
	27			
	48			

Ein Teil der identifizierten Proteine wurden als falsch-positive Bindungspartner eingestuft, da sie in Yeast Two-Hybrid Screenings häufig unspezifisch an verschiedene *bait*-Proteine binden (in Tabelle 3.6 mit einem Stern markiert; [www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html](http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html)).

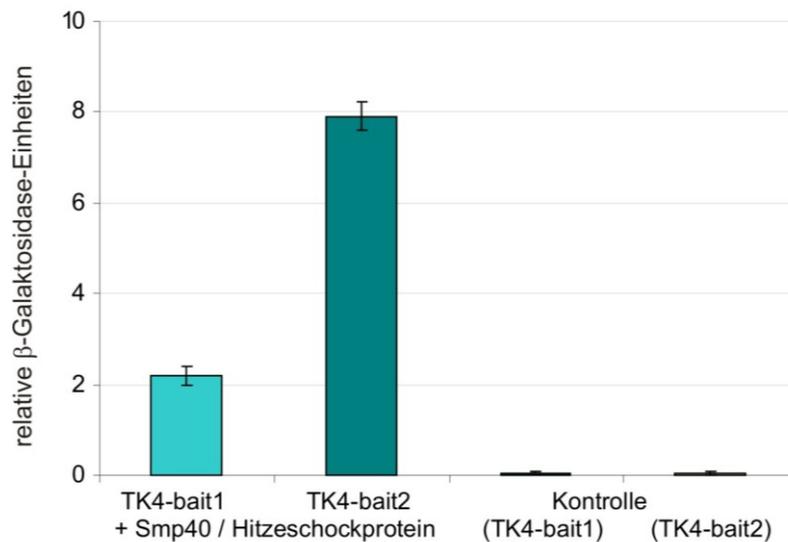
### 3.3.3.4 Verifizierung der Interaktion

Zur Verifizierung der Interaktion und zum Ausschluss falsch-positiver Klone wurden die isolierten *prey*-Plasmide zusammen mit dem jeweiligen *bait*-Plasmid in Hefezellen des Stammes AH109 co-transformiert und die Interaktion der von den Plasmiden kodierten Proteine über Wachstumsselektion (SD-Trp/-Leu/-Ade/-His) überprüft. Durch das Wachstum aller Doppeltransformanden innerhalb von 5 Tagen wurde die Interaktion verifiziert.

### 3.3.3.5 Quantifizierung der Interaktion

Zur Untersuchung der Interaktionsstärken wurden  $\beta$ -Galaktosidase-Assays in Flüssigkultur mit ONPG als Substrat durchgeführt. Hierfür wurde exemplarisch ein Klon des am häufigsten in den Screenings aufgetretenen, potentiellen SmTK4-Interaktionspartners mit Homologie zu Smp40 und Hitzeschock-Proteinen ausgewählt. Die weiteren Klone wurden

aufgrund ihrer Heterogenität und ihrer Einschätzung als falsch-positive Bindungspartner (vgl. 3.3.3.4) vernachlässigt. Als Negativ-Kontrolle dienten Hefen (Stamm AH109), die mit TK4-bait1 bzw. TK4-bait2 pBridge transformiert waren (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12:**  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Protein-Protein-Interaktionsstärken

Dargestellt sind die Bindungsstärken zwischen der „linker“-Region und TK-Domäne (TK4-bait1) und ausschließlich der „linker“-Region (TK4-bait2) von SmTK4 mit dem potentiellen *downstream*-Interaktionspartner mit Homologie zu Smp40 und Hitzeschock-Proteinen (n = 6). Hefen (Stamm AH109), die mit dem TK4-bait1 bzw. TK4-bait2 pBridge transformiert waren, dienten als Negativ-Kontrolle.

Der durchgeführte Assay zeigte, dass die Interaktion von SmTK4 mit dem Protein, das Homologie zu Smp40 und Hitzeschock-Proteinen aufweist, stärker ist, wenn nur die „linker“-Region der SmTK4 als *bait*-Protein exprimiert wird (TK4-bait2). Die Expression der „linker“-Region zusammen mit der TK-Domäne der SmTK4 (TK4-bait1) führte zu einer Reduktion der Interaktion um den Faktor 4 (Abbildung 3.12).

### 3.4 Interaktion von SmTK4 mit SmTK3 bzw. SmTK6

In dem Yeast Two-Hybrid Screening mit der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 als *bait*-Protein wurden die Src-Kinasen SmTK6 und SmTK3 als Interaktionspartner identifiziert (Beckmann, 2005). Daraus war zu schließen, dass SmTK4 über die beiden SH2-Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste in diesen Src-Kinasen binden kann. Ebenfalls ist es bekannt, dass Src-Kinasen über ihre SH2-Domänen an Phosphotyrosine innerhalb der „linker“-Region einer Syk-Kinase binden können (Geahlen, 2007). Um dies für die Kinasen SmTK4, SmTK3 und SmTK6 zu überprüfen, wurden direkte Interaktionsstudien im Yeast Two-Hybrid System durchgeführt.

Die kodierenden Sequenzen für die SH2-Domänen der Src-Kinasen SmTK3 und SmTK6 wurden über PCRs mit den Primerpaaren TK3-SH2-pACT2-5'/-3' bzw. TK6-SH2-pACT2-5'/-3' und Vollängenklonen beider Moleküle als *templates* amplifiziert. Die erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden in den Klonierungsvektor pDrive kloniert, und dann gerichtet über *Bam*HI und *Xho*I *in frame* in die MCS des GAL4-AD-Vektors pACT2 umklontiert. Die erhaltenen Konstrukte (TK3-SH2 pACT2, TK6-SH2 pACT2) wurden mit TK4-bait1 („linker“-Region und TK-Domäne der SmTK4, pBridge), TK4-bait2 („linker“-Region der SmTK4, pBridge) oder TK4-bait3 (TK-Domäne der SmTK4, pBridge) in Hefen co-transformiert. Erhaltene Hefeklone wurden zur Überprüfung der *HIS3*-Reporterexpression auf SD-Trp/-Leu/-His-Selektionsplatten ausgestrichen. Über einen Inkubationszeitraum von 10 Tagen bei 30°C zeigten alle Klone ein nur sehr schwaches Wachstum. Wurden diese Hefeklone auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade-Selektionsplatten umgestrichen und damit der Selektionsdruck durch das *ADE2*-Reporter gen erhöht, konnte kein nennenswertes Wachstum der Klone beobachtet werden. In einem durchgeführten  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay konnten dementsprechend keine signifikanten Bindungsstärken ermittelt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

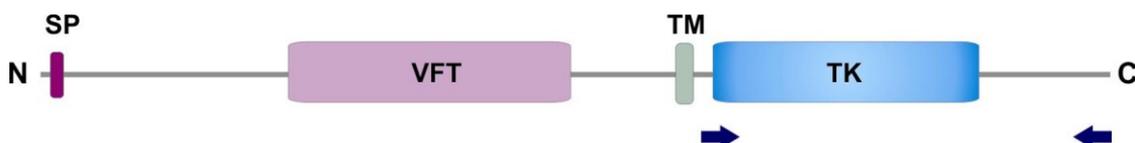
Während also die Syk-Kinase SmTK4 über ihre Tandem-SH2-Domäne an die Src-Kinasen SmTK3 und SmTK6 binden kann (Beckmann, 2005), vermögen SmTK3 und SmTK6 jedoch nicht über ihre SH2-Domänen an SmTK4 zu binden. Die Interaktion zwischen SmTK4 und SmTK3 bzw. SmTK6 verläuft daher vermutlich unidirektional über die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4. SmTK6 kann jedoch über seine SH2-Domäne mit SmTK3 interagieren (vgl. 3.2.3.5).

### 3.5 Interaktion von SmRTK1 mit SmTK4, SmTK3 bzw. SmTK6

In den vorhergegangenen Yeast Two-Hybrid Screenings mit der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 oder der SH2-Domäne von SmTK6 konnten keine Rezeptoren als *upstream* - Interaktionspartner identifiziert werden. Gründe hierfür können Limitationen des Systems sowie nicht-isolierte *prey*-Plasmide sein. Um dennoch eine putative Interaktion von SmTK4 mit einem Rezeptor untersuchen zu können, wurden Interaktionen mit bereits bekannten Rezeptor-Molekülen direkt im Hefe-System getestet.

Ein erstes Rezeptormolekül, das als potentieller Interaktionspartner von SmTK4 in Frage kam, war die Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1. Bei diesem Molekül handelt es sich um eine membrandurchspannende Rezeptor-Tyrosinkinase aus *S. mansoni*, deren extrazelluläre Domäne ein *Venus Flytrap*-Motiv (VFT) trägt und deren intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne Homologie zu der katalytischen Domäne des Insulin-Rezeptors aufweist (Abbildung 3.13) (Vicogne et al., 2003). Da Syk-Kinasen mit dem intrazellulären Bereich von Rezeptor-Tyrosinkinasen interagieren können (Geahlen, 2007), ist eine Interaktion beider Moleküle denkbar, zumal Immunolokalisationen gezeigt hatten, dass SmRTK1, wie auch SmTK4, im Ovar des Schistosomen-Weibchens exprimiert wird (Knobloch et al., 2002b; Vicogne et al., 2003).

Für die Yeast Two-Hybrid Analysen wurden ein Plasmid mit der kodierenden Sequenz des intrazellulären Bereiches der SmRTK1 sowie ein Plasmid mit der Vollängensequenz dieses Rezeptors von Dr. Colette Dissous (Institute Pasteur, Lille) zur Verfügung gestellt. Auf der Grundlage dieser Plasmide wurde der intrazelluläre Bereich von SmRTK1 (1788 bp) über eine PCR mit dem Primerpaar RTK1-pACT2-5' (*Bam*HI) / -3' (*Xho*I) amplifiziert. Die Primer enthielten die für die Klonierung in pACT2 benötigten Restriktionsschnittstellen.



**Abbildung 3.13:** Schematische Darstellung der Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1

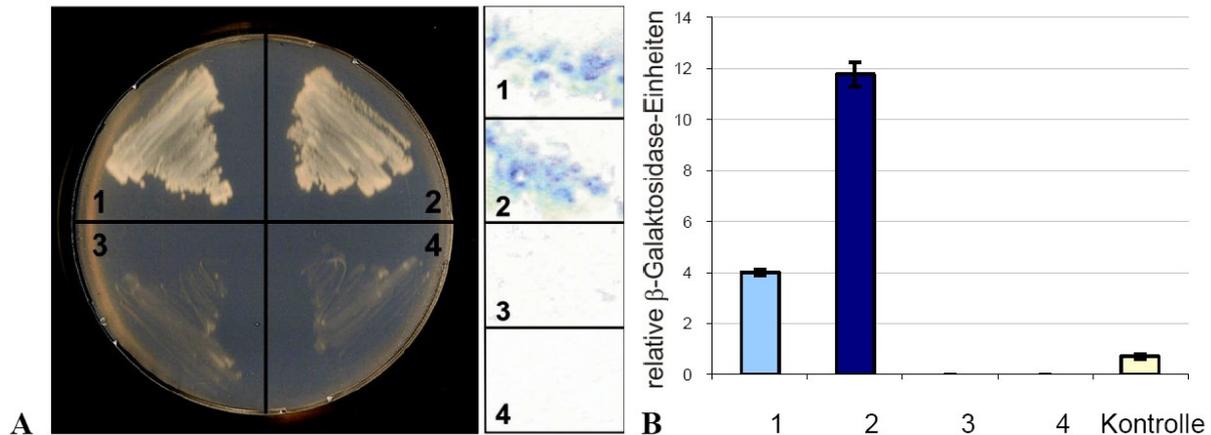
Dargestellt ist die Domänenstruktur von SmRTK1 (1559 AS, Accession number: AF101194; Vicogne et al., 2003). SP: Signalpeptid (AS 1 - 23), TK: Tyrosinkinase-Domäne (AS 996 - 1269), TM: Transmembrandomäne (AS 942 - 964), VFT: *Venus Flytrap* - Motiv (AS 400 - 796). Die Pfeile markieren den Bereich der Aminosäuren 963 - 1559, mit dem die Interaktionsanalysen durchgeführt wurden.

Die Klonierung in den GAL4-Aktivierungsdomänen-Vektor pACT2 erfolgte gerichtet über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I, so dass ausgehend von diesem Konstrukt (SmRTK1-C-Term pACT2) ein Fusionsprotein aus der GAL4-AD und dem intrazellulären Bereich der SmRTK1 in Hefen exprimiert werden konnte.

Als GAL4-Bindedomänen-Vektoren wurden vier verschiedene Konstrukte verwendet. Zum einen das Konstrukt TK4-SH2SH2 pBridge, welches die kodierende Sequenz für die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 als Fusionsprotein mit der GAL4-BD in Hefen exprimiert, und zum anderen das Konstrukt TK4-SH2SH2 + TK3-TK pBridge, das zusätzlich noch die Tyrosinkinase-Domäne der Src-Kinase SmTK3 exprimiert. Hierdurch konnte die Phosphorylierungs-Abhängigkeit der möglichen Interaktion untersucht werden. Des Weiteren wurden die Konstrukte TK4-SH2(1) + TK3-TK pBridge und TK4-SH(2) + TK3-TK pBridge verwendet, die jeweils nur eine singuläre SH2-Domäne der SmTK4 sowie die TK-Domäne der SmTK3 exprimieren, um so die Spezifität der Interaktion zu überprüfen.

Zellen des Hefestammes AH109 wurden mit den folgenden Vektor-Kombinationen transformiert und auf SD-Trp/-Leu-Platten selektioniert: RTK1-C-Terminus pACT2 zusammen mit TK4-SH2SH2 pBridge (1), TK4-SH2SH2 + TK3-TK pBridge (2), TK4-SH2(1) + TK3-TK pBridge (3) bzw. TK4-SH2(2) + TK3-TK pBridge (4). Erhaltene Klone wurden zur Selektion der Interaktion auf SD-Trp/-Leu/-Ade/-His-Platten umgestrichen. Über einen Inkubationszeitraum von 5 Tagen bei 30°C zeigten nur die Klone 1 und 2, welche beide die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 als GAL4-BD-Fusionprotein exprimierten, ein starkes Wachstum. Die Klone 3 und 4, die nur eine singuläre SH2-Domäne exprimierten, zeigten hingegen kein deutliches Wachstum (Abbildung 3.14 A). Mit den erhaltenen Klonen wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay durchgeführt, um die Interaktion zwischen SmTK4 und SmRTK1 nicht nur über die Expression der Wachstumsmarker *ADE2* und *HIS3*, sondern auch über die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase (*LacZ*) colorimetrisch überprüfen zu können. Die Farbumsetzung durch die  $\beta$ -Galaktosidase war nur für die Klone 1 und 2 detektierbar und bestätigte somit das beobachtete Wachstumsverhalten der Klone (Abbildung 3.14 A).

Zur Quantifizierung der Interaktionen wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay durchgeführt (Abbildung 3.14 B). Hierbei zeigte sich, dass keine Interaktion der singulären SH2-Domänen von SmTK4 mit dem intrazellulären Bereich von SmRTK1 detektierbar war (3, 4). Dagegen war eine Interaktion zwischen den Tandem-SH2-Domänen von SmTK4 und dem intrazellulären Bereich von SmRTK1 eindeutig nachweisbar, wobei die Bindungsstärke um den Faktor 3 durch eine zusätzliche Phosphorylierung positiv beeinflusst wurde (1, 2).

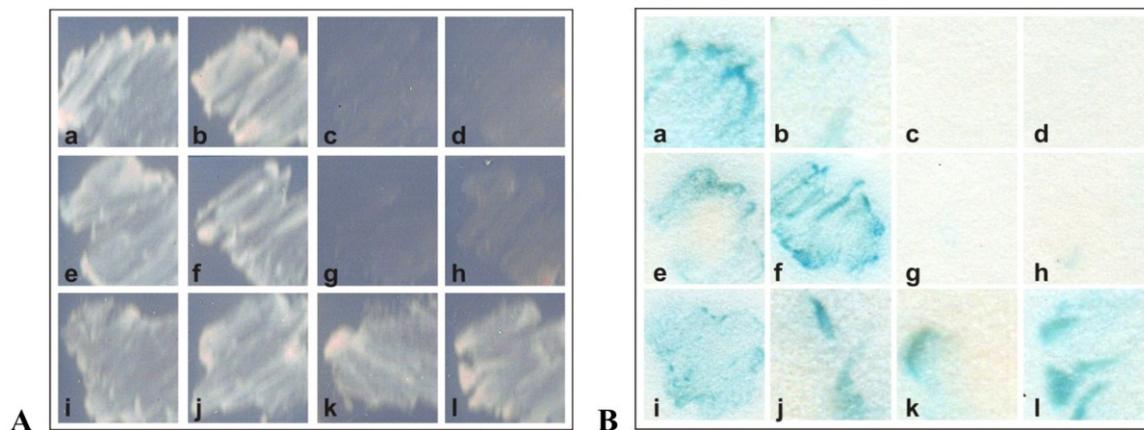


**Abbildung 3.14:** Yeast Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen SmTK4 und SmRTK1

**A:** SD-Trp/-Leu/-His/-Ade-Selektionsplatten nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C und  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay. **B:** Quantifizierung der Bindungsstärken über einen  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay (n = 6). Die untersuchten Hefen (Stamm AH109) waren co-transformiert mit RTK1-C-Terminus pACT2 und **1:** TK4-SH2SH2 pBridge, **2:** TK4-SH2SH2 + TK3-TK pBridge, **3:** TK4-SH2(1) + TK3-TK pBridge, **4:** TK4-SH2(2) + TK3-TK pBridge. Als Kontrolle dienten nicht-transformierte Hefen (Stamm AH109).

Neben der Syk-Kinase SmTK4 werden auch die Src-Kinasen SmTK3 und SmTK6 im Ovar des Schistosomen-Weibchens exprimiert (Kapp et al., 2004; Beckmann, 2005). Da auch Src-Kinasen über ihre SH3/SH2-Domänen mit den intrazellulären Domänen von RTKs interagieren können, sind SmTK3 und SmTK6 ebenfalls potentielle Bindungspartner von SmRTK1. Zur Überprüfung möglicher Interaktionen wurden Hefen des Stammes AH109 mit den folgenden Vektor-Kombinationen transformiert und auf SD-Trp/-Leu-Platten selektioniert: RTK1-C-Terminus pACT2 zusammen mit TK6-SH2 pBridge (e), TK6-SH2 + TK3-TK pBridge (f), TK3-SH2 pBridge (g), TK3-SH2 + TK3-TK pBridge (h), TK6-SH3SH2 pBridge (i), TK6-SH3SH2 + TK3-TK pBridge (j), TK3-SH3SH2 pBridge (k) und TK3-SH3SH2 + TK3-TK pBridge (l). Erhaltene Klone wurden zur Selektion möglicher Interaktionen auf SD-Trp/-Leu/-Ade/-His-Platten umgestrichen. Zur einheitlichen Beurteilung wurden zusätzlich die zuvor analysierten Hefeklone, transformiert mit den Vektor-Kombinationen RTK1-C-Terminus pACT2 und TK4-SH2SH2 pBridge (a), TK4-SH2SH2 + TK3-TK pBridge (b), TK4-SH2(1) + TK3-TK pBridge (c) bzw. TK4-SH2(2) + TK3-TK pBridge (d) nochmals ausgestrichen (Abbildung 3.15 A). Nach 5 Tagen Inkubation der Selektionsplatten bei 30°C zeigten die Klone, welche die Tandem-SH2-Domäne der SmTK4 als GAL4-BD-Fusionprotein exprimierten (a, b) unabhängig von der Phosphorylierung Wachstum auf den Selektionsplatten und bestätigten damit die vorausgegangenen Analysen (vgl. Abbildung 3.14). Dagegen war für die Klone, die jeweils nur eine singuläre

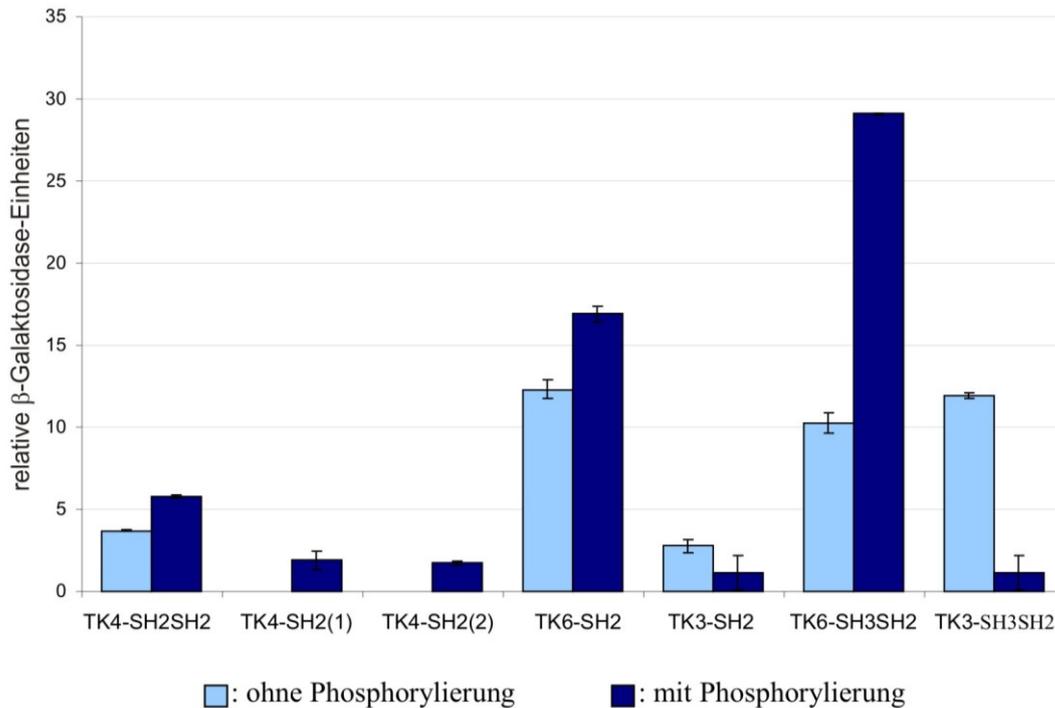
SH2-Domäne exprimierten, erneut kein deutliches Wachstum detektierbar (c, d). Klone, welche die SH2-Domäne von SmTK6 exprimierten, waren unabhängig vom Phosphorylierungsstatus zum Wachstum auf den Selektionsplatten befähigt (e, f). Hingegen zeigten Klone, die für die SH2-Domäne von SmTK3 kodierten, nur ein sehr schwaches Wachstum (g, h). SmRTK1 kann somit mit der SH2-Domäne von SmTK6 und schwach auch mit der von SmTK3 interagieren. Die Klone, welche die SH3SH2-Domänen von SmTK6 bzw. SmTK3 exprimierten, waren sowohl mit als auch ohne Phosphorylierung zum Wachstum und damit zur Interaktion mit SmRTK1 befähigt (i, j bzw. k, l). Mit den erhaltenen Klonen wurde zur Überprüfung der Expression der  $\beta$ -Galaktosidase (*LacZ*) bedingt durch die Interaktion der jeweiligen GAL4-BD- und GAL4-AD-Proteine ein  $\beta$ -Galaktosidase-Kolonie-Filterassay durchgeführt (Abbildung 3.15 B). Über diesen Assay konnten die Interaktionen der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4, der SH2-Domäne von SmTK6 sowie der SH3SH2-Domänen von SmTK6 und SmTK3 mit dem C-Terminus von SmRTK1 qualitativ verifiziert werden.



**Abbildung 3.15:** Yeast Two-Hybrid Analysen zur Interaktion von SmTK4, SmTK6 bzw. SmTK3 mit SmRTK1

**A:** SD-Trp/-Leu/-His/-Ade-Selektionsplatten nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C.  
**B:**  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay mit den Hefeklonen aus A. Die untersuchten Hefeklone (Stamm AH109) waren co-transformiert mit RTK1-C-Terminus pACT2 und **a:** TK4-SH2SH2 pBridge, **b:** TK4-SH2SH2 + TK3-TK pBridge, **c:** TK4-SH2(1) + TK3-TK pBridge, **d:** TK4-SH2(2) + TK3-TK pBridge, **e:** TK6-SH2 pBridge, **f:** TK6-SH2 + TK3-TK pBridge, **g:** TK3-SH2 pBridge, **h:** TK3-SH2 + TK3-TK pBridge, **i:** TK6-SH3SH2 pBridge, **j:** TK6-SH3SH2 + TK3-TK pBridge, **k:** TK3-SH2 pBridge, **l:** TK3-SH3SH2 + TK3-TK pBridge.

Die Quantifizierung der Interaktionsstärken zwischen SmRTK1 und den Protein-Interaktionsdomänen von SmTK4, SmTK6 bzw. SmTK3 erfolgte über  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassays mit ONPG als Substrat (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16:**  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Interaktionsstärken von SmTK4, SmTK6 und SmTK3 mit SmRTK1

Dargestellt sind die Bindungsstärken zwischen SmTK4, SmTK6 bzw. SmTK3 und SmRTK1 in Abhängigkeit von einer Phosphorylierung (n = 9; nähere Erläuterungen siehe Text).

Die durchgeführten Flüssigassays bestätigten die Interaktionen der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4, der SH2-Domäne von SmTK6 sowie der SH3SH2-Domänen von SmTK6 und SmTK3 mit dem intrazellulären Bereich der SmRTK1. Die Interaktion zwischen der SH2-Domäne von SmTK6 und SmRTK1 war dabei deutlich stärker als die Interaktion der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 mit SmRTK1, wobei die Bindungsstärken durch zusätzliche Phosphorylierungen über die Expression der TK-Domäne von SmTK3 positiv beeinflusst wurden (Abbildung 3.16). Die Interaktion zwischen dem C-Terminus von SmRTK1 und der SmTK6-SH2-Domäne wurde nochmals verstärkt, wenn diese kombiniert mit der SH3-Domäne exprimiert wurde (SmTK6-SH3SH2). Auch diese Interaktion war deutlich stärker unter zusätzlicher Phosphorylierung (Abbildung 3.16). Die Interaktion zwischen der SmTK3-SH2-Domäne und SmRTK1 war sehr schwach (vergleichbar mit der Interaktion mit singulären SH2-Domänen von SmTK4) und im Gegensatz zu den übrigen gemessenen Interaktionen bei zusätzlicher Phosphorylierung geringfügig schwächer (Abbildung 3.16). Bei SmTK3 wirkte sich die Expression der SH2-Domäne in Kombination mit der SH3-Domäne (SmTK3-SH3SH2) ebenfalls verstärkend auf die Interaktion mit dem C-Terminus von SmRTK1 aus, wobei diese wiederum negativ mit einer zusätzlichen Phosphorylierung korrelierte (Abbildung 3.16).

## 3.6 Integrin-Rezeptoren in *S. mansoni*

### 3.6.1 $\beta$ -Integrin-Rezeptoren in *S. mansoni*

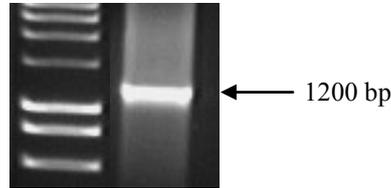
In der Literatur sind Interaktionen zwischen Syk-Tyrosinkinasen und  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren beschrieben (Woodside et al., 2001). Bekannt ist, dass Syk-Kinasen über ihre SH2-Domänen an den intrazellulären Teil von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren binden können und damit Signale des Rezeptors weiterleiten. Integrine spielen u.a. eine Rolle in der Reproduktionsbiologie, zum Beispiel bei der Spermatogenese (Shinohara et al., 1999) oder als Spermien-Rezeptoren in Oocyten (Linfor & Berger, 2000). Würden Integrin-Homologe in Schistosomen vorkommen und in den Reproduktionsorganen adulter Tiere exprimiert werden, wäre eine Interaktion mit SmTK4 vorstellbar. Da keine Integrin-Rezeptoren in *S. mansoni* bis dato bekannt waren, wurde nach Homologen gesucht und diese kloniert. Eine potentielle Interaktion mit SmTK4 wurde anschließend im Yeast Two-Hybrid System untersucht.

#### 3.6.1.1 Identifizierung und Klonierung eines $\beta$ -Integrin1-Rezeptors

Die bislang bekannten *S. mansoni* - Sequenzen aus den Genom-Datenbanken von Sanger & TIGR ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk), [www.tigr.org](http://www.tigr.org)) wurden nach Homologen von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren durchsucht. Die cDNA-Sequenz eines  $\beta$ -Integrin-Rezeptors aus einem anderen Organismus (zum Beispiel aus *Mus musculus*; verfügbar über NCBI) wurde für einen *S. mansoni* - Omniblast ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)) verwendet. Über diesen konnten mehrere genomische Sequenzen aus *S. mansoni* ermittelt werden, die unterschiedlich hohe Übereinstimmungen mit der für die Blast-Suche verwendeten  $\beta$ -Integrin-Rezeptor-Sequenz aufwiesen. Unter diesen Sequenzen waren zwei, die hohe Homologie zum dem 5'- (333748.c005110024.Contig1) bzw. 3'-Bereich (333748. c003607130.Contig2) eines  $\beta$ -Integrin-Rezeptors zeigten. *In silico* wurde mit Hilfe des Programms GENSCAN ([genes.mit.edu/GENSCAN.html](http://genes.mit.edu/GENSCAN.html)) aus der genomischen Sequenz dieser Klone die kodierende cDNA-Sequenz ermittelt. Beide Teilsequenzen (1857 bp, 648 bp) überlappten jedoch nicht, so dass ein Teil der vollständigen kodierenden Sequenz für den  $\beta$ -Integrin1-Rezeptors aus *S. mansoni* (Sm $\beta$ -Int1) *in silico* nicht ermittelt werden konnte.

Der noch fehlende cDNA-Bereich wurde daher über eine RT-PCR amplifiziert. In die RT-Reaktion mit der SuperScriptII (Invitrogen) wurden 2  $\mu$ g Total-RNA aus *S. mansoni* eingesetzt und mit dem Primer  $\beta$ -Integrin1-C-Terminus-3' revers transkribiert. Ein Viertel des RT-Ansatzes diente als *template* für die sich anschließende PCR mit dem Primerpaar

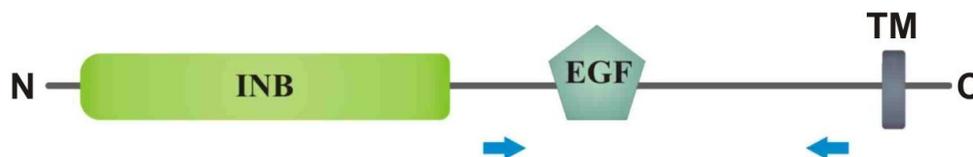
$\beta$ -Integrin1-5'/-C-Terminus-3'. Das erhaltene Amplifikationsprodukt von etwa 1200 bp (Abbildung 3.17) wurde in den Klonierungsvektor pDrive kloniert und sequenziert.



**Abbildung 3.17:** RT-PCR zur Amplifizierung des fehlendes Bereichs von Sm $\beta$ -Int1

Der fehlende cDNA-Bereich von Sm $\beta$ -Int1 wurde über eine RT-PCR mit dem Primerpaar  $\beta$ -Integrin1-5'/-C-Terminus-3' amplifiziert (nähere Erläuterungen siehe Text). 15  $\mu$ l der PCR-Reaktion wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Größenstandard: HyperLadderI (Bioline).

Die Analyse der Sequenz zeigte, dass das Amplifikat die noch fehlenden 93 bp von Sm $\beta$ -Int1 enthielt. Die Sequenzen wurden am Computer zusammengesetzt, und es ergab sich eine cDNA-Sequenz von 2598 bp, die für ein Protein von 865 Aminosäuren kodiert. Eine SMART-Analyse der Aminosäuresequenz ([smart.embl-heidelberg.de](http://smart.embl-heidelberg.de)) zur Identifizierung konservierter Domänen zeigte, dass Sm $\beta$ -Int1 die für  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren typische INB- und EGF-Domänen sowie eine Transmembrandomäne beinhaltet (Abbildung 3.18).

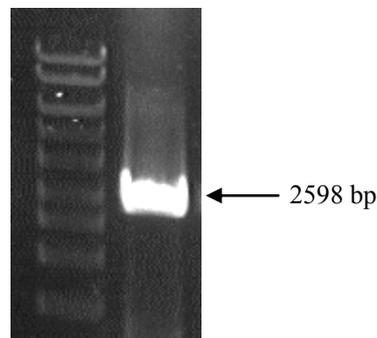


**Abbildung 3.18:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Sm $\beta$ -Int1

Sm $\beta$ -Int1 (865 AS) beinhaltet eine INB-Domäne (Integrin-beta-Untereinheit, N-terminaler Bereich der extrazellulären Region; AS 36 - 470), eine EGF-Domäne (*Epidermal growth factor*-ähnliche Domäne; AS 567 - 604) sowie eine Transmembrandomäne (AS 794 - 816). Die Pfeile markieren die relative Position der Primer  $\beta$ -Integrin1-5' und  $\beta$ -Integrin1-C-Terminus-3', die zur Amplifizierung des fehlendes cDNA-Bereiches eingesetzt wurden (vgl. Abbildung 3.17).

Die vollständige Sequenz von Sm $\beta$ -Int1 (Anhang 5.3) wurde über RT-PCR amplifiziert, um die *in silico* zusammengesetzte Sequenz bestätigen zu können. In die RT-Reaktion mit der SuperScriptIII (Invitrogen) wurden 1  $\mu$ g Total-RNA aus *S. mansoni* und der Primer  $\beta$ -Integrin1-C-Terminus-3' eingesetzt. Ein Viertel dieses Ansatzes diente als *template* für die sich anschließende PCR mit dem Primerpaar  $\beta$ -Integrin1-komplett-5'/-C-Terminus-3'.

Das Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe von 2598 bp (Abbildung 3.19) wurde in den Klonierungsvektor pDrive kloniert. Die anschließende Sequenzierung bestätigte die *in silico* ermittelte Sequenz von Sm $\beta$ -Int1.



**Abbildung 3.19:** RT-PCR zur Amplifizierung der Vollängen-cDNA-Sequenz von Sm $\beta$ -Int1

Die Vollängen-cDNA-Sequenz von Sm $\beta$ -Int1 wurde über RT-PCR mit dem Primerpaar  $\beta$ -Integrin1-komplett-5’/-C-Terminus-3’ amplifiziert (nähere Erläuterungen siehe Text). 12  $\mu$ l der PCR-Reaktion wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Das erwartete Amplifikationsprodukt besaß eine Größe von 2598 bp. Größenstandard: HyperLadderI (Bioline).

### 3.6.1.2 Genomische Struktur des Sm $\beta$ -Int1-Gens

Die Exon-Intron-Struktur des Sm $\beta$ -Int1-Gens wurde mit Hilfe der *S. mansoni* Genomdaten ermittelt. Mit kodierenden Bereichen wurden in den Datenbanken nach genomischen Klonen gesucht, die die Exons umfassen. Dabei wurde nur ein genomischer Klon gefunden (Contig: 0029035, 36.384 bp), welcher die komplette kodierende Sequenz von Sm $\beta$ -Int1, verteilt auf 9 Exons und 8 Introns mit über 15 kb umfasst (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur des Sm $\beta$ -Int1-Gens

Die kodierende Sequenz für Sm $\beta$ -Int1 ist im Genom von *S. mansoni* auf 9 Exons mit insgesamt 2.596 bp verteilt. Die gesamte genomische Sequenz einschließlich der Introns erstreckt sich auf 15.425 bp.

Die Größen der einzelnen Exons und Introns des Sm $\beta$ -Int1-Gens sind in der nachfolgenden in Tabelle 3.7 wiedergegeben.

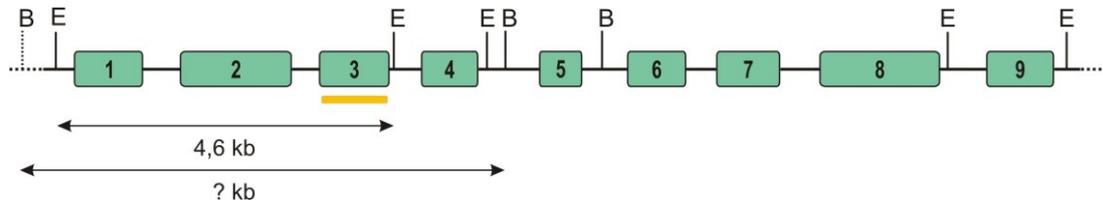
**Tabelle 3.7:** Exon- und Introngrößen des Sm $\beta$ -Int1-Gens

Exon	Exongröße [bp]	Intron	Introngröße [bp]
1	270	1	1.505
2	440	2	1.080
3	276	3	1.322
4	223	4	2.409
5	167	5	1.834
6	230	6	1.194
7	250	7	1.584
8	475	8	1.901
9	265		

### 3.6.1.3 Bestimmung der genomischen Kopienzahl des Sm $\beta$ -Int1-Gens

Aus der Analyse der Genomdaten von *S. mansoni* war zu vermuten, dass es sich bei dem Sm $\beta$ -Int1-Gen um ein *single copy* - Gen handelt, da nur ein genomischer Klon gefunden werden konnte, der die kodierende Sequenz des Rezeptors umfasst. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein Southern-Blot durchgeführt.

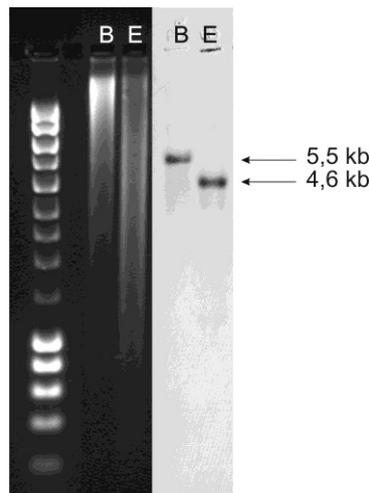
Für die Restriktion genomischer *S. mansoni*-DNA wurden die Enzyme *Bam*HI und *Eco*RV ausgewählt (beides Restriktionsenzyme des Typs II mit hexamerer Erkennungssequenz). Die Hybridisierungs-Sonde wurde so konzipiert, dass sie innerhalb des Exon 3 hybridisierte. Auf diese Weise sollte sich im Southern-Blot bei der mit *Eco*RV-restringierten DNA ein Fragment von 4,6 kb detektieren lassen (Abbildung 3.21). Über die Größe des Fragments der *Bam*HI-restringierten DNA lässt sich die Frage klären, ob es sich bei dem Sm $\beta$ -Int1-Gen um ein *single* oder *multi copy* - Gen handelt. Die Position der nächsten, 5'-wärts des ersten Exons gelegenen *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle ist abhängig von dem genomischen Kontext, in dem das Sm $\beta$ -Int1-Gen integriert ist. Handelt es sich bei dem Sm $\beta$ -Int1-Gen um ein *single copy* - Gen, führt eine Restriktion mit *Bam*HI zu einem einzelnen, definierten DNA-Fragment unbekannter Größe, wogegen bei mehreren Genkopien mit der Bildung von mindestens zwei DNA-Fragmenten unbestimmter Größe zu rechnen ist (Abbildung 3.21). Die Digoxigenin-markierte DNA-Sonde für die Hybridisierung wurde über eine PCR mit dem Primerpaar Southern- $\beta$ -Int-5'/-3', DIG-markierten dNTPs und genomischer *S. mansoni*-DNA als *template* amplifiziert.



**Abbildung 3.21:** Positionen der Restriktionsschnittstellen und der Sonde für den Southern-Blot zur Untersuchung der genomischen Kopienzahl des Smβ-Int1-Gens

Eingezeichnet sind die Positionen der relevanten Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme (B: *Bam*HI, E: *Eco*RV) sowie die Lage der Hybridisierungs-Sonde (gelb). Angegeben sind die Größen der erwarteten Fragmente in den jeweiligen Restriktionen.

Die restringierte genomische *S. mansoni*-DNA wurde auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Saugtransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Diese wurde mit der DIG-markierten DNA-Sonde (250 ng pro ml Hybridisierungslösung) hybridisiert und die gebundene Sonde über einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-DIG-Antikörper und die Umsetzung des Substrates NBT/BCIP nachgewiesen (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22:** Ergebnis des Southern-Blots zur Untersuchung der genomischen Kopienzahl des Smβ-Int1-Gens

Dargestellt ist links das Agarosegel mit genomischer *S. mansoni*-DNA, restringiert mit **B**: *Bam*HI und **E**: *Eco*RV (Größenstandard: HyperLadderI, Bioline). Rechts dargestellt ist das Ergebnis des Southern-Blots nach Hybridisierung mit der Smβ-Int1-spezifischen DNA-Sonde.

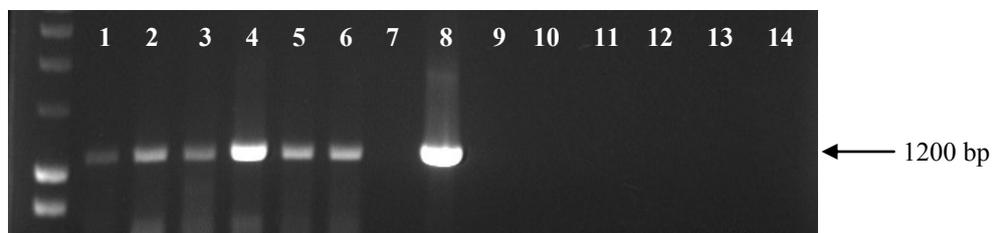
Die gegen das Exon 3 des Smβ-Int1-Gens gerichtete Hybridisierungssonde detektierte im Southern-Blot bei der *Eco*RV-restringierten, genomischen *S. mansoni*-DNA ein Fragment der erwarteten Größe von 4,6 kb. Bei der *Bam*HI-restringierten DNA wurde nur ein spezifisches Fragment mit einer Größe von etwa 5,5 kb detektiert (Abbildung 3.22). Hiermit wurde bestätigt, dass es sich bei dem Smβ-Int1-Gen um ein *single copy* - Gen handelt.

### 3.6.1.4 Charakterisierung von Sm $\beta$ -Int1

#### 3.6.1.4.1 Analyse der stadien- und geschlechtsspezifischen Transkription von Sm $\beta$ -Int1

Der Nachweis der Transkription von Sm $\beta$ -Int1 in verschiedenen Lebenszyklus-Stadien sowie Geschlechtern von *S. mansoni* erfolgte über RT-PCR-Analysen mit Total-RNA aus Miracidien und Cercarien sowie aus adulten *S. mansoni* Männchen und Weibchen (paarungsunerfahren und paarungserfahren). Jeweils 90 ng Total-RNA wurden in eine RT-Reaktion mit der Reversen Transkriptase SensiScript (Qiagen) und dem Primer  $\beta$ -Integrin1-C-Terminus-3' eingesetzt. Ein Viertel der Ansätze dienten als *templates* für die sich anschließenden PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar  $\beta$ -Integrin1-5'/-C-Terminus-3'.

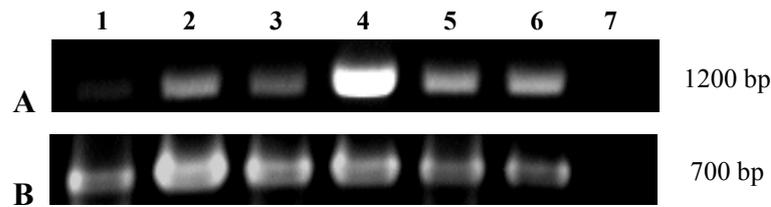
Transkripte von Sm $\beta$ -Int1 konnten in Adulten beider Geschlechter (jeweils paarungsunerfahren und paarungserfahren) sowie in Larven (Miracidien und Cercarien) von *S. mansoni* nachgewiesen werden (Abbildung 3.23). Die durchgeführten RT-PCR-Analysen zeigten dabei signifikant höhere Transkriptmengen in paarungserfahrenen im Vergleich zu paarungsunerfahrenen Adulten sowie im Vergleich zu den untersuchten Larvenstadien.



**Abbildung 3.23:** Nachweis der stadien- und geschlechtsspezifischen Transkription von Sm $\beta$ -Int1 über RT-PCR

Nachweis von Sm $\beta$ -Int1-Transkripten in beiden Geschlechtern und freilebenden Larvenstadien von *S. mansoni* über RT-PCRs mit dem Primerpaar  $\beta$ -Integrin1-5'/-C-Terminus-3' (nähere Erläuterungen siehe Text). Als *templates* dienten gleiche Mengen Total-RNA aus **1:** paarungsunerfahrenen Weibchen, **2:** paarungserfahrenen Weibchen, **3:** paarungsunerfahrenen Männchen, **4:** paarungserfahrenen Männchen, **5:** Miracidien, **6:** Cercarien. **9 - 14:** RT-Negativ-Kontrollen ohne initiale cDNA-Synthese zu 1 - 6. **7:** PCR-Negativ-Kontrolle mit dH<sub>2</sub>O als *template*. **8:** PCR-Positiv-Kontrolle. Jeweils 15  $\mu$ l der Reaktionen wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Das erwartete Amplifikationsprodukt besaß eine Größe von 1200 bp. Größenstandard: HyperLadderI (Bioline).

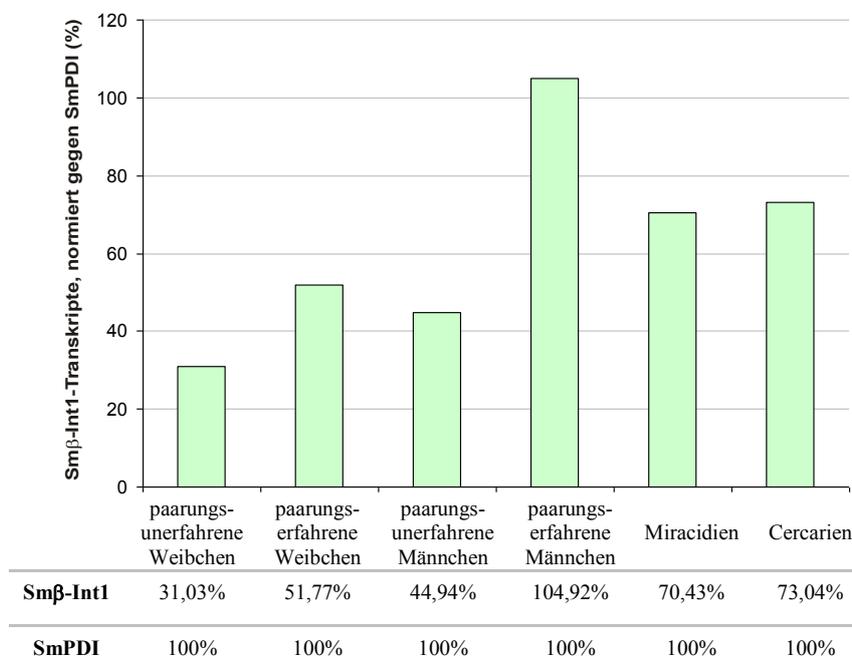
Für einen semiquantitativen Abgleich der Transkription von Sm $\beta$ -Int1 bezogen auf die konstitutive Transkription des *housekeeping* Gens SmPDI (Protein-Disulfid-Isomerase aus *S. mansoni*) (Finken et al., 1994) wurden RT-PCRs mit den gleichen RNAs als *templates* unter Verwendung des Primerpaars PDI-RNA-5'/-3' durchgeführt (Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24:** Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis von Smβ-Int1- bzw. SmPDI-Transkripten in verschiedenen Stadien und Geschlechtern von *S. mansoni*

Untersuchung der Transkription von **A:** Smβ-Int1 und **B:** SmPDI in beiden Geschlechtern und freilebenden Larvenstadien von *S. mansoni* (nähere Erläuterungen siehe Text). Als *templates* für die RT-PCRs dienten gleiche Mengen Total-RNA aus **1:** paarungsunerfahrenen Weibchen, **2:** paarungserfahrenen Weibchen, **3:** paarungsunerfahrenen Männchen, **4:** paarungserfahrenen Männchen, **5:** Miracidien, **6:** Cercarien. **7:** RT-Negativ-Kontrolle ohne initiale cDNA-Synthese. Jeweils 15 µl der PCR-Reaktionen wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die erwarteten Amplifikationsprodukte besaßen eine Größe von 1200 bp (SmβInt1) und 700 bp (SmPDI).

Der über densitometrische Analysen erfolgte semiquantitative Abgleich der Transkriptmengen von Smβ-Int1 im Vergleich zu den SmPDI-Transkriptmengen zeigte, dass die Smβ-Int1-Transkription in paarungserfahrenen Adulten stärker ist als in paarungsunerfahrenen, und dass Männchen die stärkste Transkription von Smβ-Int1 aufweisen (Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25:** Semiquantitative Analyse der Transkriptmengen von Smβ-Int1 im Vergleich zu SmPDI

Die Signale der RT-PCR-Produkte (Abbildung 3.24) wurden digitalisiert und densitometrisch vermessen (ImageJ). Die ermittelten Werte in den jeweiligen Proben für SmPDI wurde auf 100% gesetzt und die Werte für Smβ-Int1 entsprechend berechnet und graphisch dargestellt.

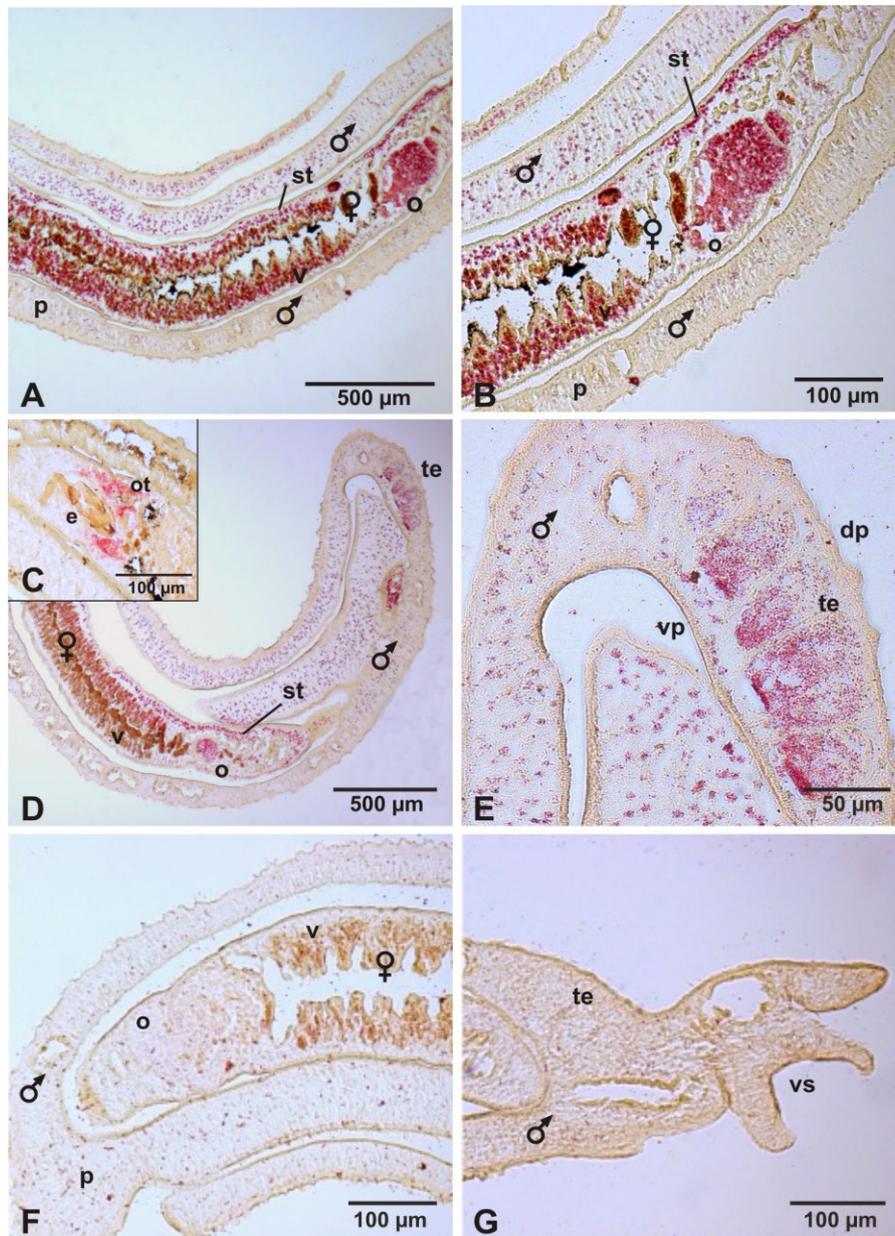
#### 3.6.1.4.2 *In situ* - Hybridisierung zur Lokalisation der Transkription von Sm $\beta$ -Int1

Zur Untersuchung des Transkriptionsortes von Sm $\beta$ -Int1 in adulten *S. mansoni* wurden *in situ* - Hybridisierungen auf Semi-Dünnschnitten von Pärchen durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein 303 bp großes Subfragment des Rezeptors subkloniert (Amplifizierung mit dem Primerpaar  $\beta$ -Integrin1-Sonde-5'/-3'), das den Bereich zwischen der EGF- und der Transmembrandomäne umfasst. Dieses Subfragment wurde zur Überprüfung sequenziert und diente als *template* für die Herstellung von *antisense*- und *sense*-Transkripten. Für die Synthese von *antisense*-Transkripten wurde das Konstrukt  $\beta$ -Integrin1-Sonde pDrive (Klon 2, Insert in 3' - 5' Orientierung) mit dem Restriktionsenzym *Hind*III linearisiert und die Transkripte mittels einer T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Für *sense*-Transkripte wurde das Konstrukt  $\beta$ -Integrin1-Sonde pDrive (Klon 3, Insert in 5' - 3' Orientierung) ebenfalls mit *Hind*III linearisiert und die Transkripte mit einer T7-RNA-Polymerase synthetisiert.

Die Transkription von Sm $\beta$ -Int1 wurde hauptsächlich im Ovar, Ootyp und Vitellarium des Weibchens (Abbildungen 3.26 A - D) und den Testes des Männchens nachgewiesen (Abbildungen 3.26 D, E). Die testikuläre Expression ist im ventralen, dem gynaecophoren Kanal zugewandten Bereich, in dem sich die reifen Spermien befinden, deutlich stärker als in der dorsalen Region (Abbildung 3.26 E; vgl. Abschnitt 3.11). Weiterhin konnte eine seitenpräferentielle Expression in Teilen des Subteguments vom Weibchen nachgewiesen werden (Abbildungen 3.26 A, B, D). Hybridisierungen mit *sense*-Transkripten zeigten keine Färbung, was die Spezifität der vorausgehenden Resultate belegt (Abbildungen 3.26 F, G).

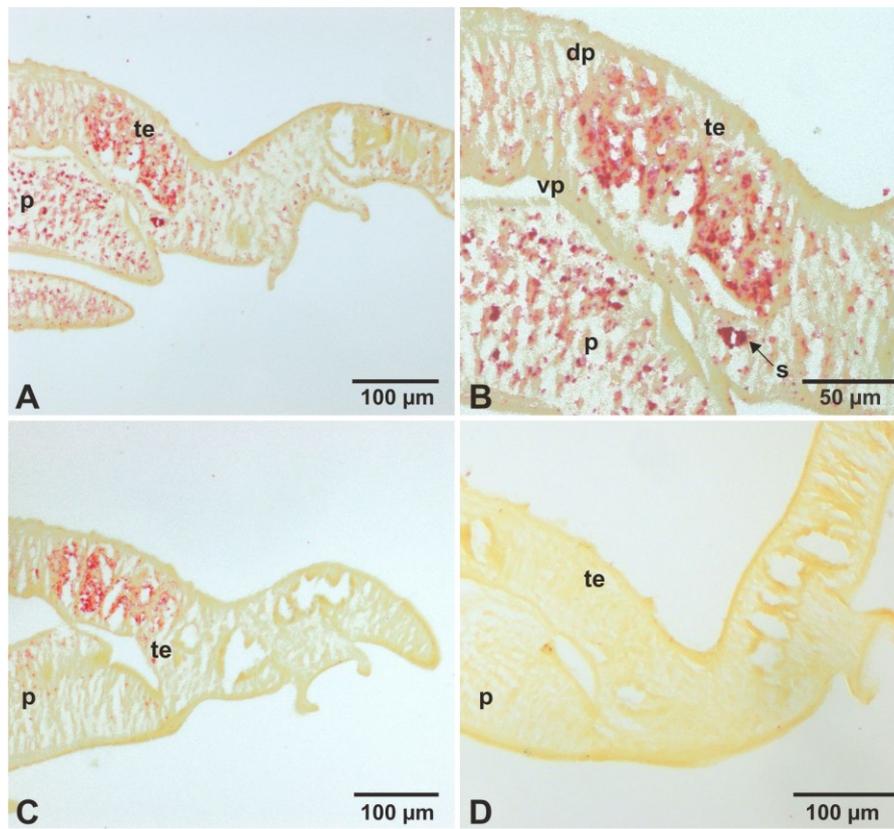
Für Sm $\beta$ -Int1 konnte über RT-PCR-Experimente eine stärkere Transkription in paarungserfahrenen als in paarungsunerfahrenen Männchen bzw. Weibchen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.25). Daher wurden ebenfalls *in situ* - Hybridisierungen auf Semi-Dünnschnitten paarungsunerfahrener *S. mansoni* durchgeführt.

Sm $\beta$ -Int1-Transkripte konnte in den Testes paarungsunerfahrener Männchen lokalisiert werden (Abbildungen 3.27 A - C). Eine starke Transkription konnte weiterhin in der Samenblase nachgewiesen werden, die sich anterior-ventral der Testesloben befindet (Abbildungen 3.27 A, B; vgl. Abschnitt 3.11). In paarungsunerfahrenen Weibchen konnten über eine *in situ* - Hybridisierung keine Transkripte von Sm $\beta$ -Int1 in Ovar, Vitellarium oder anderen Geweben nachgewiesen werden (nicht abgebildet). Eine Hybridisierung mit *sense*-Transkripten zeigte in beiden Fällen keine Färbung der Gewebe, was die Spezifität der vorher beschriebenen Resultate belegt (Abbildung 3.27 D).



**Abbildung 3.26:** *In situ* - Lokalisierung von Sm $\beta$ -Int1 in adulten *S. mansoni*

Der Nachweis des Transkriptionsortes von Sm $\beta$ -Int1 in adulten *S. mansoni* erfolgte über *in situ* - Hybridisierungen auf 5  $\mu$ m Semidünnschnitten von Pärchen mit *antisense*-Transkripten, die spezifisch gegen Sm $\beta$ -Int1 gerichtet waren (A - E). Als Negativ-Kontrolle diente eine Hybridisierung mit *sense*-Transkripten (F, G). [e: Ei, dp: dorsaler Bereich, o: Ovar, ot: Ootyp, p: Parenchym, st: Subtegument, te: Testes, v: Vitellarium, vp: ventraler Bereich, vs: Bauchsaugnapf, ♂: Männchen, ♀: Weibchen]



**Abbildung 3.27:** *In situ* - Lokalisierung von Sm $\beta$ -Int1 in paarungsunerfahrenen Männchen von *S. mansoni*

Der Nachweis des Transkriptionsortes von Sm $\beta$ -Int1 in paarungsunerfahrenen Männchen von *S. mansoni* erfolgte über *in situ* - Hybridisierungen auf 5  $\mu$ m Semidünnschnitten mit *antisense*-Transkripten, die spezifisch gegen Sm $\beta$ -Int1 gerichtet waren (A - C). Als Negativkontrolle diente eine Hybridisierung mit *sense*-Transkripten (D). [dp: dorsaler Bereich, p: Parenchym, s: Samenblase, te: Testes, vp: ventraler Bereich]

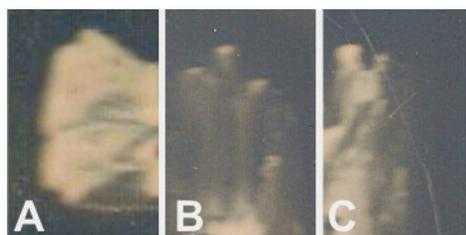
Die Lokalisation der Transkription von Sm $\beta$ -Int1 in Ovar und Testes paarungs-erfahrener Schistosomen co-lokalisiert mit der Expression der Syk-Kinase SmTK4. Da Syk-Kinasen und  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren interagieren können (Woodside et al., 2001), sollte im Folgenden überprüft werden, ob auch SmTK4 und Sm $\beta$ -Int1 interagieren (Abschnitt 3.6.1.5).

### 3.6.1.5 Interaktionsstudien von Sm $\beta$ -Int1 mit SmTK4

Um eine mögliche Interaktion des  $\beta$ -Integrin1-Rezeptors Sm $\beta$ -Int1 mit der Syk-Kinase SmTK4 zu überprüfen, wurde der C-terminale Bereich von Sm $\beta$ -Int1 in den GAL4-Aktivierungsdomänen-Vektor pACT2 subkloniert ( $\beta$ -Integrin1-C-Terminus pACT2). Die Klonierung erfolgte gerichtet und *in frame* über *Bam*HI und *Xho*I, so dass der C-Terminus

von Sm $\beta$ -Int1 in den Hefen als Fusionsprotein mit der GAL4-AD exprimiert werden konnte. Die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 lag bereits in der MCSI des Hefevektors pBridge vor (TK4-SH2SH2 pBridge) und konnte somit als Fusionsprotein mit der GAL4-BD exprimiert werden. Des Weiteren wurden Konstrukte verwendet, die jeweils nur eine singuläre SH2-Domäne exprimierten (TK4-SH2(1) pBridge, TK4-SH2(2) pBridge). Hiermit sollte die Abhängigkeit der Interaktion von dem Vorhandensein beider SH2-Domänen der Syk-Kinase untersucht werden. Beide Plasmide wurden jeweils in Hefezellen des Stammes AH109 co-transformiert und die Hefen zunächst auf SD-Trp/-Leu Selektionsplatten ausgestrichen. Zur Überprüfung der Interaktion über die Expression des *HIS3*-Reportergenes wurden gewachsene Hefeklonen auf SD-Trp/-Leu/-His Selektionsplatten umgestrichen und für 5 Tage bei 30°C inkubiert.

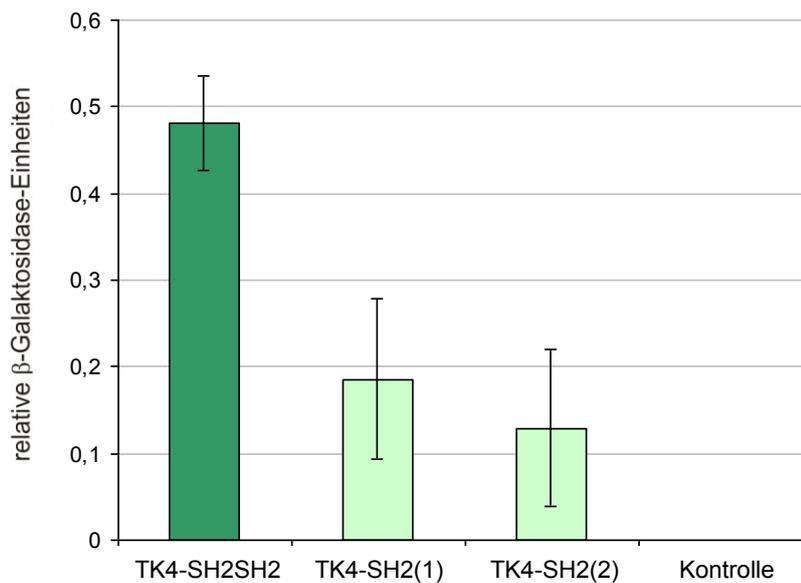
AH109-Hefeklonen, die mit den Konstrukten  $\beta$ -Integrin1-C-Terminus pACT2 und TK4-SH2SH2 pBridge co-transformiert waren, zeigten ein deutliches Wachstum auf den Selektionsplatten. Hefeklonen, die hingegen mit den Konstrukten  $\beta$ -Integrin1-C-Terminus pACT2 und TK4-SH2(1) pBridge bzw. TK4-SH2(2) pBridge co-transformiert waren, zeigten nur ein schwaches Wachstum (Abbildung 3.28). Die beiden SH2-Domänen von SmTK4 waren somit zu einer Interaktion mit dem C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 befähigt. Im Gegensatz dazu waren die Interaktionen mit den singulären SH2-Domänen deutlich schwächer (Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.28:** Yeast Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen dem Sm $\beta$ -Int1-C-Terminus und SmTK4

Die untersuchten Hefeklonen (Stamm AH109) waren co-transformiert mit  $\beta$ -Integrin1-C-Terminus pACT2 und **A:** TK4-SH2SH2 pBridge, **B:** TK4-SH2(1) pBridge, **C:** TK4-SH2(2) pBridge. Die Selektion erfolgte auf SD-Trp/-Leu/-His-Platten für 5 Tage bei 30°C.

Die Quantifizierung der Interaktionsstärken zwischen der Tandem-SH2-Domäne bzw. den singulären SH2-Domänen von SmTK4 und dem C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 erfolgte über einen  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay mit ONPG als Substrat (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29:**  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Interaktionsstärken zwischen den SmTK4-SH2-Domänen und dem Sm $\beta$ -Int1-C-Terminus

Dargestellt sind die Bindungsstärken zwischen der Tandem-SH2-Domäne bzw. den singulären SH2-Domänen von SmTK4 und dem C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 (n = 6; nähere Erläuterungen siehe Text). Als Negativ-Kontrolle dienten untransformierte Hefen (Stamm AH109).

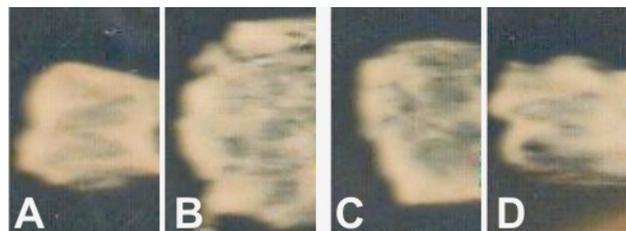
Der durchgeführte Flüssigassay bestätigte die Interaktion zwischen der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 und dem intrazellulären C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 (Abbildung 3.29). Die Interaktion der singulären SH2-Domänen von SmTK4 mit Sm $\beta$ -Int1-C-Terminus war hingegen deutlich schwächer, so dass die Interaktion beider Proteine von der Tandem-Struktur der SmTK4-SH2-Domänen positiv beeinflusst wird.

### 3.6.1.6 Interaktion von Sm $\beta$ -Int1 mit SmTK3 bzw. SmTK6

Für die intrazellulären, C-terminalen Bereiche von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren sind ebenfalls Interaktionen mit Tyrosinkinase der Src-Familie beschrieben (Arias-Salgado et al., 2003; Arnaout et al., 2007). Diese Interaktionen verlaufen über die SH3-Domänen der Src-Kinasen, wobei auch die SH4-Domänen eine noch nicht genauer charakterisierte Rolle bei der Bindung spielen (Arias-Salgado et al., 2003). Um zu überprüfen, ob die Src-Kinasen SmTK3 und SmTK6 an den  $\beta$ -Integrin1-Rezeptor aus *S. mansoni* binden können, wurden Interaktionsstudien im Yeast Two-Hybrid System durchgeführt. Die SH4SH3-Domänen von SmTK3 und SmTK6, die den Bereich von dem Startcodon ATG bis zum Ende der SH3-Domäne umfassen, wurden über PCRs mit den Primerpaaren TK3-SH3SH2-5'/TK3-SH3-3'

bzw. TK6-SH3SH2-5'/ TK6-SH3-3' amplifiziert. Des Weiteren wurden nur die jeweiligen SH3-Domänen der beiden Src-Kinasen über PCRs mit den Primerpaaren TK3-SH3-5'/TK3-SH3-3' und TK6-SH3-5'/ TK6-SH3-3' amplifiziert. Die Primer enthielten die für die weitere Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen. Vollängenklone beider Moleküle dienten als *templates* für die PCRs. Die Amplifikationsprodukte der erwarteten Größen von 658 bp (TK3-SH4SH3), 539 bp (TK6-SH4SH3) und 206 bp (TK3-SH3, TK6-SH3) wurden zunächst in den Klonierungsvektor pDrive kloniert und schließlich gerichtet und *in frame* über *Bam*HI und *Pst*I in die MCSI des Vektors pBridge umklontiert. Mittels dieser Vektoren konnten die SH4SH3- und die SH3-Domänen von SmTK3 bzw. SmTK6 in Hefen als Fusionsproteine mit der DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimiert werden.

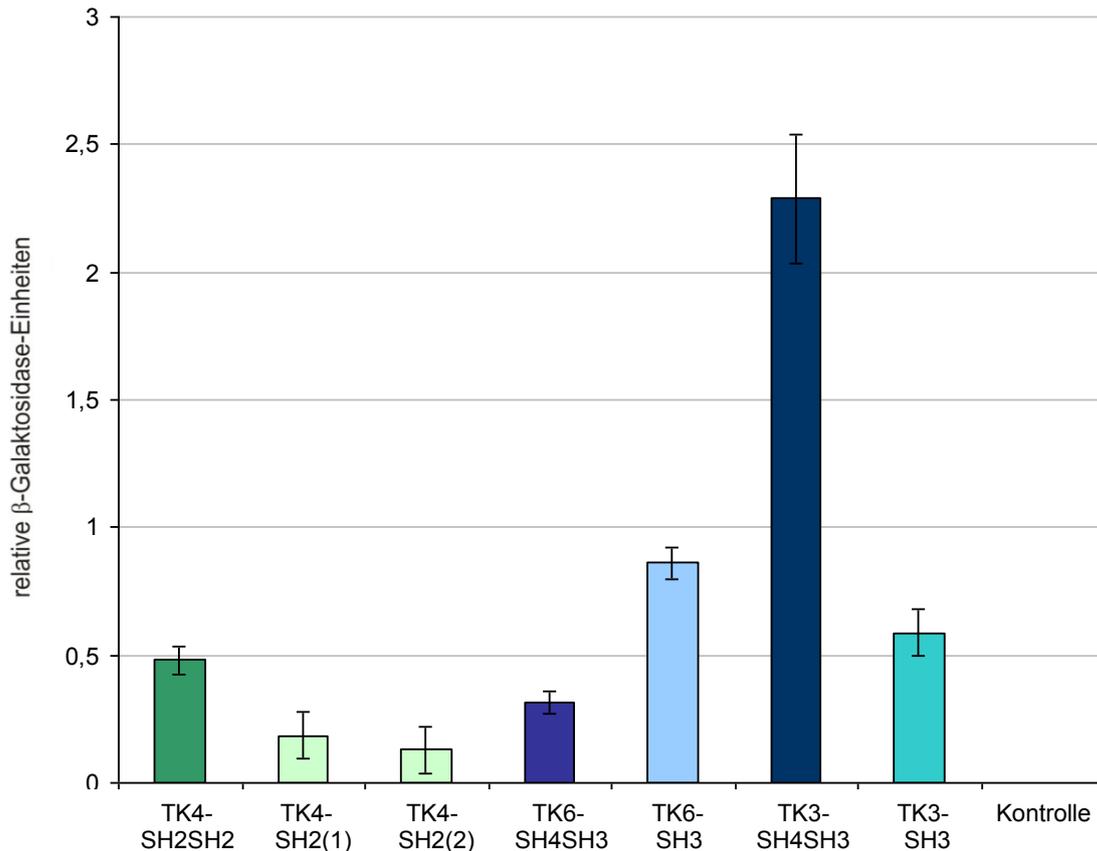
Alle vier Konstrukte (TK3-SH4SH3 pBridge, TK6-SH4SH3 pBridge, TK3-SH3 pBridge, TK6-SH3 pBridge) wurden mit dem Vektor pACT2, in den der  $\beta$ -Integrin-C-Terminus kloniert war, in Hefen des Stammes AH109 co-transformiert. Die Interaktion zwischen den SH4SH3- und SH3-Domänen von SmTK3 bzw. SmTK6 und dem C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 wurde über die Expression des *HIS3*-Reportergens mittels Selektion der erhaltenen Klone auf SD-Trp/-Leu/-His-Platten überprüft. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen bei 30°C war ein Wachstum aller vier Hefeklone auf den Selektionsplatten zu beobachten (Abbildung 3.30). Sowohl die SH4SH3- und SH3-Domänen von SmTK6 (Abbildungen 3.30 A, B) wie auch die von SmTK3 (Abbildungen 3.30 C, D) waren somit zur Interaktion mit dem intrazellulären C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 befähigt.



**Abbildung 3.30:** Yeast Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen dem C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 und den SH4SH3- und SH3-Domänen von SmTK6 bzw. SmTK3

Die untersuchten Hefeklone (Stamm AH109) waren co-transformiert mit  $\beta$ -Integrin1-C-Terminus pACT2 und **A:** TK6-SH4SH3 pBridge, **B:** TK6-SH3 pBridge, **C:** TK3-SH4SH3 pBridge, **D:** TK3-SH3 pBridge. Die Selektion erfolgte auf SD-Trp/-Leu/-His-Platten für 5 Tage bei 30°C.

Die Stärke der Interaktionen wurde auch in diesem Fall über  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassays quantifiziert. Die ermittelten Interaktionsstärken sind im Vergleich zu den Interaktionsstärken von SmTK4 und Sm $\beta$ -Int1 dargestellt (Abbildung 3.31).



**Abbildung 3.31:**  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Interaktionsstärken von SmTK4, SmTK6 und SmTK3 mit Sm $\beta$ -Int1

Dargestellt sind die Bindungsstärken zwischen der Tandem-SH2-Domäne bzw. den singulären SH2-Domänen von SmTK4 sowie den SH4SH3- und SH3-Domänen von SmTK6 bzw. SmTK3 und dem C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 (n = 6; nähere Erläuterungen siehe Text). Als Negativ-Kontrolle dienten untransformierte Hefen (Stamm AH109).

Die Resultate der Flüssigassays zeigten, dass neben der Syk-Kinase SmTK4 auch die beiden Src-Kinasen SmTK3 und SmTK6 an den intrazellulären Bereich von Sm $\beta$ -Int1 binden können (Abbildung 3.31). Hierbei zeigten sowohl SmTK3 wie auch SmTK6 eine im Vergleich zu SmTK4 stärkere Interaktion mit Sm $\beta$ -Int1. Diese war dann bei SmTK6 stärker, wenn anstelle der SH4SH3- nur die SH3-Domäne exprimiert wurde. Im Falle von SmTK3 hingegen wurde die Interaktion durch die Expression der SH4SH3-Domäne im Vergleich zu der singulären SH3-Domäne um den Faktor 4 verstärkt (Abbildung 3.31).

Der intrazelluläre Bereich des  $\beta$ -Integrin1-Rezeptors Sm $\beta$ -Int1 kann, wie die durchgeführten Analysen zeigten, Interaktionen mit den SH2-Domänen der Syk-Kinase SmTK4 sowie mit den SH3-Domänen der Src-Kinasen SmTK3 und SmTK6 eingehen. Die stärkste Interaktion trat hierbei zwischen SmTK3 und Sm $\beta$ -Int1 auf.

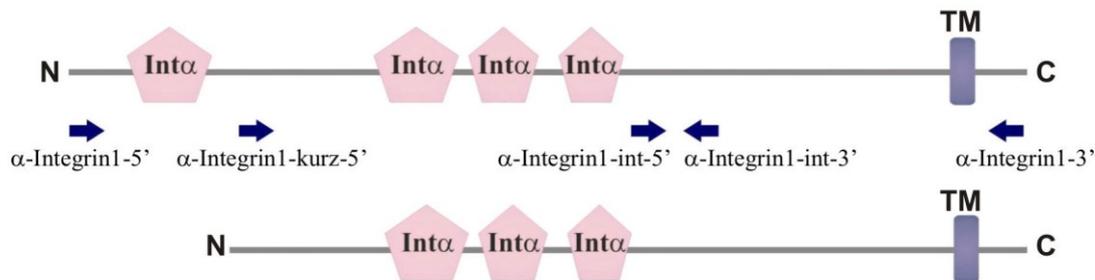
### 3.6.2 $\alpha$ -Integrin-Rezeptoren in *S. mansoni*

Integrin-Rezeptoren liegen in der Regel als Heterodimere bestehend aus einem  $\beta$ - und  $\alpha$ -Integrin-Rezeptor vor. Nach der Identifizierung des  $\beta$ -Integrin1-Rezeptor Sm $\beta$ -Int1, wurde ein Homolog eines  $\alpha$ -Integrin-Rezeptors aus *S. mansoni* identifiziert und kloniert. Sollte dieser die gleiche gewebespezifische Expression zeigen wie Sm $\beta$ -Int1, so wäre ein Heterodimer aus diesen Rezeptoren auch in *S. mansoni* wahrscheinlich.

#### 3.6.2.1 Identifizierung und Klonierung eines $\alpha$ -Integrin1-Rezeptors

In den *S. mansoni* - Genomdaten von Sanger & TIGR (www.sanger.ac.uk, www.tigr.org) wurden zwei vorhergesagte kodierende Sequenzen gefunden (*predicted CDS*, twinscan2, 29052.m001617, 29052.m001048), die für Proteine von 1354 bzw. 1219 Aminosäuren kodieren und hohe Homologien zu  $\alpha$ -Integrinen aus anderen Organismen aufweisen. Beide Sequenzen stimmen bis auf den äußeren 5'- bzw. N-terminalen-Bereich von 405 bp bzw. 135 AS überein, der nur in einer der Sequenzen enthalten ist (29052.m001617).

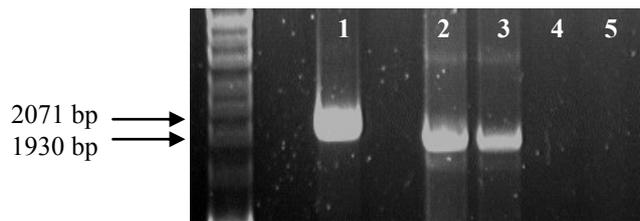
Zur Aufklärung der tatsächlichen Sequenz des  $\alpha$ -Integrin1-Rezeptors aus *S. mansoni* (Sm $\alpha$ -Int1) wurden RT-PCRs mit verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Die Lage der verwendeten Primer ist in der folgenden Abbildung 3.32 schematisch eingezeichnet.



**Abbildung 3.32:** Schematische Darstellung der hypothetischen  $\alpha$ -Integrin-1-Rezeptoren

Die vorhergesagten, hypothetischen  $\alpha$ -Integrin-1-Rezeptoren (1354 AS, 1219 AS) beinhalten vier (AS 43 - 104, 336 - 415, 440 - 499, 530 - 577) bzw. drei (AS 242 - 320, 345 - 404, 435 - 482)  $\alpha$ -Integrin-Domänen (Int $\alpha$ ) sowie eine Transmembrandomäne (TM; AS 1293 - 1315 bzw. 1158 - 1180). Eingezeichnet ist die relative Lage, der für die RT-PCR-Analysen verwendeten Primer.

In die RT-Reaktionen mit der SuperScriptIII (Invitrogen) wurden jeweils 1  $\mu$ g Total-RNA aus *S. mansoni* eingesetzt. Je ein Viertel der RT-Ansätze dienten als *templates* für die sich anschließenden PCR-Reaktionen. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass die vollständige Sequenz von Sm $\alpha$ -Int1 in zwei sich überschneidenden Fragmenten amplifiziert werden konnte (Abbildung 3.33).



**Abbildung 3.33:** RT-PCR zur Amplifizierung der cDNA-Sequenz von Sm $\alpha$ -Int1

Amplifizierung der cDNA-Sequenz von Sm $\alpha$ -Int1 über RT-PCRs mit den Primerpaaren  $\alpha$ -Integrin1-int-5'/ $\alpha$ -Integrin1-3' (1),  $\alpha$ -Integrin1-5'/ $\alpha$ -Integrin1-int-3' (2),  $\alpha$ -Integrin1-kurz-5'/ $\alpha$ -Integrin1-int-3' (3) (nähere Erläuterungen siehe Text). 4: RT-Negativ-Kontrolle ohne initiale cDNA-Synthese. 5: PCR-Negativ-Kontrolle mit dH<sub>2</sub>O als *template*. 12  $\mu$ l der PCR-Reaktionen wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die erwarteten Amplifikationsprodukte besaßen eine Größe von 2071 bp (1), 2215 bp (2) und 1930 bp (3). Größenstandard: HyperLadderI (Bioline).

Mit dem Primerpaar  $\alpha$ -Integrin1-int-5'/ $\alpha$ -Integrin1-3' konnte das erwartete 3'-Fragment von 2071 bp amplifiziert werden (Abbildung 3.33; Spur 1). Mit dem Primerpaar  $\alpha$ -Integrin1-kurz-5'/ $\alpha$ -Integrin1-int-3' wurde das bei beiden hypothetischen Sequenzen erwartete 5'-Fragment von 1930 bp erhalten (Abbildung 3.33; Spur 3). Bei der Reaktion mit dem Primerpaar  $\alpha$ -Integrin1-5'/ $\alpha$ -Integrin1-int-3', bei der der 5'-Primer am 5'-Ende der hypothetisch längeren Sequenz binden sollte, wurde das erwartete Amplifikationsprodukt von 2215 bp nicht erhalten, sondern ebenfalls ein Fragment von ca. 1900 bp (Abbildung 3.33; Spur 2). Eine spätere Analyse der Sequenzen zeigte, dass der Primer  $\alpha$ -Integrin1-5' mit leichten Fehlpaarungen auch ein Stück weiter 3'-wärts seiner eigentlichen Hybridisierungssequenz in beiden hypothetischen Sequenzen binden kann. Der Primer konnte vermutlich nicht an das hypothetische, längere 5'-Ende hybridisieren und führte durch die Bindung an einen weiter 3'-wärts gelegenen Sequenzabschnitt zu einem verkürzten Amplifikationsprodukt.

Die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen deuteten darauf hin, dass es sich bei der kürzeren der beiden hypothetischen Sequenzen, die für drei  $\alpha$ -Integrin-Domänen und eine Transmembrandomäne kodiert (vgl. Abbildung 3.32), um die tatsächliche Sequenz des  $\alpha$ -Integrin1-Rezeptors aus *S. mansoni* handelt. Der verlängerte 5'-Bereich der zweiten Sequenz konnte über eine RT-PCR nicht amplifiziert werden. Die erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden in den Klonierungsvektor pDrive kloniert. Über eine Sequenzierung wurde die *in silico* ermittelte Sequenz von Sm $\alpha$ -Int1 bestätigt (Anhang 5.4).

### 3.6.2.2 Genomische Struktur des Sm $\alpha$ -Int1-Gens

Die Exon-Intron-Struktur des Sm $\alpha$ -Int1-Gens wurde mit Hilfe der *S. mansoni* Genomdaten ermittelt. Mittels der kodierenden Bereiche wurde in den Datenbanken nach genomischen Klonen gesucht, die die Exons umfassen. Dabei wurden vier genomische Klone gefunden (Contig: 0002617, 12.533 bp; 0002618, 19.648 bp; 0002619, 7.331 bp; 0002620, 2.431 bp), welche die komplette kodierende Sequenz von Sm $\alpha$ -Int1, verteilt auf 11 Exons und 10 Introns mit über 36 kb umfassen (Abbildung 3.34).



**Abbildung 3.34:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur des Sm $\alpha$ -Int1-Gens

Die kodierende Sequenz für Sm $\alpha$ -Int1 ist im Genom von *S. mansoni* auf 11 Exons mit insgesamt 3.674 bp verteilt. Die gesamte genomische Sequenz einschließlich der Introns erstreckt sich auf über 36.201 bp.

Die Größen der einzelnen Exons und Introns des Sm $\alpha$ -Int1-Gens sind in der nachfolgenden Tabelle 3.8 wiedergegeben.

**Tabelle 3.8:** Exon- und Introngrößen des Sm $\alpha$ -Int1-Gens

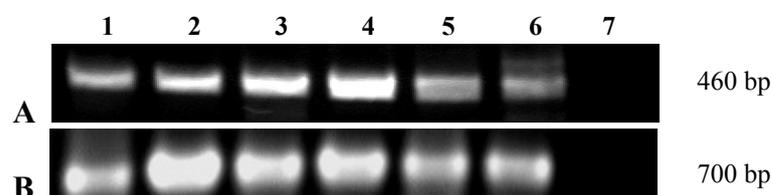
Exon	Exongröße [bp]	Intron	Introngröße [bp]
1	67	1	133
2	296	2	1.190
3	348	3	2.299
4	89	4	> 6.510
5	466	5	3.575
6	191	6	2.326
7	808	7	4.189
8	443	8	4.905
9	162	9	> 879
10	366	10	7.195
11	438		

### 3.6.2.3 Charakterisierung von Sm $\alpha$ -Int1

#### 3.6.2.3.1 Analyse der stadien- und geschlechtsspezifischen Transkription von Sm $\alpha$ -Int1

Wie bereits für den Sm $\beta$ -Int1 (vgl. 3.6.1.4.1) wurde auch für Sm $\alpha$ -Int1 die Transkription in verschiedenen Larven-Stadien und Geschlechtern von *S. mansoni* analysiert. Hierfür wurden RT-PCRs mit Total-RNA aus Miracidien und Cercarien sowie aus adulten *S. mansoni* Männchen und Weibchen (jeweils paarungsunerfahren und paarungserfahren) durchgeführt. Jeweils 90 ng Total-RNA wurden in eine RT-Reaktion mit der Reversen Transkriptase SensiScript (Qiagen) und dem Primer  $\alpha$ -Integrin-Sub1-3' eingesetzt. Je ein Viertel der Ansätze dienten als *templates* für die sich anschließenden PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar  $\alpha$ -Integrin-Sub1-3'/-5'. Die semiquantitative Abschätzung der Transkriptmengen von Sm $\alpha$ -Int1 (Abbildung 3.35 A) erfolgte erneut über den Abgleich gegen SmPDI (Abbildung 3.35 B).

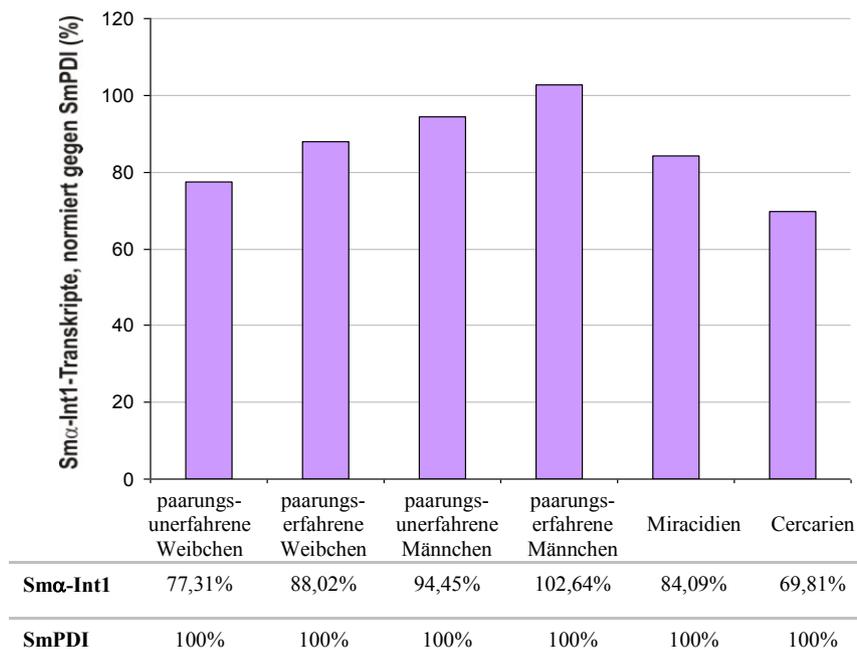
Sm $\alpha$ -Int1 wird in Adulten beider Geschlechter (jeweils paarungsunerfahren und paarungserfahren) sowie in den untersuchten Larvenstadien transkribiert. Das Transkriptionsprofil entspricht dem von Sm $\beta$ -Int1, wenn auch mit geringen quantitativen Unterschieden.



**Abbildung 3.35:** Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis von Sm $\alpha$ -Int1- bzw. SmPDI-Transkripten in verschiedenen Stadien und Geschlechtern von *S. mansoni*

Untersuchung der Transkription von **A:** Sm $\alpha$ -Int1 und **B:** SmPDI in beiden Geschlechtern und freilebenden Larvenstadien von *S. mansoni* (nähere Erläuterungen siehe Text). Als *templates* für die RT-PCRs dienten gleiche Mengen Total-RNA aus **1:** paarungsunerfahrenen Weibchen, **2:** paarungserfahrenen Weibchen, **3:** paarungsunerfahrenen Männchen, **4:** paarungserfahrenen Männchen, **5:** Miracidien, **6:** Cercarien. **7:** RT-Negativ-Kontrolle ohne initiale cDNA-Synthese. Jeweils 15  $\mu$ l der PCR-Reaktionen wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die erwarteten Amplifikationsprodukte besaßen eine Größe von 460 bp (Sm $\alpha$ -Int1) und 700 bp (SmPDI).

Wie bei Sm $\beta$ -Int1 (vgl. Abbildung 3.25), zeigte sich auch hier nach dem densitometrischen Abgleich gegen SmPDI (Abbildungen 3.35 und 3.36) eine im Vergleich zu paarungsunerfahrenen leicht stärkere Expression in paarungserfahrenen Adulten. Die Expression ist zudem in Männchen generell stärker als in Weibchen und Larven.

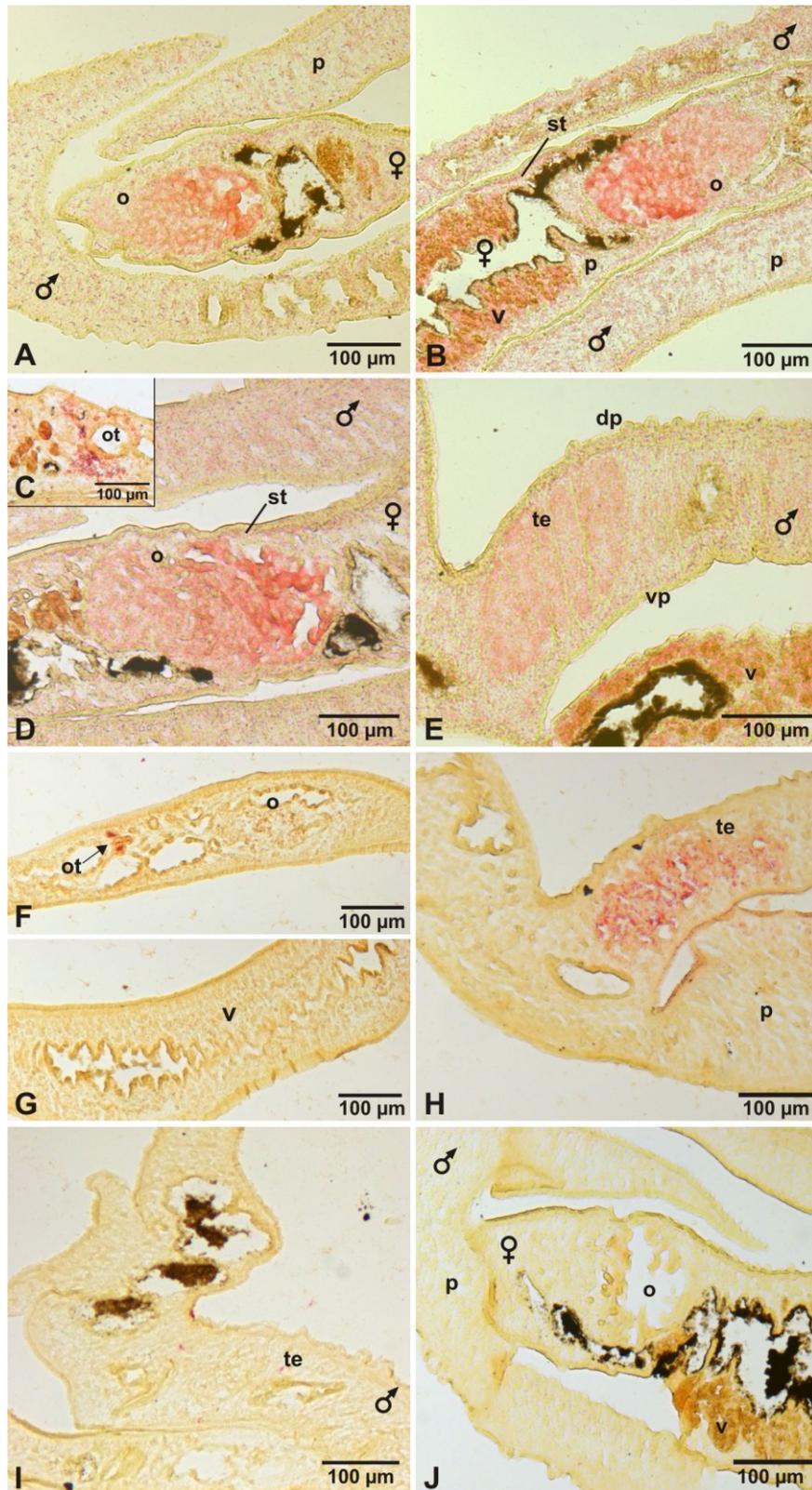


**Abbildung 3.36:** Semiquantitative Analyse der Transkriptmengen von Smα-Int1 im Vergleich zu SmPDI

Die Signale der RT-PCR-Produkte (Abbildung 3.35) wurden digitalisiert und densitometrisch vermessen (ImageJ). Die ermittelten Werte in den jeweiligen Proben für SmPDI wurde auf 100% gesetzt und die Werte für Smα-Int1 entsprechend berechnet und graphisch dargestellt.

### 3.6.2.3.2 *In situ* - Hybridisierung zur Lokalisation der Transkription von Smα-Int1

Zur Überprüfung, ob Smα-Int1 und Smβ-Int1 in identischen Geweben transkribiert werden, wurden *in situ* - Hybridisierungen auf Semi-Dünnschnitten adulter *S. mansoni* durchgeführt. Für die Herstellung Smα-Int1-spezifischer Transkripte wurde das bei der RT-PCR mit dem Primerpaar α-Integrin-Sub1-3’/-5’ erhaltene Amplifikationsprodukt in den Klonierungsvektor pDrive kloniert. Über Sequenzierung wurde bestätigt, dass es sich um ein Subfragment des α-Integrin1-Rezeptors handelte. Für die Synthese von *antisense* - Transkripten wurde das Konstrukt α-Integrin1-Sub1 pDrive (Insert in 3’ - 5’ Orientierung) mit dem Restriktionsenzym *HindIII* linearisiert und die Transkripte mittels einer T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Für *sense*-Transkripte wurde die Plasmid-DNA mit *BamHI* linearisiert und die Transkripte mittels einer SP6-RNA-Polymerase synthetisiert.



**Abbildung 3.37:** *In situ* - Lokalisierung von Sm $\alpha$ -Int1 in adulten *S. mansoni*

Der Nachweis des Transkriptionsortes von Sm $\alpha$ -Int1 in Adulten erfolgte über *in situ* -Hybridisierungen auf 5  $\mu$ m Semidünnschnitten von paarungserfahrenen (A - E, I - J) und paarungsunerfahrenen (F - H) *S. mansoni* mit *antisense*-Transkripten, die spezifisch gegen Sm $\alpha$ -Int1 gerichtet waren (A - H). Als Negativ-Kontrolle diente eine Hybridisierung mit *sense*-Transkripten (I - J). [dp: dorsaler Bereich, o: Ovar, ot: Ootyp, p: Parenchym, st: Subtegument, te: Testes, v: Vitellarium, vp: ventraler Bereich, ♂: Männchen, ♀: Weibchen]

Die Transkription von Sm $\alpha$ -Int1 konnte hauptsächlich im Ovar, Ootyp und Vitellarium paarungserfahrener Weibchen nachgewiesen werden (Abbildungen 3.37 A - D). Die Transkription im Ovar war dabei stärker in den großen, reifen Oocyten im Vergleich zu den kleineren unreifen Eizellen (Abbildungen 3.37 A, B, D; vgl. Abschnitt 3.11). In paarungsunerfahrenen Weibchen hingegen konnte die Transkription nur im Ootyp nachgewiesen werden, nicht jedoch im Ovar oder Vitellarium (Abbildungen 3.37 F - G; vgl. Abschnitt 3.11). In Männchen wurde die Transkription von Sm $\alpha$ -Int1, unabhängig von dem Grad der Reifung (paarungserfahren und paarungsunerfahren), in den Testes lokalisiert (Abbildungen 3.37 E, H). Schwache Expression konnte zudem seitenpräferentiell in Teilen des Subteguments des paarungserfahrenen Weibchens sowie einigen parenchymatischen Zellen nachgewiesen werden (Abbildungen 3.37 D, B). Eine Hybridisierung mit *sense*-Transkripten zeigte keine Färbung der Gewebe, was die Spezifität der vorher beschriebenen Resultate belegt (Abbildungen 3.37 I, J).

Die zuvor beschriebene Lokalisation der Transkription von Sm $\alpha$ -Int1 in den Reproduktionsorganen adulter *S. mansoni* (Ovar, Ootyp, Vitellarium und Testes) stimmt mit der von Sm $\beta$ -Int1 überein (vgl. 3.6.4.2), so dass eine Heterodimerisierung der beiden Rezeptoren in diesen Geweben als wahrscheinlich gilt.

### 3.7 Die Syk-Kinase SmTK4 und ihre Interaktionspartner

Über die Screenings und direkten Bindungsanalysen im Yeast Two-Hybrid System konnten die folgenden Interaktionen, ausgehend von der Syk-Kinase SmTK4, identifiziert werden:

1. Die Syk-Kinase SmTK4 interagiert über ihre Tandem-SH2-Domäne mit den Src-Kinasen SmTK6 und SmTK3.
2. SmTK6 und SmTK3 können über ihre SH2-Domänen jedoch nicht an die „*linker*“-Region und/oder die Tyrosinkinase-Domäne von SmTK4 binden, so dass die Interaktion vermutlich unidirektional verläuft.
3. SmTK4 interagiert über ihre Tandem-SH2-Domäne mit der *upstream* im Signalweg gelegenen Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1. Ebenfalls können SmTK3 und SmTK6 über ihre (SH3)SH2-Domänen mit SmRTK1 interagieren, wobei SmTK6 die stärkste Interaktion aufweist.
4. SmTK4 sowie SmTK3 und SmTK6 interagieren über ihre Tandem-SH2-Domäne bzw. über die (SH4)SH3-Domänen in unterschiedlicher Stärke mit dem intrazellulären C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1, wobei hier SmTK3 die stärkste Interaktion aufweist.
5. Als *downstream*-Bindungspartner von SmTK4 wurde ein Protein mit Homologien zu Smp40 und Hitzeschock-Proteinen identifiziert.
6. SmTK6 interagiert über ihre SH2-Domäne mit der Src-Kinase SmTK3 sowie mit einem Mucin-ähnlichen Protein.

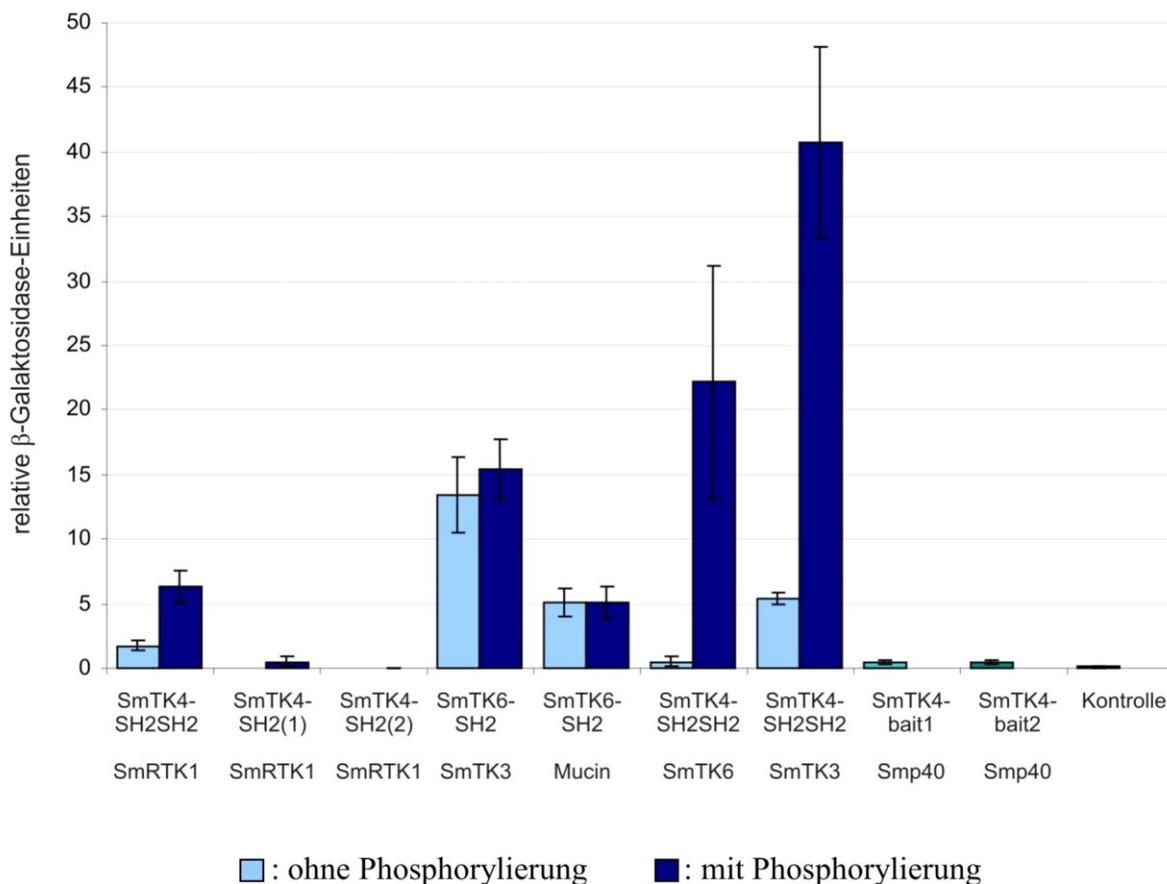
Für den quantitativen Vergleich dieser, in verschiedenen Experimenten identifizierten Interaktionen, wurden  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassays mit ONPG als Substrat durchgeführt. Diese ermöglichten einen direkten Vergleich der Interaktionsstärken unter gleichen Versuchsbedingungen (Abbildung 3.38). Die Interaktionen mit der C-terminalen Region von Sm $\beta$ -Int1 (vgl. Abbildung 3.31) waren aus experimentellen Gründen in diesem Ansatz nicht vertreten.

Der durchgeführte Assay (Abbildung 3.38) zeigte, dass die Syk-Kinase SmTK4 die stärkste *upstream*-Interaktion mit der Src-Kinase SmTK3 einging. Die Bindung an die Src-Kinase SmTK6 war im Vergleich dazu etwa um 50% geringer. Beide Interaktionen wurden in hohem Maße durch eine zusätzliche Tyrosinphosphorylierung innerhalb der Hefe verstärkt. SmTK6 interagierte ebenfalls mit SmTK3, wobei eine zusätzliche Tyrosin-

phosphorylierung einen leicht verstärkenden Einfluss hatte. Des Weiteren interagierte SmTK6 mit einem Mucin-ähnlichen Protein, hier jedoch unabhängig vom Phosphorylierungszustand.

Ein weiterer *upstream*-Interaktionspartner von SmTK4 ist die Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1. Die Interaktion von SmTK4 mit SmRTK1 war schwächer als die Interaktion von SmTK4 mit SmTK3 oder SmTK6, jedoch ebenfalls durch eine zusätzliche Tyrosin-Phosphorylierung in den Hefen positiv beeinflusst. Diese Interaktion war zudem abhängig von dem Vorhandensein beider SH2-Domänen von SmTK4. Eine singuläre SH2-Domäne allein war nicht zur Bindung an SmRTK1 befähigt.

Als *downstream*-Bindungspartner von SmTK4 wurde Smp40 identifiziert, das hohe Homologie zu Hitzeschockproteinen besitzt. Die Interaktionen der *linker*- Region und / oder der Tyrosinkinase-Domäne von SmTK4 mit diesem Protein war jedoch nur schwach.



**Abbildung 3.38:** Vergleichende  $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassays zur Quantifizierung der Interaktionsstärken

Dargestellt sind die Bindungsstärken zwischen SmTK4, SmRTK1, SmTK6, SmTK3, dem Mucin-Homolog und dem Protein mit Homologie zu Smp40 und Hitzeschockproteinen in Abhängigkeit von einer Phosphorylierung (n = 9). Als Negativ-Kontrolle dienten untransformierte Hefen (Stamm AH109).

## 3.8 Versuche zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen SmTK4

### 3.8.1 Bakterielle Expression von SmTK4-Subfragmenten

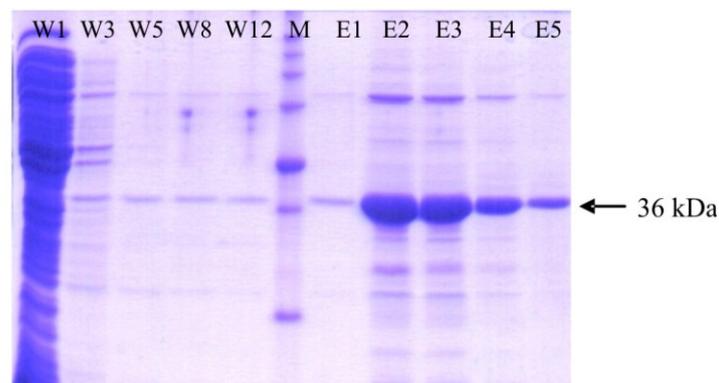
Für eine weitere Charakterisierung der Syk-Tyrosinkinase SmTK4 auf Proteinebene sollte ein SmTK4-spezifischer, polyklonaler Antikörper hergestellt werden. Dazu musste zunächst ein Teil dieser Proteinkinase rekombinant in *E. coli* - Zellen exprimiert, aufgereinigt und schließlich zur Immunisierung eingesetzt werden. Als immunogenes Proteinfragment (Antigen) wurde die SmTK4-„linker“-Region ausgewählt, d.h. der Bereich zwischen der Tandem-SH2- und der Tyrosinkinase-Domäne. Dieser Bereich enthält keine konservierten Domänen und sollte daher spezifisch für SmTK4 sein. Mit 1812 bp ist die gesamte „linker“-Region von SmTK4 fast doppelt so lang wie die „linker“-Regionen von Syk-Kinasen anderer Organismen (z. Bsp. Maus, Ratte, Mensch) (Knobloch et al., 2002b) und sollte daher in zwei Subfragmenten exprimiert werden.

Für die Expression der SmTK4-Subfragmente wurden verschiedene Vektor-Systeme und *E. coli* - Stämme getestet. Unter Verwendung des QIAexpression-Kits (Qiagen) mit den Vektoren pQE-30, pQE-31 und pQE-81L sowie den *E. coli* - Stämmen M15 und SG 13009 sollten Proteine mit einem C-terminalem Poly-Histidin-Tag (His-Tag) IPTG-induziert exprimiert werden. Die Optimierungsversuche der Expressionsbedingungen (Temperatur, Dauer, Induktor-Konzentration, t-Helfer-Plasmide) für die SmTK4-Subfragmente führte zu keinen Expressionsprodukten. Auch der Versuch der Expression der entsprechenden Subfragmente als GST-Fusionsproteine unter Verwendung des pGEX-2T-Expressionsvektors in BL21-Zellen, führte zu keinem Erfolg. Für die Expression wurde schließlich ein modifizierter pBAD-TOPO/Thio-Vektor (Invitrogen) verwendet, von dem ausgehend Proteine als Fusionsproteine mit N-terminalem Thioredoxin-Teil sowie C-terminalen V5-Epitop und His-Tag exprimiert werden können. Die Expression erfolgt durch einen Arabinose-induzierbaren Promoter und kann in beliebigen *E. coli* - Stämmen durchgeführt werden. Der N-terminale Thioredoxin-Teil führt zu einer erhöhten Expressionsrate in den Zellen, während der C-terminale His-Tag die Aufreinigung des Proteins über die Bindung an Ni-NTA-Agarose ermöglicht.

Für die Expression mittels des pBAD-TOPO/Thio-Vektors wurde die SmTK4-„linker“-Region in zwei Subfragmenten über eine PCR mit den Primerpaaren TK4-linker1-pBAD-5'(XbaI)/-3'(EcoRI) bzw. TK4-linker2-pBAD-5'(XbaI)/-3'(EcoRI) und einem Vollängenklon von SmTK4 als *template* amplifiziert. Das erste Subfragment (TK4-linker-Sub1) umfasste die ersten 1035 bp und das zweite Subfragment (TK4-linker-Sub2) die letzten 477 bp der SmTK4-„linker“-Region. Die beiden Subfragmente wurden

zunächst in den Klonierungsvektor pDrive und dann über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *EcoRI* gerichtet und *in frame* in die MCS des Vektors pBAD-TOPO/Thio umklont. Die erstellten Konstrukte wurden zur Kontrolle sequenziert und schließlich für die Expression in den *E. coli* - Stamm M15 transformiert. Die erwarteten Expressionsprodukte besaßen inklusive des Thioredoxin-Teils (13 kDa) sowie der V5- und His-Tags (3 kDa) eine Größe von etwa 57 kDa bzw. 36 kDa (SmTK4-Subfragment 1 bzw. 2).

In mehreren Versuchsreihen wurde die Expression beider Subfragmente unter verschiedenen Temperaturbedingungen, Zeitprofilen sowie Induktor-Konzentrationen getestet. Dabei zeigte sich, dass das Subfragment 1 nicht exprimiert werden konnte. Für das Subfragment 2 wurden eine Expression für 5 - 12 Stunden bei Raumtemperatur (20 - 22°C) und eine Induktion mit 0,2% Arabinose als optimale Parameter ermittelt. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Expression in großem Kultur-Maßstab (500 ml - Kulturen mit einem Gesamtvolumen von ca. 15 l), um die für die spätere Immunisierung erforderlichen Mengen zu erhalten. Nach der Aufreinigung des exprimierten Proteins über Ni-NTA-Agarose (Qiagen) wurden repräsentative Wasch- und Elutions-Fractionen über eine 12%ige SDS-PAGE und sich anschließende Coomassie-Färbung des Gels überprüft (Abbildung 3.39).



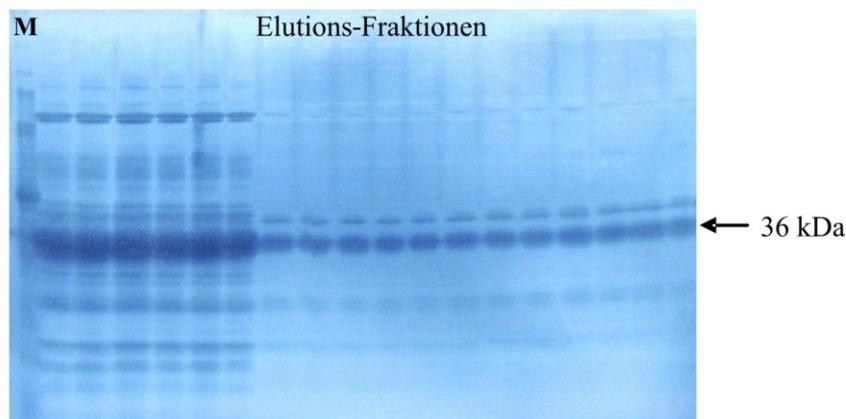
**Abbildung 3.39:** Kontrolle der rekombinanten Expression des SmTK4-Subfragments 2

Mittels einer 12%igen SDS-PAGE wurden je 15 µl der Wasch-Fractionen W1 - W12 sowie der Elutions-Fractionen E1 - E5 aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Die erwartete Größe des exprimierten SmTK4-Subfragments 2 betrug 36 kDa. M: Roti-Mark 10-150 (Carl Roth).

Die Elutions-Fractionen enthielten neben dem rekombinant exprimierten SmTK4-Subfragment 2 erwarteter Größe (36 kDa) auch mehrere weitere Proteine (Abbildung 3.39). Bei diesen handelte es sich vermutlich um Histidin-reiche *E. coli* - Proteine, die über die Ni-NTA-Agarose mit aufgereinigt wurden.

### 3.8.2 Aufreinigung des exprimierten SmTK4-Subfragments

Für die weitere Aufreinigung des Expressionsproduktes wurden die Elutions-Fractionen auf SDS-Maxi-Gele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden im Anschluss an die Elektrophorese mit Roti®-White (Carl Roth; vgl. Abschnitt 2.2.11.6) invers gefärbt (Abbildung 3.40). Bei dieser Färbemethode färbt sich die Gel-Matrix weiß, während die Proteinbanden durchsichtig und frei von Farbstoffen bleiben.

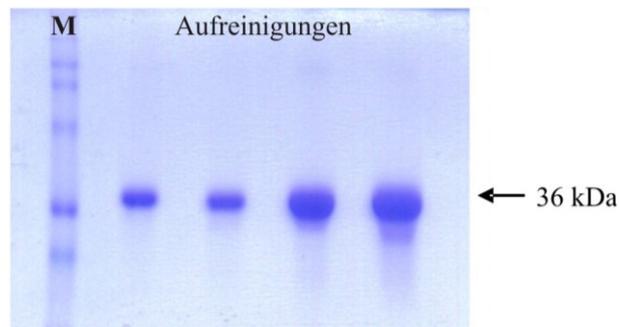


**Abbildung 3.40:** Elutions-Fractionen des exprimierten SmTK4-Subfragments 2

Mittels einer großen 10%igen SDS-PAGE wurden verschiedene Elutions-Fractionen des SmTK4-Subfragments 2 aufgetrennt und das Gel mit Roti®-White gefärbt. Das Gel ist im Anschluss an die Färbung gegen einen dunklen Hintergrund dokumentiert worden, so dass die Proteinbanden dunkel und die Gelmatrix hell erscheinen. M: Roti-Mark 10-150 (Carl Roth).

Die Banden mit dem exprimierten SmTK4-Subfragment 2 wurden mit einem Skalpell möglichst exakt aus dem Gel ausgeschnitten und zunächst in Waschlösung (Roti®-White-Lösung I, 1:100 in dH<sub>2</sub>O) gelagert. Aus den Gelstücken wurde das Protein über Elektroelution wieder gewonnen. Aufgrund der großen Volumina der Elektroeluate lag das Zielprotein stark verdünnt vor, so dass durch Ultrazentrifugation mittels Zentrifugalkonzentratoren (Amicon) mit einem Ausschluss 10 kDa eine Aufkonzentrierung durchgeführt wurde (Abbildung 3.41). In Vorbereitung für die folgende Verwendung als Immunisierungsantigen erfolgte gleichzeitig ein Pufferaustausch gegen 1× PBS (pH 7,4).

Durch das Ausschneiden der spezifischen Proteinbande aus dem SDS-Gel sowie der anschließenden Elektroelution des Proteins war es gelungen, das Expressionsprodukt von Nebenprodukten zu trennen und so deutlich aufzureinigen (Abbildung 3.41; vgl. Abbildung 3.39). Über die dargestellte Methode konnte das exprimierte Subfragment 2 der SmTK4-„linker“-Region quantitativ aufgereinigt werden, so dass die erforderliche Proteinmenge für eine Immunisierung erhalten wurde.



**Abbildung 3.41:** Überprüfung der Aufreinigung des SmTK4-Subfragments 2

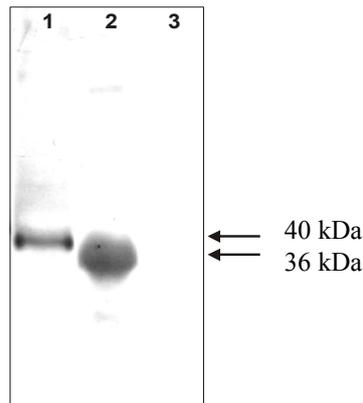
Mittels einer 10%igen SDS-PAGE wurde das aufgereinigte, rekombinant exprimierte SmTK4-Subfragment 2 aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. M: Roti-Mark 10-150 (Carl Roth).

### 3.8.3 Immunisierung mit dem SmTK4-Subfragment

Die Immunisierung zweier Kaninchen mit dem aufgereinigten und aufkonzentrierten Subfragment 2 der SmTK4-„linker“-Region als Antigen erfolgte durch die Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH). Vor der Immunisierung wurden Prä-Immunsereen von sechs potentiell zu immunisierenden Kaninchen getestet und schließlich zwei Tiere für die Immunisierung ausgewählt, deren Seren in Western-Blot-Analysen die schwächste Reaktion mit *S. mansoni* - Gesamtprotein zeigten. Die Immunisierung erfolgte nach einem Standard-Immunisierungsschema (2 Monate) mit je 200 µg Antigen pro Injektion.

### 3.8.4 Austestung der SmTK4-Antiseren im Western-Blot

Die erhaltenen Antiseren gegen das Subfragment 2 der SmTK4-„linker“-Region wurden im Western-Blot auf ihre Reaktion mit Gesamtlisat adulter *S. mansoni*-Pärchen getestet, wobei verschiedene Blutungen und Serum-Konzentrationen eingesetzt wurden. In keinem Fall konnte eine Proteinbande der erwarteten Größe detektiert werden. Aus diesem Grund wurden die Antiseren der ersten und dritten Blutung mit Hilfe des Antigens (SmTK4-Subfragment 2) affinitätsgereinigt (vgl. 2.2.13). Die gereinigten Seren wurden 1:100 für eine Immunodetektion eingesetzt und erkannten hierbei in Pärchen-Gesamtlisat eine einzelne Proteinbande von 40 kDa, die jedoch nicht der für SmTK4 erwarteten Größe von 140 kDa entsprach. Das Antigen hingegen wurde im Western-Blot von den Seren erkannt (Ergebnis für das affinitätsgereinigte Serum der 3. Blutung in Abbildung 3.42 dargestellt).



**Abbildung 3.42:** Western-Blot mit dem anti-SmTK4 - Antiserum (3. Blutung - affinitätsgerinigt)

Das affinitätsgereinigte Serum der dritten Blutung wurde 1:100 eingesetzt (Zweit-Antikörper: *goat anti-rabbit* - HRP-gekoppelt, 1:35.000). In den Spuren enthalten ist **1:** *S. mansoni* - Pärchen-Gesamtlysat, **2:** Antigen (SmTK4-„linker“-Subfragment 2), **3:** *S. mansoni* - Pärchen-Gesamtlysat, nur Zweit-Antikörper.

### 3.8.5 Bakterielle Expression weiterer SmTK4-Subfragmente

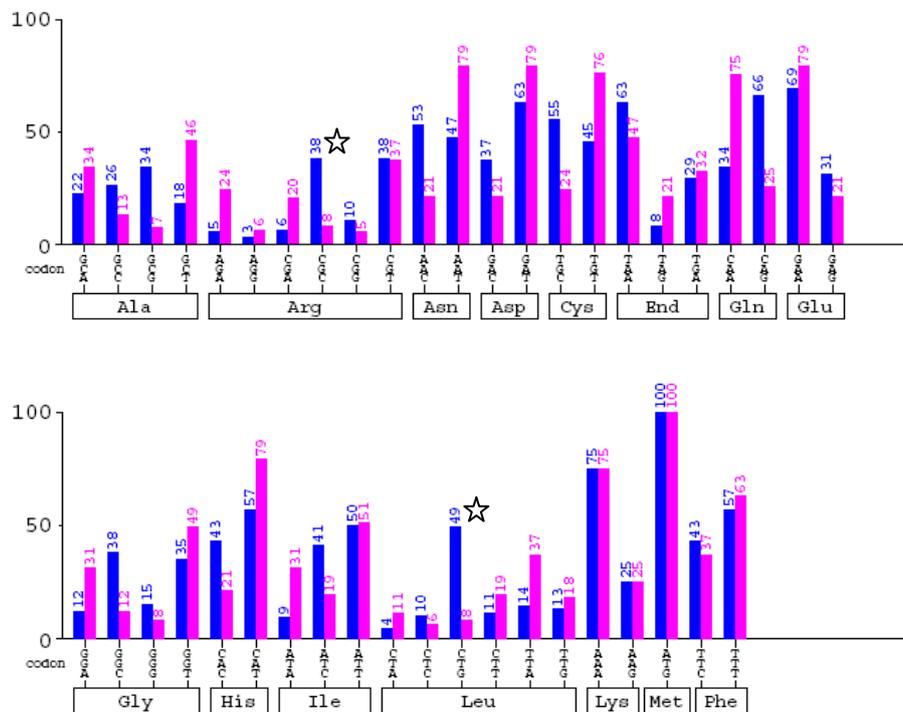
Die ersten anti-SmTK4-Antiseren detektierten im Western-Blot kein Protein der erwarteten Größe. Es wurde daher versucht, alternative Bereiche von SmTK4 als Antigen für eine Immunisierung zu exprimieren. Ausgewählt wurden hierfür die Tandem-SH2-Domäne (46 kDa), die einzelnen SH2-Domänen (SH2-1, 29 kDa; SH2-2, 29 kDa) sowie ein zentrales Fragment der „linker“-Region (Subfragment 3, 36 kDa). Die entsprechenden kodierenden Sequenzen wurden über PCRs mit den Primerpaaren TK4-SH2SH2-pBAD-5'(*Xba*I)/-3'(*Not*I), TK4-SH2-1-pBAD-5'(*Xba*I)/-3'(*Not*I), TK4-SH2-2-pBAD-5'(*Xba*I)/-3'(*Eco*RI) sowie TK4-linker-Sub3-pBAD-5'(*Xba*I)/-3'(*Not*I) und einem Volllängenklon von SmTK4 als *template* amplifiziert. Die erhaltenen Amplifikationsprodukte von 827 bp, 281 bp, 285 bp und 467 bp wurden zunächst in den Klonierungsvektor pDrive und dann gerichtet und *in frame* über die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Not*I bzw. *Eco*RI in die MCS des Vektors pBAD-TOPO/Thio umklont. Die erstellten Konstrukte wurden über Sequenzierung verifiziert und für die Expression in die *E. coli* - Stämme M15- und SG 13009 transformiert.

Testexpressionen in beiden Bakterienstämmen unter verschiedenen Temperaturbedingungen, Zeitprofilen und Induktorkonzentrationen führten jedoch zu keiner Expression der SmTK4-Subfragmente. Es standen somit keine weiteren Proteine als Antigene für eine Herstellung von anti-SmTK4-Antiseren zur Verfügung.

### 3.8.6 Vergleichende Analyse der *codon usages* von *S. mansoni* und *E. coli*

Die rekombinante Expression von *S. mansoni* - Proteinen in *E. coli* - Zellen stellte sich während der Expressionsversuche der SmTK4-Subfragmente, wie auch anderer Proteine, als problematisch dar. Trotz der Verwendung verschiedener Vektorsysteme und *E. coli* - Stämme konnten die Zielproteine gar nicht oder nur in geringem Maße exprimiert werden.

Eine mögliche Ursache hierfür könnten die unterschiedlichen *codon usages* von *S. mansoni* und *E. coli* darstellen. Zwar ist der genetische Code, d.h. die Kodierung der Aminosäuren durch die entsprechenden Basentriplets universell, jedoch werden in unterschiedlichen Organismen die einzelnen Triplets, die für eine Aminosäure kodieren, in abweichender Häufigkeit benutzt. Die *codon usage* von *S. mansoni* wurde aus diesem Grund mit der von *E. coli* (beide erhältlich unter <http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>) unter Verwendung des Programms *graphical codon usage analyser* (<http://gcua.schoedl.de/>) verglichen. Die Unterschiede im Codon-Gebrauch beider Organismen betragen insgesamt 16,6%. Bezogen auf einzelne Codons sind jedoch bedeutende Diskrepanzen mit bis zu 30% unterschiedlicher Häufigkeit festzustellen (z. Bsp. Arg und Leu; Abbildung 3.43).



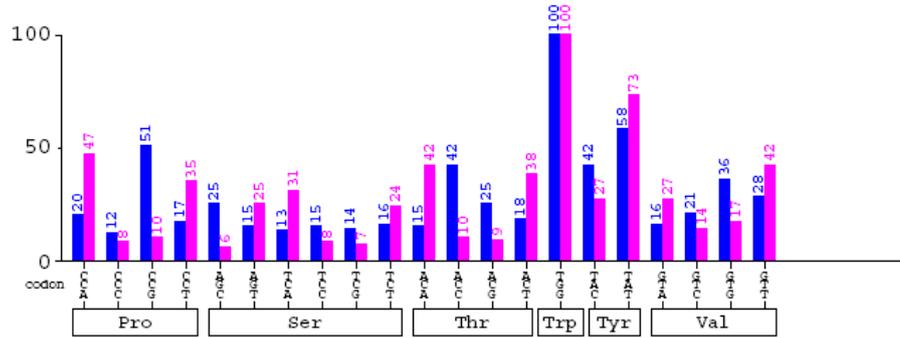
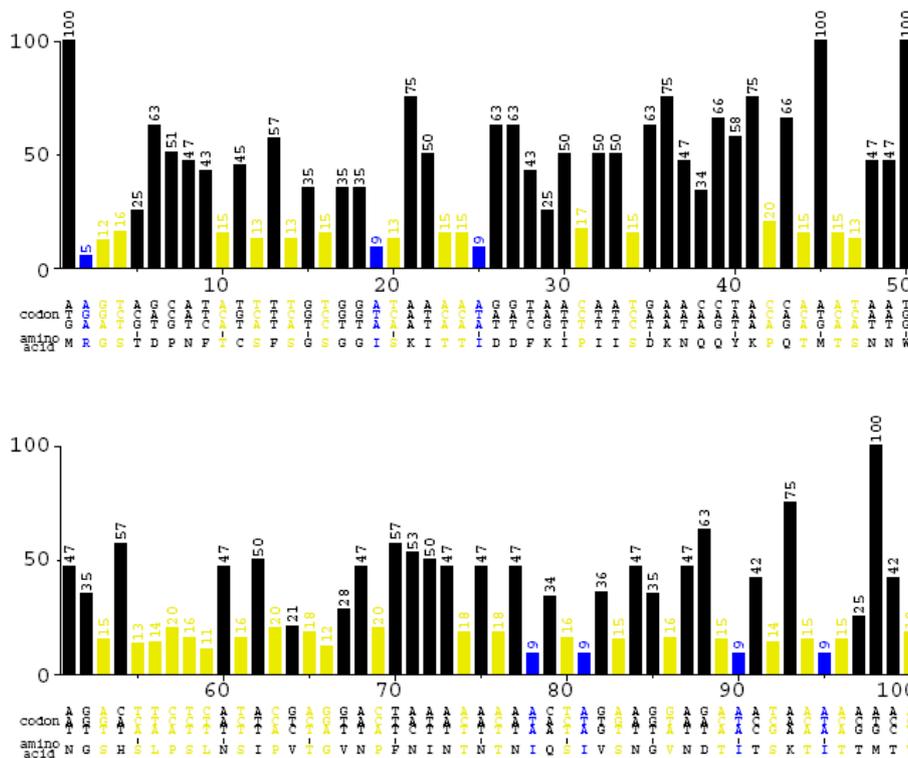


Abbildung 3.43: Vergleichende Analyse der codon usages von *S. mansoni* und *E. coli*

Die codon usages von *S. mansoni* und *E. coli* wurden mit Hilfe des Programms *graphical codon usage analyser* (<http://gcua.schoedl.de/>) verglichen. Die Balken geben die Häufigkeit in Prozent an, mit der ein Basentriplet für die Kodierung einer Aminosäure von dem jeweiligen Organismus verwendet wird (blau: *E. coli*, violett: *S. mansoni*). Unterschiede  $\geq 30\%$  sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Eine Analyse der kodierenden Sequenzen für die SmTK4-Subfragmente, die in *E. coli* exprimiert werden sollten, ergab große Diskrepanzen in der Verwendung einzelner Codons, was nachfolgend beispielhaft für das Subfragment 1 der SmTK4-„linker“ Region dargestellt ist (Abbildung 3.44).



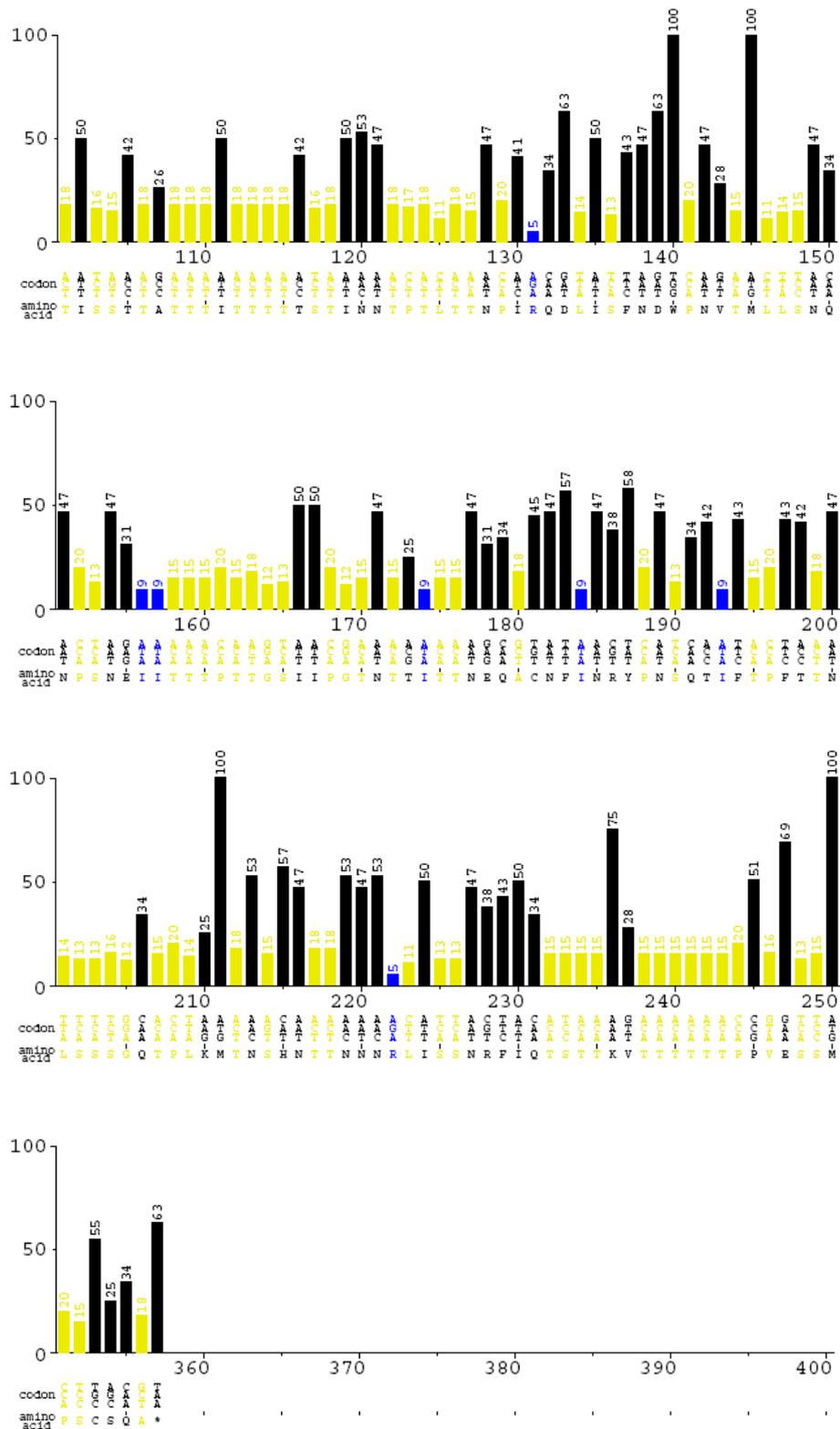


Abbildung 3.44: Analyse der kodierenden Sequenz für das SmTK4-Subfragment 1 unter Berücksichtigung der codon usage von *E. coli*

Die kodierende Sequenz des Subfragments 1 der SmTK4-„linker“-Region wurde unter Berücksichtigung der codon usage von *E. coli* mit Hilfe des Programms graphical codon usage analyser (<http://gcua.schoedl.de/>) analysiert. Die Balken geben die Häufigkeit in Prozent an, mit der ein Basentriplet der Sequenz aus *S. mansoni* für die Kodierung der entsprechenden Aminosäure von *E. coli* verwendet wird (schwarz: > 20%, gelb: ≤ 20%, blau: < 10%).

Von den insgesamt 257 Aminosäuren des Subfragmentes 1 der SmTK4-„linker“-Region werden 117 Aminosäuren in *E. coli* mit weniger als 20% und 14 Aminosäuren mit weniger als 10% Häufigkeit von dem gleichen Basentriplet kodiert. Insgesamt werden also rund 45% der Aminosäuren des SmTK4-Subfragments 1 in *E. coli* mit weniger als 20% Häufigkeit von den gleichen Basentriplets kodiert wie in *S. mansoni*. Im Falle des Subfragments 2 der SmTK4-„linker“-Region werden 44% der Aminosäuren mit einer Häufigkeit von unter 20% in *E. coli* von den gleichen Triplets kodiert (11% der Aminosäuren mit einer Häufigkeit von unter 10%). Die Triplets, die in *E. coli* mit weniger als 20% Häufigkeit verwendet werden, sind für eine Proteinexpression als kritisch anzusehen und könnten eine mögliche Ursache für die fehlende oder nur schwache bakterielle Expression der SmTK4-Subfragmente sein.

Auf Grund dieser Analysen wurden alternative Systeme für die rekombinante Expression von SmTK4-Subfragmenten in Betracht gezogen. Eine mögliche Alternative war die Expression in Hefezellen. Die Analyse der *codon usage* von Hefen (*S. cerevisiae*) zeigte für das SmTK4-Subfragment 1, dass nur 7% der Aminosäuren in *S. cerevisiae* mit einer Häufigkeit von weniger als 20% von den gleichen Triplets kodiert werden wie in *S. mansoni*. Für das Subfragment 2 betrug diese 14%. Jedoch hätten bei einer Expression in den zur Verfügung gestandenen Hefestämmen nicht die für eine Immunisierung benötigten Proteinmengen hergestellt werden können. Eine weitere Alternative war die Zell-freie *in vitro* - Expression über Kaninchen-Reticolocyten-Extrakte (T<sub>N</sub>T® Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega). Hierfür wurden die kodierenden Sequenzen der SmTK4-„linker“-Subfragmente 1 und 2 mit Primern amplifiziert, die zum einen ein Start- und ein Stop-Codon sowie eine Poly(A)-Sequenz enthielten, was die *in vitro* - Expression verbessern sollte (TK4-Sub1 *in vitro* Expression-5'(KpnI)/-3'(EcoRI), TK4-Sub2 *in vitro* Expression-5'(KpnI)/-3'(EcoRI)). Für die spätere Aufreinigung der exprimierten Proteine enthielt der 5'-Primer zudem die kodierende Sequenz für einen His-Tag. Die erhaltenen Amplifikate wurden über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *EcoRI* gerichtet in den Klonierungsvektor pDrive 3'-wärts des Promotors für die T7-Polymerase kloniert. Die erstellten Konstrukte wurden über eine Sequenzierung verifiziert und als *templates* in das auf Kaninchen-Reticolocyten basierende Transkriptions-Translations-System eingesetzt. Die Expression der Proteine ließ sich über einen Immunoblot mit einem anti-His-Antikörper jedoch nicht nachweisen. Mit den zur Verfügung gestandenen Mitteln konnte somit in dieser Arbeit kein alternatives System für die rekombinante Expression von SmTK4-Subfragmenten etabliert werden.

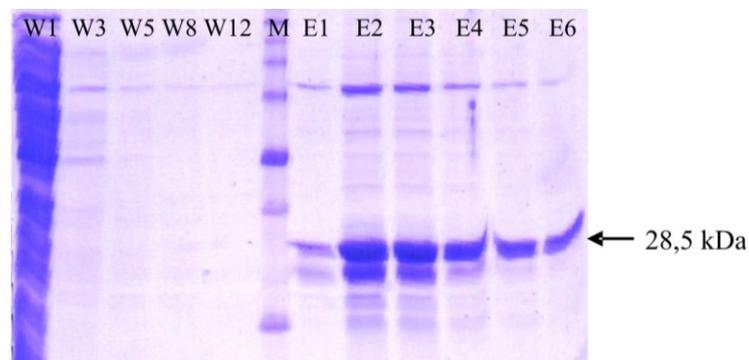
### 3.9 Versuche zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen SmTK6

#### 3.9.1 Bakterielle Expression der SmTK6-unique site

Für die weitere Charakterisierung der Src-Kinase SmTK6 sollte wie schon für SmTK4 ein polyklonaler Antikörper hergestellt werden. Hierfür wurde als Antigen die *unique site* von SmTK6, d.h. der Bereich N-terminal der SH3-Domäne, ausgewählt, da dieser spezifisch für SmTK6 ist und keine Homologien zu paralogen Proteinen besitzt. Dieser Bereich sollte in *E. coli* - Zellen mit Hilfe des pBAD-TOPO/Thio-Vektors (Invitrogen; modifiziert) rekombinant exprimiert werden.

Die SmTK6-*unique site* wurde über eine PCR mit dem Primerpaar TK6-unique-pBAD-5'(*Xba*I)/-3'(*Eco*RI) und einem Volllängenklon von SmTK6 als *template* amplifiziert. Das erhaltene Amplifikationsprodukt von 354 bp wurde zunächst in den Klonierungsvektor pDrive und schließlich gerichtet und *in frame* über die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Eco*RI in die MCS des Vektors pBAD-TOPO/Thio kloniert. Das erstellte Konstrukt wurde zur Überprüfung sequenziert und für die Expression des rekombinanten Proteins in Zellen des *E. coli* - Stamms SG 13009 transformiert.

Für die Expression wurden in mehreren Versuchsreihen verschiedene Temperatur- und Zeitprofile sowie Induktor-Konzentrationen getestet. Als optimale Parameter wurden eine Expression für 5 - 6 Stunden bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) und eine finale Arabinose-Konzentration von 0,2% ermittelt. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Expression in großem Kulturmaßstab (500 mL - Kulturen mit einem Gesamtvolumen von ca. 10 l). Das rekombinant exprimierte Protein wurde über seinen C-terminalen His-Tag mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen) aufgereinigt. Repräsentative Wasch- und Elutions-Fractionen der Aufreinigung wurden über eine 12%ige SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3.45).



**Abbildung 3.45:** Kontrolle der rekombinanten Expression der SmTK6-*unique site*

Mittels einer 12%ige SDS-PAGE wurden je 15 µl der Wasch-Fractionen W1 - W12 sowie der Elutions-Fractionen E1 - E6 aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Die erwartete Größe der exprimierten *unique site* von SmTK6 betrug 28,5 kDa. M: Roti-Mark 10-150 (Carl Roth).

Das erwartete Expressionsprodukt besaß eine Größe von 28,5 kDa. Die Elutions-Fractionen enthielten neben der rekombinant exprimierten SmTK6-*unique site* erwarteter Größe jedoch auch mehrere weitere Proteine (Abbildung 3.45), bei denen es sich vermutlich um Histidinreiche *E. coli* - Proteine handelt, die über die Ni-NTA-Agarose mit aufgereinigt wurden.

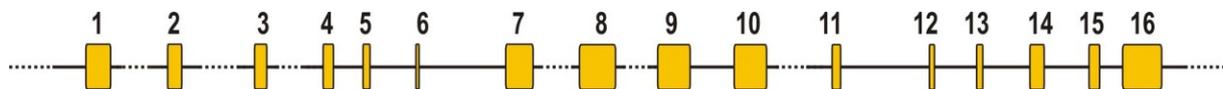
### 3.9.2 Aufreinigung der exprimierten SmTK6-*unique site*

Die weitere Aufreinigung des Expressionsproduktes erfolgte analog zu der Aufreinigung des SmTK4-Subfragmentes 2 (vgl. 3.8.2). Die Elutions-Fractionen wurden auf SDS-Maxi-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, die Gele mit Roti®-White (Carl Roth) gefärbt und die Banden mit der exprimierten SmTK6-*unique site* aus dem Gel ausgeschnitten. Aus den Gelstücken wurde das Protein über Elektroelution wieder gewonnen, aufkonzentriert und der Puffer gegen 1× PBS (pH 7,4) ausgetauscht (vgl. 3.8.2). Die rekombinant exprimierte SmTK6-*unique site* stand damit als Antigen für eine Immunisierung zur Verfügung, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte.

## 3.10 Analyse der genomischen Sequenzen der SmTK4- und SmTK6-Gene

### 3.10.1 Genomische Struktur des SmTK4-Gens

Die Exon-Intron-Struktur des SmTK4-Gens wurde mit Hilfe der *S. mansoni* Genomdaten ermittelt. In den Datenbanken wurden 8 genomische Klone gefunden (Contigs: 0016231, 5.483 bp; 0016227, 8.190 bp; 0016224, 7.938 bp; 0016223, 8.810 bp; 0016220, 13.235 bp; 0016222, 2.461 bp; 0016219, 12.800 bp; 0016217, 16.568 bp), die die kodierende Sequenz von SmTK4, verteilt auf 16 Exons und 15 Introns umfassen (Abbildung 3.46).



**Abbildung 3.46:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur des SmTK4-Gens

Die kodierende Sequenz für SmTK4 ist im Genom von *S. mansoni* auf 16 Exons mit insg. 2.225 bp verteilt. Die gesamte genomische Sequenz inklusive der Introns erstreckt sich auf über 71.000 bp.

Insgesamt verteilt sich die kodierende Sequenz für SmTK4 über 71 kb im *S. mansoni* - Genom. Die Größen der einzelnen Exons und Introns sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben (Tabelle 3.9).

**Tabelle 3.9:** Exon- und Introngrößen des SmTK4-Gens

Exon	Exongröße [bp]	Intron	Introngröße [bp]
1	329	1	> 8.158
2	188	2	> 9.361
3	162	3	> 8.838
4	136	4	1.235
5	93	5	6.593
6	42	6	9.271
7	363	7	> 3.768
8	480	8	> 6.206
9	432	9	5.684
10	457	10	> 2.583
11	113	11	6.152
12	67	12	1.862
13	82	13	2.369
14	190	14	1.579
15	141	15	1.124
16	519		

Die *in silico* - Analyse der genomischen Struktur des SmTK4-Gens deutete darauf hin, dass es sich bei SmTK4 um ein *single copy* - Gen handelt, da in den Datenbanken jeweils nur ein genomischer Klon gefunden wurde, der einen bestimmten, kodierenden Sequenzabschnitt enthält. Dies stimmt mit den Ergebnissen vorheriger Southern-Blot-Analysen überein (Knobloch et al., 2002b), bei denen eine SmTK4-spezifische Sonde bei *EcoRI*- und *MunI*-restringierter, genomischer *S. mansoni*-DNA jeweils nur an ein definiertes DNA-Fragment erwarteter Größe hybridisierte.

### 3.10.2 *In silico* - Sequenzanalyse der 5'-Region des SmTK4-Gens

Die in dem Contig 0016231 enthaltene, 2627 bp lange 5'-Region (5'-wärts des ATG-Startcodons) des SmTK4-Gens wurde mit Hilfe des Programms MatInspector, welches auf der Transkriptionsfaktor-Datenbank TRANSFEC (Quandt et al., 1995; Heinemeyer et al., 1999) basiert, auf konservierte Transkriptionsfaktor-Bindestellen untersucht. Die *core* und *matrix similarity* wurden optimiert, um eine hohe Übereinstimmung der identifizierten Elemente mit der Konsensussequenz sicher zu stellen.

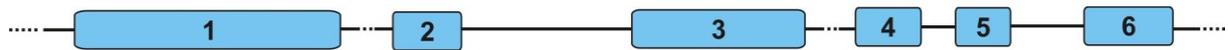
In der 5'-Region des SmTK4-Gens konnten verschiedene, potentielle Promotorelemente identifiziert werden (Tabelle 3.10; Anhang 5.5). An der Position - 129, relativ zum Translationsstart (ATG-Startcodon, +1) konnte eine TATA-Box identifiziert werden. TATA-Boxen eukaryotischer Promotoren liegen meist 26 - 34 bp 5'-wärts des Transkriptionsstartes, der für SmTK4 noch nicht bestimmt ist. 26 bp 3'-wärts dieser potentiellen TATA-Box liegt eine Sequenz, die mit dem Konsensus einer Inr-Sequenz übereinstimmt (Py-Py-A<sup>+</sup>-N-T/A-Py-Py-Py [Py = Pyrimidin, N = beliebige Base, A<sup>+</sup> = Transkriptionsstart], Lodish et al., 2001). Inr (Initiator)-Sequenzen sind pyrimidinreiche Sequenzen, die in vielen eukaryotischen Promotoren das Startnukleotid beinhalten. Im weiteren 5'-Bereich wurden putative CREB-Elemente identifiziert (Positionen - 308 und - 2548), die zu 84% bzw. 92% mit der *core*-Sequenz übereinstimmen. An der Position - 493 liegt ein Sequenzmotiv mit 75% Übereinstimmung zu der *matrix*-Sequenz von TIEG-Bindestellen. Vier Bindestelle für ein S8-Homöodomänen-Protein wurden identifiziert (Positionen - 517, - 1335, - 1392 und - 1593), welche mit der *core*- und der *matrix*-Sequenz eine Übereinstimmung von 100% aufweisen. An den Positionen - 568 und - 1219 wurden potentielle CAAT-Boxen identifiziert, die zu 100% mit der *matrix*- und zu 81 - 88% mit der *core*-Sequenz übereinstimmen. Des Weiteren sind vier Bindestellen für SWI/SNF-Komplexe mit 100% bzw. 98% Identität zu den *core*- bzw. *matrix*-Sequenzen gefunden worden. Eine mögliche Bindestelle für einen Retinoid-Säure-Rezeptor (RXR) wurde an Position - 1141 identifiziert, die eine Übereinstimmung von 100% zu der *core*- und 81% zu der *matrix*-Sequenz besitzt.

**Tabelle 3.10:** Spezifizierung und Position der Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die in der 2627 bp langen 5'-Region des SmTK4-Gens identifiziert wurden

Element	Position relativ zum ATG (+1)	Funktion
TATA-Box	-129	ubiquitäres Promotorelement, involviert in der Fixierung des Transkriptionsstarts
CREB-Element	- 308, -2548	Bindestellen für Transkriptionsaktivatoren
TIEG-Element	- 493	<i>TGF-beta-inducible early gene</i> , Zinkfinger-Transkriptionsfaktor
S8	- 517, - 1335, - 1392, -1593	Bindestelle für ein S8-Homöodomänen-Protein
CAAT-Box	- 568, -1219	Ubiquitäres, cis-agierendes Promotorelement
SWI/SNF	- 903, -966, -1320, -1956	Chromatin-remodellierender Komplex; häufig involviert bei der Aktivierung von Genen bei Mitosen
RXR	- 1141	Bindestelle für einen Retinoid-Säure-Rezeptor

### 3.10.3 Genomische Struktur des SmTK6-Gens

Die Exon-Intron-Struktur des SmTK6-Gens wurde mit Hilfe der *S. mansoni* Genomdaten ermittelt. In den Datenbanken wurden insgesamt drei genomische Klone identifiziert (Contigs: 0002364, 5.886 bp; 0002365, 8.011 bp; 0002367, 5.249 bp), welche die komplette kodierende Sequenz von SmTK6 in 6 Exons und 5 Introns umfassen (Abbildung 3.47).



**Abbildung 3.47:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur des SmTK6-Gens

Die kodierende Sequenz für SmTK6 ist im Genom von *S. mansoni* auf sechs Exons mit insg. 1.694 bp verteilt. Die gesamte genomische Sequenz inklusive der Introns erstreckt sich auf über 18.133 bp.

Die kodierende Sequenz für SmTK6 verteilt sich insgesamt über 18 kb im *S. mansoni* - Genom. Die Größen der einzelnen Exons und Introns sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben (Tabelle 3.11).

**Tabelle 3.11:** Exon- und Introngrößen des SmTK6-Gens

Exon	Exongröße [bp]	Intron	Introngröße [bp]
1	628	1	> 7.750
2	162	2	4.565
3	409	3	> 2.230
4	155	4	828
5	130	5	1.950
6	210		

### 3.11 Morphologie der Reproduktionsorgane von *S. mansoni* - Pärchen

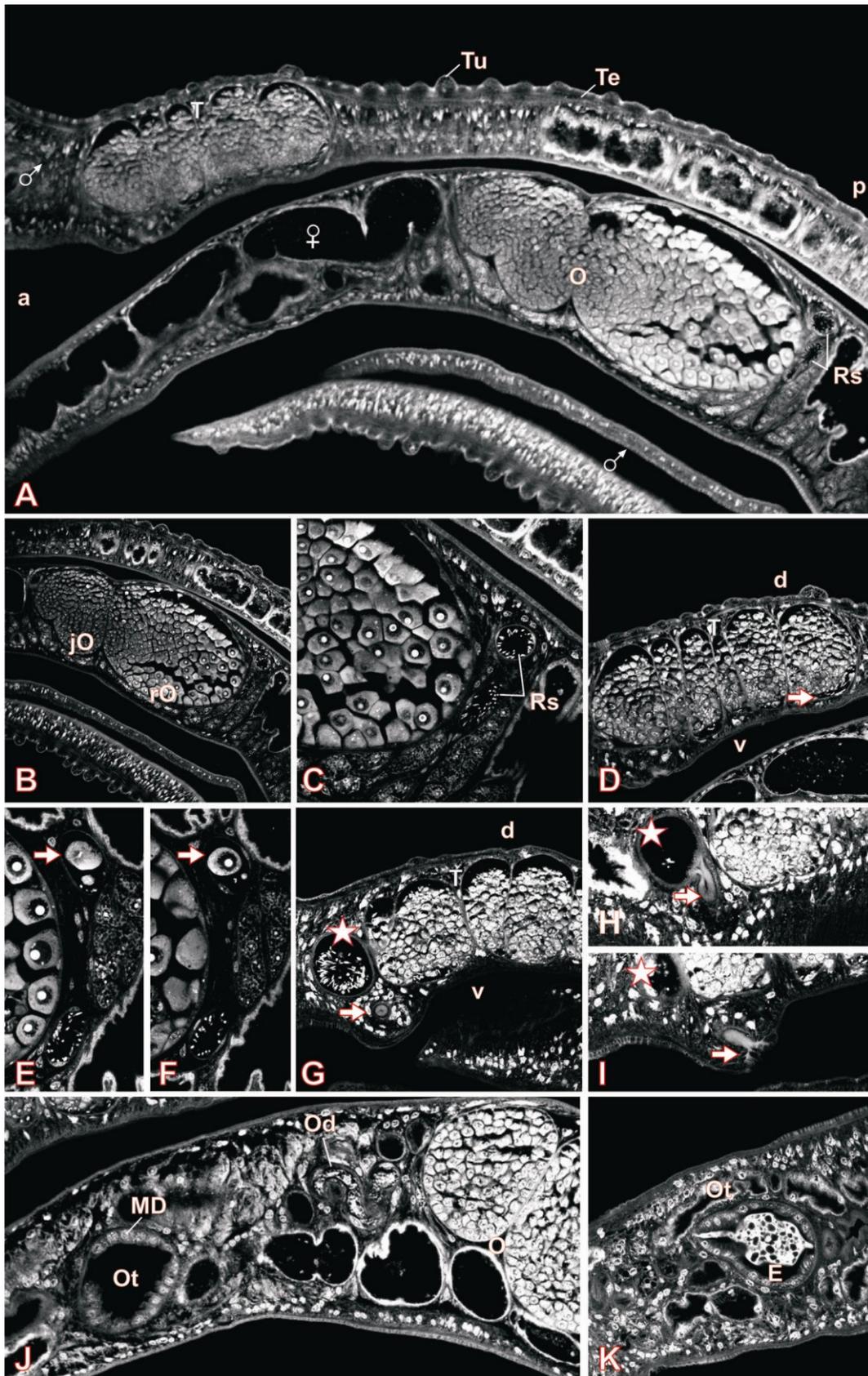
Nach der Identifizierung und Charakterisierung der Syk-Kinase SmTK4 sowie der Lokalisation ihrer Expression im Ovar und den Testes adulter Schistosomen (Knobloch et al., 2002b), stellte sich die Frage nach ihrer Funktion in diesen Reproduktionsorganen. Eine Möglichkeit zur funktionellen Charakterisierung von SmTK4 ist der Einsatz eines Syk-Kinase spezifischen Inhibitors, der vermutlich auch die Aktivität von SmTK4 unterbinden kann (Abschnitt 3.12). Dass Inhibitoren, die ursprünglich gegen Vertebraten-Tyrosinkinasen gerichtet waren, auch entsprechende Moleküle aus *S. mansoni* inhibieren können, wurde bereits erfolgreich gezeigt (Knobloch et al., 2006; Knobloch et al., 2007). Protokolle für eine posttranskriptionelle Supprimierung von Molekülen mit dsRNAs (RNAi), die zuvor nur für Prä-Adultstadien (Schistosomulae) erfolgreich angewendet worden waren, wurden erst kürzlich auch für adulte Schistosomen etabliert (Ndegwa et al., 2007). Mit der RNAi stand somit eine weitere Methode für eine funktionelle Analyse von SmTK4 in Schistosomen zur Verfügung (Abschnitt 3.13).

Aufgrund der Lokalisation der SmTK4-Expression war bei einer Inhibition dieser Syk-Kinase ein möglicher Einfluss auf die Reproduktionsorgane zu vermuten. Dieser sollte im Anschluss an die Inhibitor- oder RNAi-Behandlung mikroskopisch analysiert werden. Für die Untersuchung der inneren Morphologie adulter Schistosomen wurde 1998 erstmals eine *whole mount* - Färbung mit Karminrot und anschließender konfokaler Mikroskopie eingesetzt (Machado-Silva et al., 1998), mit der auch eine Darstellung des Reproduktionssystems von *S. mansoni* möglich war (Neves et al., 2005). Karminrot ist ein natürlicher Farbstoff, der aus Schildläusen (*Dactylopius coccus cacti*) gewonnen wird und für eine Vielzahl verschiedener Färbungen eingesetzt werden kann (Baranyovits, 1978; Dapson, 2007).

Zur Etablierung dieser bisher nur von einer Arbeitsgruppe verwendeten Färbemethode in unserem Labor, wurde das von Machado-Silva et al. (1998) publizierte Protokoll modifiziert und die Bedingungen für eine detaillierte Darstellung der Reproduktionsorgane sowie für eine Färbung von Pärchen optimiert. Adulte von *S. mansoni* wurden nach der Perfusion des Endwirtes in einem Gemisch aus Ethanol, Formalin und Essigsäure (AFA) fixiert und unter sauren Bedingungen mit Karminrot gefärbt, bevor sie in Kanadabalsam eingedeckelt wurden (vgl. Kapitel 2.2.22). Ihre Morphologie ließ sich dann am konfokalen *laser scanning* Mikroskop (KLSM; Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus mit einer He/Ne-Laseranregung bei 488 nm von 48% und einer Detektion bei 470 nm *long pass* darstellen. Die optimalen Parameter für die Mikroskopie wurden in mehreren Versuchsreihen empirisch ermittelt.

Als Vorarbeit für die spätere Analyse Inhibitor- oder dsRNA-behandelter Schistosomen, wurden zunächst unbehandelte Würmer mit dieser Technik gefärbt. Die morphologischen Untersuchungen konzentrierten sich auf die Reproduktionsorgane Ovar und Testes (Abbildung 3.48), da diese aufgrund der Lokalisation der SmTK4-Expression im Fokus des Interesses standen.

Das Ovar paarungserfahrener *S. mansoni*-Weibchen enthält hexagonale Oocyten mit einem zentralen Nukleus in verschiedenen Stadien der Reifung. Im anterioren Bereich des Ovars befinden sich junge, unreife Oocyten (Oogonien) mit einem geringen Zellvolumen. Weiter posterior befinden sich zunehmend reifere Zellen, deren Cytoplasmavolumen deutlich größer ist. Der Nukleus erscheint in der konfokalen Mikroskopie dunkel und der Nukleolus hell (Abbildungen 3.48 A - C). Im posterioren Bereich verlassen die großen, reifen Oocyten das Ovar und treten in den Ovidukt über (Abbildungen 3.48 E, F). Kurz nach dem Übergang des Ovars in den Ovidukt bildet eine Ausstülpung der Ovidukt-Wand das elongierte *Receptaculum seminis* (Neves et al., 2005), in dem Spermien des Männchens gespeichert werden (Abbildung 3.48 C). Hier erfolgt die Befruchtung der Oocyte. Die Abbildung 3.48 E zeigt eine sich im Ovidukt befindliche reife Oocyte im Kontakt mit einem Spermium (siehe Pfeil). Im anterioren Bereich mündet der Ovidukt in den Ootyp, in dem ein Ei aus einer Oocyte und mehreren Vitellocyten zusammengesetzt wird (Abbildungen 3.48 J, K). Von hier aus wird das Ei in den Uterus abgegeben, der in einem Genitalporus unterhalb des Bauchsaugnapfes endet. Die Testes paarungserfahrener *S. mansoni*-Männchen sind aus mehreren Loben aufgebaut und mit Keimzellen (Spermatogonien, Spermatocyten) gefüllt. Diese befinden sich in den einzelnen Loben in verschiedenen Differenzierungsstadien, wobei hier die größeren Zellen die am wenigsten differenzierten Keimzellen repräsentieren (Neves et al., 2005). Im ventralen, dem gynaecophoren Kanal zugewandten Bereich der Testesloben befinden sich elongierte Spermatozoen, die sich zu mobilen Spermien entwickeln (Abbildung 3.48 D). Die Spermien der Schistosomen bestehen aus einer kopfartigen Verbreiterung mit dem Zellkern und einem fadenförmigen Schwanzteil (Mehlhorn & Piekarski, 1995). Von dem ventralen Bereich der Testesloben werden die Spermien über je einen kurzen *Vas efferens* in den *Vas deferens* transportiert (Mehlhorn & Piekarski, 1998), der zu einer anterior gelegenen Samenblase anschwillt, welche mit einer Vielzahl von Spermien gefüllt (Abbildung 3.48 G). Von hier aus führt der *Vas deferens* weiter ventral und mündet posterior des Bauchsaugnapfes über einen nicht-muskulösen Cirrusbeutel (Mehlhorn & Piekarski, 1998) in den gynaecophoren Kanal (Abbildungen 3.48 G - I), in den die Spermien bei der Paarung kontinuierlich abgegeben werden (Kitajima et al., 1976).

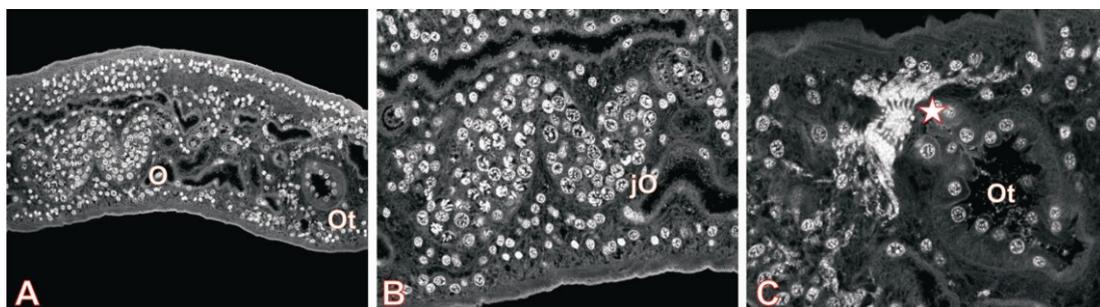


**Abbildung 3.48:** Morphologie der Gonaden von Schistosomen-Pärchen

Pärchen von *S. mansoni* wurden nach der Perfusion des Endwirtes in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt. Die Darstellung ihrer Morphologie erfolgte am KLSM (Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus (Anregung 488 nm, Detektion 470 nm *long pass*). **A:** Pärchen von *S. mansoni* im Überblick. Zu erkennen sind das Tegument (Te) sowie die Tuberkel (Tu), die Testes (T),

das Ovar (O) sowie das *Receptaculum seminis* (Rs). **B**: Vergrößerung des Ovars aus A (jO: junge, unreife Oocyten; rO: reife Oocyten). **C**: weitere Vergrößerung aus A (Rs: *Receptaculum seminis*, gefüllt mit Spermien). **D**: Vergrößerung der Testes (T) aus A. Im ventralen Bereich der Testesloben markiert der Pfeil die Spermien, die über den *Vas efferens* in den *Vas deferens* transportiert werden. **E, F**: posteriorer Bereich eines Ovars. Der Pfeil markiert eine reife Oocyte im Kontakt mit einem Spermium. **G**: Testes (T) mit der anterior gelegenen Samenblase (Stern), die mit Spermien gefüllt ist. Der Pfeil markiert den *Vas deferens*. **H, I**: Vergrößerung aus G in verschiedenen Ebenen, die den Verlauf des *Vas deferens* von der Samenblase über den Cirrusbeutel in den gynaeophoren Kanal zeigen. **J**: Ootyp (Ot) mit umgebenden Mehlischen Drüsen (MD) im anterioren Bereich des Ovars (O). Zu erkennen ist der Ovidukt (Od), der vom Ovar zum Ootyp führt. **K**: Ei (E) im Ootyp (Ot). [a: anterior, d: dorsal, p: posterior, v: ventral]

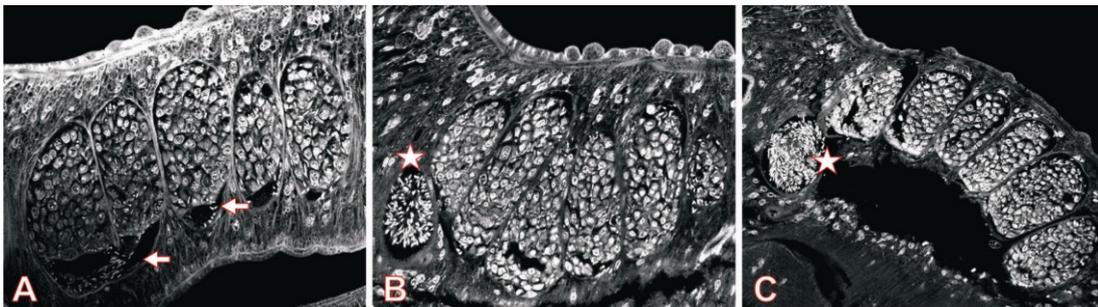
Mit der Paarung der Schistosomen werden im Weibchen Proliferations- und Differenzierungsprozesse von Zellen initiiert, die zur Reifung der Reproduktionsorgane führen. Um die morphologischen Unterschiede zwischen paarungserfahrenen und paarungsunerfahrenen *S. mansoni*-Weibchen darzustellen, wurde die Karminrot-Färbung mit anschließender konfokaler Mikroskopie eingesetzt. Die über unisexuelle Infektionen (vgl. Kapitel 2.2.1.5) erzeugten paarungsunerfahrenen Weibchen wurden hierfür in AFA fixiert, mit Karminrot gefärbt und mittels konfokaler Lasermikroskopie morphologisch analysiert. Ovar und Ootyp paarungsunerfahrener *S. mansoni*-Weibchen sind deutlich kleiner als in paarungserfahrenen Weibchen. Das Ovar enthält ausschließlich kleine, undifferenzierte Oocyten (Abbildungen 3.49 A, B). Im posterioren Bereich des Ootyps, in den Ovidukt und Vitellodukt münden, befindet sich eine filamentöse Struktur, die zuvor bei Schistosomen noch nicht beschrieben worden ist. Diese Struktur verengt sich zum Eingang des Ootyps hin und scheint diesen zu verschließen (Abbildung 3.49 C, Stern).



**Abbildung 3.49:** Ovar und Ootyp paarungsunerfahrener Schistosomen-Weibchen

Über unisexuelle Infektionen erzeugte *S. mansoni*-Weibchen wurden nach Perfusion aus dem Endwirt in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt. Die Auswertung erfolgte am KLSM (Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus (Anregung 488 nm, Detektion 470 nm *long pass*). **A**: Ovar und Ootyp eines paarungsunerfahrenen Weibchens. **B**: Ovar mit jungen, unreifen Oocyten. **C**: Ootyp. Der Stern markiert die filamentöse Struktur am Eingang des Ootyps. jO: junge, unreife Oocyten; O: Ovar; Ot: Ootyp. [anteriores Ende des Schistosomen-Weibchens rechts]

Um mögliche morphologische Unterschiede zwischen paarungserfahrenen und paarungsunerfahrenen *S. mansoni*-Männchen ebenfalls untersuchen zu können, wurden die über unisexuelle Infektionen erzeugten Männchen mit Karminrot gefärbt und am konfokalen Lasermikroskop untersucht. Paarungsunerfahrene *S. mansoni*-Männchen weisen wie die paarungserfahrenen Männchen vollständig ausdifferenzierte Testes mit einer Vielzahl von Spermien im ventralen Bereich der Loben auf (Abbildung 3.50 A). Auch ihre anterior der Testes gelegene Samenblase ist mit einer Vielzahl Spermien gefüllt (Abbildungen 3.50 B, C).



**Abbildung 3.50:** Testes paarungsunerfahrener Schistosomen-Männchen

Über unisexuelle Infektionen erzeugte *S. mansoni*-Männchen wurden nach ihrer Perfusion aus dem Endwirt in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt. Die Auswertung erfolgte am KLSM (Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus (Anregung 488 nm, Detektion 470 nm *long pass*). A - C: Testes von paarungsunerfahrenen Männchen. Die Pfeile markieren Spermien im ventralen Bereich und der Stern die Samenblase im anterioren Bereich der Testesloben. [anteriores Ende des Schistosomen-Männchens links, dorsal oben]

### 3.12 Einfluss des Syk-Kinase Inhibitors Piceatannol auf adulte *S. mansoni*

Piceatannol (3,4,3',5'-Tetrahydroxy-*trans*-Stilben) ist ein selektiver Inhibitor für Syk/Zap-Tyrosinkinase. Er inhibiert die Substratphosphorylierung der humanen Syk-Kinase mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 10 µM. In adhären Granulozyten wurde mit 10 µM Piceatannol eine Reduktion und mit 30 µM eine völlige Inhibition der Substratphosphorylierung durch die Syk erreicht (Willeke et al., 2003). Für Gewebe wird Piceatannol in höheren Konzentrationen von 100 - 200 µM eingesetzt (Oliver et al., 1994).

In der Schistosomen *in vitro* - Kultur zeigte Piceatannol bei Konzentrationen von 10 - 35 µM nach 48 Stunden keinen Einfluss auf die DNA-Synthese im Weibchen und schien somit keinen Einfluss auf mitotische Prozesse zu haben (Knobloch, 2002). Die einzige aus *S. mansoni* bekannte Syk-Kinase SmTK4 wird vorwiegend im Ovar des Weibchens und in den Testes des Männchens exprimiert (Knobloch et al., 2002b). Hier sind die Mitoseraten sehr

viel geringer als im Vitellarium. Daher war vermutet worden, dass die Sensitivität der zur Quantifizierung der DNA-Synthese verwendeten DAPI/BrdU-Technik (Knobloch et al., 2002a) nicht hoch genug war, um mögliche mitogene Effekte im Ovar nachzuweisen. Um einen möglichen Einfluss von Piceatannol auf die Morphologie der Reproduktionsorgane zu untersuchen, wurde eine Karminrot-Färbung Piceatannol-behandelter Schistosomen mit anschließender konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt.

### 3.12.1 *In vitro* - Behandlung von Schistosomen mit Piceatannol

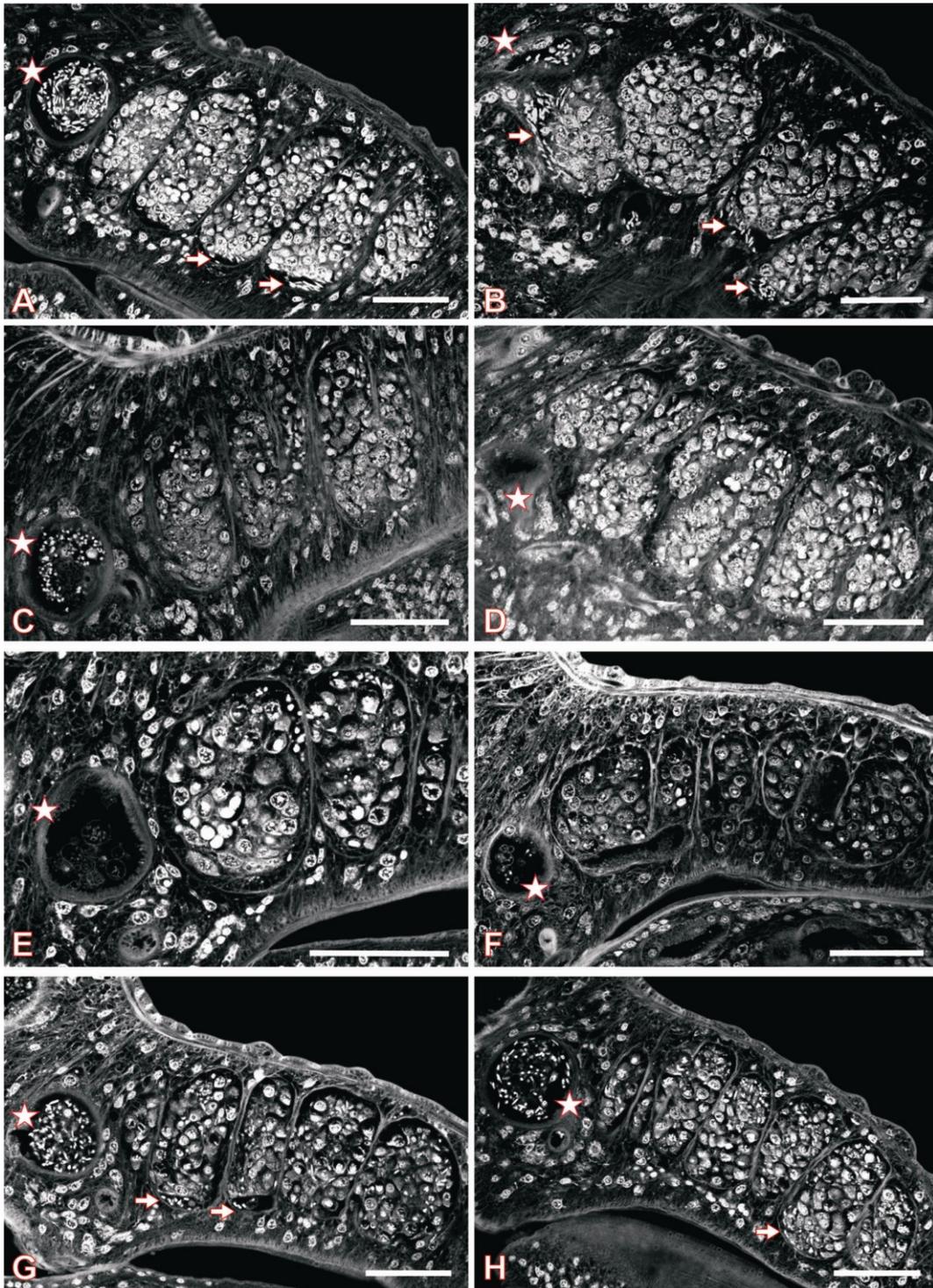
Der hydrophobe Inhibitor Piceatannol (Alexis Biochemicals) wurde zunächst in DMSO in einer Konzentration von 5 µg/µl gelöst. Die entsprechende Menge an gelöstem Piceatannol wurde in 1 ml Medium vor-verdünnt und dann zu der *in vitro* - Kultur gegeben, in der sich jeweils 20 - 30 Pärchen in 3 ml Medium befanden (Grevelding et al., 1997). Das Medium wurde täglich gewechselt, der Inhibitor frisch hinzugegeben, und die Vitalität sowie die Paarungsstabilität der Schistosomen kontrolliert.

Die Behandlung mit Piceatannol erfolgte in Konzentrationen von 35 µM und 70 µM. Als Kontrolle dienten Schistosomen, die über den gleichen Zeitraum mit DMSO, dem Lösungsmittel des Inhibitors, behandelt wurden. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass die beobachteten Effekte auf den eingesetzten Inhibitor und nicht auf DMSO zurückzuführen sind. Die Behandlung erfolgte über 144 Stunden (6 Tage). In diesem Zeitraum waren die behandelten Würmer vital, zeigten im Lichtmikroskop keine äußeren morphologischen Abnormalitäten, und auch Paarungen blieben über diesen Zeitraum erhalten.

### 3.12.2 Einfluss von Piceatannol auf gepaarte und entpaarte *S. mansoni*-Männchen

Gepaarte Schistosomen wurden für 6 Tage in der *in vitro* - Kultur mit Piceatannol behandelt. Die Behandlung startete einen Tag post Perfusion und erfolgte täglich mit dem Mediumwechsel. Alle ein bis zwei Tage wurden Pärchen aus der Kultur entnommen, entpaart und Männchen sowie Weibchen getrennt in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie.

Bei Männchen aus Schistosomen-Paaren, die für 0 - 24 Stunden mit 70 µM Piceatannol behandelt wurden, waren im ventralen Bereich der Testes sowie in der Samenblase eine Vielzahl von Spermien zu finden (Abbildungen 3.51 A, B). Nach 48 Stunden Behandlung befanden sich im ventralen Bereich der Testes keine Spermien mehr, während die Samenblase weiterhin gefüllt war (Abbildung 3.51 C).



**Abbildung 3.51:** Einfluss von Piceatannol auf gepaarte Schistosomen-Männchen

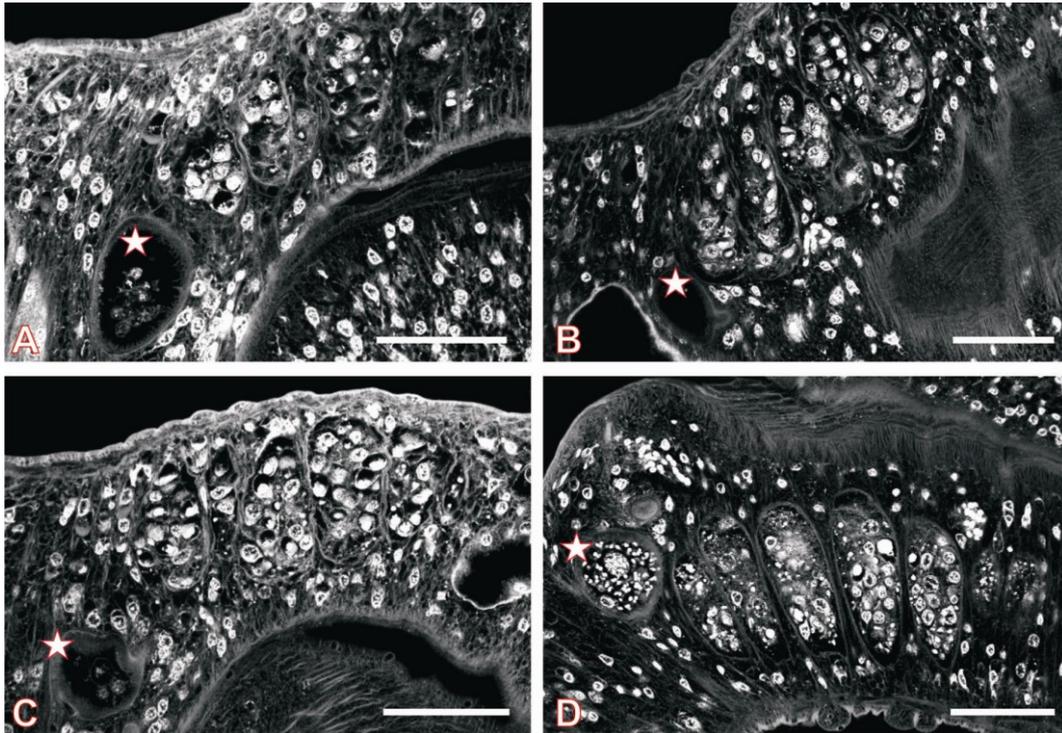
Adulte *S. mansoni*-Pärchen wurden für 120 Stunden mit 70 µM Piceatannol behandelt. Als Kontrolle dienten Pärchen, die mit der entsprechenden Menge an DMSO (Lösungsmittel des Inhibitors) behandelt wurden. Alle 24 Stunden wurden Pärchen entpaart, in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt. Die Auswertung der Männchen erfolgte am KLSM (Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus (Anregung 488 nm, Detektion 470 nm *long pass*). **A - F:** Testes von Männchen, die für 0 (**A**), 24 (**B**), 48 (**C**), 72 (**D**), 96 (**E**) bzw. 120 (**F**) Stunden mit 70 µM Piceatannol behandelt wurden. **G - H:** Testes von Männchen, die für 120 (**G**) bzw. 144 (**H**) Stunden mit DMSO behandelt wurden. *Scale bar:* 40 µm. Der Stern markiert die Samenblase im anterioren Bereich der Testes; der Pfeil markiert Spermien im ventralen Bereich der Testesloben. [anteriores Ende des Schistosomen-Männchens links, dorsal oben]

Nach 72 - 120 Stunden der Piceatannol-Behandlung waren weder im ventralen Bereich der Testes noch in der Samenblase Spermien sichtbar. Die Testesloben nahmen über den Behandlungszeitraum an Größe ab und waren weniger stark gefüllt mit undifferenzierten Spermatozyten. Die Samenblase enthielt anstelle reifer Spermien teils Spermatozyten (Abbildungen 3.51 D - F). Gepaarte Männchen, die über 120 bzw. 144 Stunden nur mit DMSO (Lösungsmittel des Inhibitors) behandelt wurden, zeigten diese Veränderungen nicht, so dass die beobachteten Effekte durch den Syk-Kinase Inhibitor Piceatannol bewirkt wurden. Bei den mit DMSO-behandelten Kontroll-Männchen befanden sich wie bei unbehandelten, gepaarten Männchen im ventralen Bereich der Testes Spermien, die in die Samenblase transportiert wurden, welche dadurch mit einer Vielzahl Spermien gefüllt war (Abbildungen 3.51 G - H).

Der Syk-Kinase Inhibitor Piceatannol führte somit nach  $\geq 72$  h in einer Konzentration von  $70 \mu\text{M}$  dazu, dass keine Spermien mehr in den Testes gepaarter Schistosomen-Männchen vorlagen. In geringerer Konzentration von  $35 \mu\text{M}$  trat dieser Effekt ebenfalls ein, jedoch erst  $\geq 144$  Stunden nach Beginn der Inhibitor-Behandlung. Ab diesem Zeitpunkt waren keine Spermien mehr detektierbar, und die Testesgröße und die Keimzellichte in den einzelnen Loben waren reduziert (Daten nicht dargestellt).

Der Effekt von Piceatannol auf die Testes konnte nicht nur für solche Männchen gezeigt werden, die während der Inhibitor-Behandlung gepaart waren, sondern ebenfalls für Männchen, die nach der Perfusion entpaart und anschließend ohne Weibchen in Kultur gehalten wurden (Abbildung 3.52). Nach 6 Tagen Behandlung mit Piceatannol wurden diese Männchen fixiert, mit Karminrot gefärbt und am konfokalen Lasermikroskop untersucht.

Nach 144 Stunden Behandlung mit Piceatannol in einer Konzentration von  $70 \mu\text{M}$  waren weder im ventralen Bereich der einzelnen Testesloben noch in der Samenblase Spermien zu erkennen. Die Samenblase enthielt stattdessen unreife Spermatozyten. Die Größe der Testes sowie deren Anzahl an Keimzellen (Spermatozyten) waren reduziert (Abbildungen 3.52 A - C). Männchen, die für 144 Stunden entpaart und unbehandelt waren, zeigten eine verminderte Testesgröße und eine Reduktion der Keimzellzahl in den Loben. Diese Veränderungen sind somit auch als ein Phänomen der Entpaarung vom Weibchen zu deuten. Die Samenblase dieser Kontroll-Männchen war jedoch im Gegensatz zu der Piceatannol-behandelter Männchen gefüllt mit Spermien (Abbildung 3.52 D). Die Reduktion der Anzahl an reifen Spermien durch Piceatannol war somit ein Inhibitor-spezifischer Effekt, der bei einer Entpaarung unbehandelter Kontrollen nicht auftrat.



**Abbildung 3.52:** Einfluss von Piceatannol auf entpaarte Schistosomen-Männchen

Adulte, entpaarte *S. mansoni*-Männchen wurden für 144 Stunden mit 70  $\mu\text{M}$  Piceatannol behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Männchen, die ebenfalls für 144 Stunden entpaart waren. Nach 144 Stunden wurden die Männchen in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt. Die Auswertung erfolgte am KLSM (Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus (Anregung 488 nm, Detektion 470 nm *long pass*). **A - C:** Testes von Männchen, die für 144 Stunden entpaart waren und in diesem Zeitraum mit 70  $\mu\text{M}$  Piceatannol behandelt wurden. **D:** Testes von unbehandelten Männchen nach 144 Stunden Entpaarung. *Scale bar:* 40  $\mu\text{m}$ . Der Stern markiert die Samenblase im anterioren Bereich der Testesloben. [anteriores Ende des Schistosomen-Männchens links, dorsal oben]

Die Reduktion der Testesgröße und der Keimzellzahl in den Testesloben trat somit bei Piceatannol-behandelten gepaarten sowie entpaarten Männchen, aber auch bei unbehandelten entpaarten Männchen auf. Bei unbehandelten gepaarten Männchen war dies nicht zu beobachten. Bei den Piceatannol-behandelten Männchen (ge- und entpaart) zeigte sich zudem ein deutliches Fehlen von reifen Spermien, was bei unbehandelten Männchen nicht zu beobachten war.

### 3.12.3 Einfluss von Piceatannol auf gepaarte und entpaarte *S. mansoni*-Weibchen

Die Effekte von Piceatannol auf Weibchen aus Schistosomen-Paaren sowie aus Entpaarungen wurden ebenfalls mittels Karminrot-Färbung und anschließender konfokaler Lasermikroskopie untersucht (Abbildungen 3.53 und 3.54). Der Fokus lag hier auf der Morphologie des Ovars, da die bislang einzige in *S. mansoni* bekannte Syk-Kinase SmTK4 im Ovar des Weibchens exprimiert wird (Knobloch et al., 2002b).

Das Ovar maturer, unbehandelter *S. mansoni*-Weibchen lässt sich in drei Bereiche einteilen. Im anterioren Bereich befinden sich ausschließlich kleine, unreife Oocyten mit Stammzellcharakter (Oogonien). Im zentralen Bereich ist ein Übergang zwischen kleinen unreifen, und an Volumen zunehmenden, reifenden Oocyten. Im posterioren Bereich des Ovars befinden sich ausschließlich große, reife Oocyten, die durch einen großen dunklen Nukleus und einen kleinen leuchtenden Nukleolus deutlich zu erkennen sind (Abbildung 3.53 A). Posterior des Ovars befindet sich das *Receptaculum seminis*, das mit Spermien des Männchens gefüllt ist (Abbildung 3.53 A). Im anterior des Ovars gelegen Ootyp wird ein Schistosomen-Ei aus mehreren Vitellocyten und einer reifen Oocyte zusammengesetzt (Abbildungen 3.53 B, F). Die Vitellocyten und die Oocyte werden über den Vitellodukt bzw. den Ovidukt in den Ootyp transportiert.

Nach einem Behandlungszeitraum gepaarter Weibchen von 24 - 48 Stunden mit 70 µM Piceatannol waren, mit Ausnahme einer leichten Zunahme an reifen Oocyten innerhalb des Ovars, keine deutlichen Veränderungen des Ovars oder des Ootyps zu beobachten. Im Ootyp fand weiterhin der Zusammenbau von Eiern statt (Abbildungen 3.53 D, F), was mit der Beobachtung übereinstimmte, dass die behandelten Weibchen in der *in vitro*-Kultur in diesen Zeitraum weiterhin Eier legten. Das *Receptaculum seminis* war in diesen Weibchen gefüllt mit Spermien (Abbildungen 3.53 C, E). Nach 72 - 96 Stunden der Piceatannol-Behandlung war der Großteil des Ovars mit reifen Oocyten angefüllt. Im anterioren Bereich des Ovars, in dem sich bei unbehandelten Weibchen fast ausschließlich junge, unreife Oocyten befanden, waren jetzt auch vermehrt mature Oocyten vorhanden. Im *Receptaculum seminis* waren nur wenige Spermien nachweisbar und der Ootyp enthielt fast keine Zellen (Abbildungen 3.53 G - I). Nach 120 Stunden hielt diese Entwicklung weiterhin an (Abbildungen 3.53 J, K). Das Ovar enthielt hauptsächlich reife Oocyten. Einzelne Oocyten waren im Ovidukt nahe des posterioren Bereiches des Ovars nachzuweisen (Abbildung 3.53 J) und wurden somit vermutlich weiterhin zum Ootyp transportiert, wenngleich im Ootyp der untersuchten Weibchen nur Vitellocyten detektiert werden konnten (Abbildung 3.53 K). Das Vitellarium der Piceatannol-behandelten Weibchen wies über den Behandlungszeitraum keine erkennbaren Unterschiede in der Morphologie zu dem von Kontroll-Weibchen auf und schien somit morphologisch durch den Inhibitor nicht beeinflusst zu werden (nicht abgebildet).

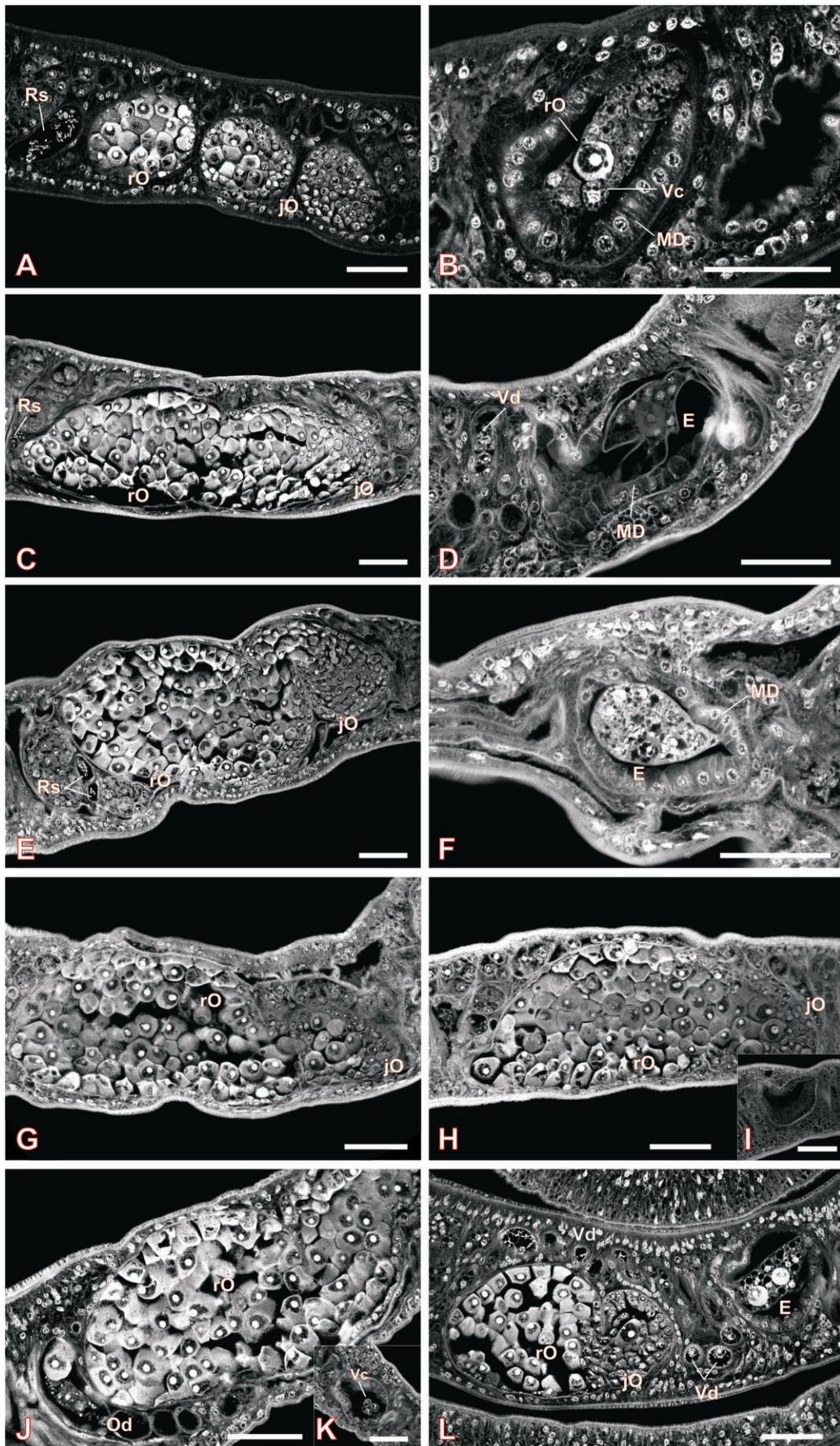


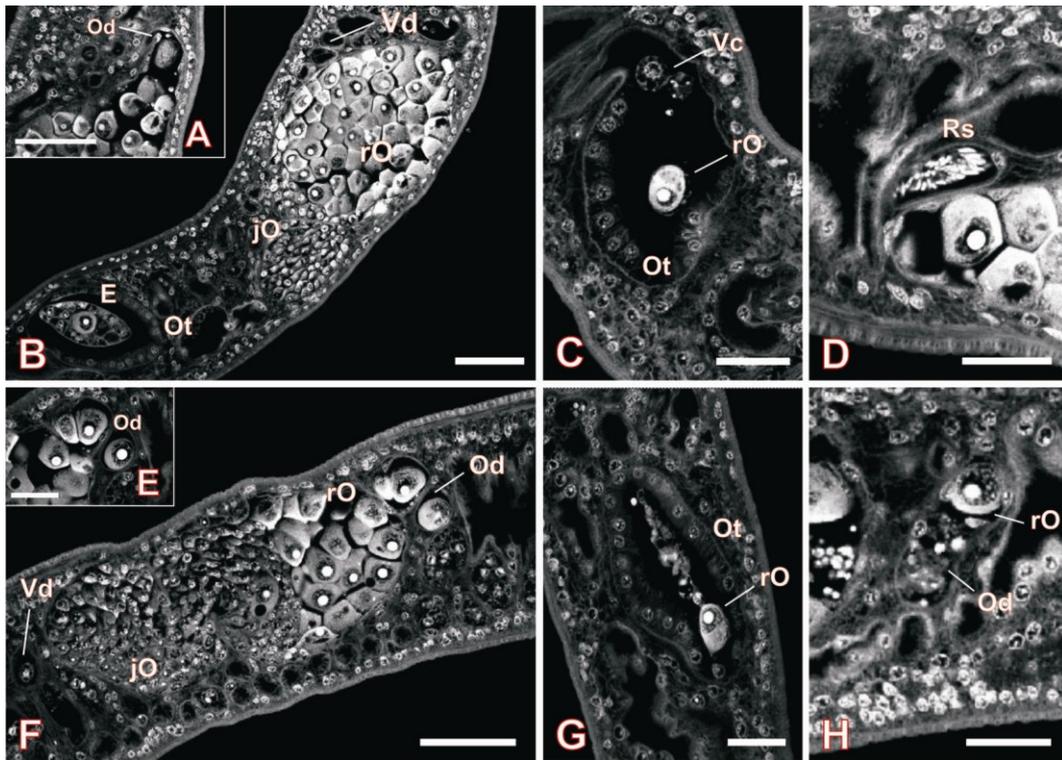
Abbildung 3.53: Einfluss von Piceatannol auf gepaarte Schistosomen-Weibchen

Adulte *S. mansoni*-Pärchen wurden für 120 Stunden mit 70  $\mu$ M Piceatannol behandelt. Als Kontrolle dienten Pärchen, die mit der entsprechenden Menge an DMSO behandelt wurden. Alle 24 Stunden wurden Pärchen entpaart, in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt. Die Auswertung der Weibchen erfolgte am KLSM (Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus (Anregung 488 nm, Detektion 470 nm *long pass*). **A - B**: 0 Stunden Piceatannol, Ovar (A) und Ootyp (B). **C - D**: 24 Stunden Piceatannol, Ovar (C) und Ootyp (D). **E - F**: 48 Stunden Piceatannol, Ovar (E) und Ootyp (F). **G**: 72 Stunden Piceatannol, Ovar. **H - I**: 96 Stunden Piceatannol, Ovar (H) und Ootyp (I). **J - K**: 120 Stunden Piceatannol, Ovar (J) und Ootyp (K). **L**: 144 Stunden DMSO, Ovar und Ootyp. *Scale bar*: 40  $\mu$ m. E: Ei; jO: junge, unreife Oocyten; MD: Mehlsche Drüsen; Od: Ovidukt; rO: reife Oocyten; Rs: *Receptaculum seminis*; Vc: Vitellocyten; Vd: Vitelloid. [anteriores Ende des Schistosomen-Weibchens rechts]

Kontroll-Weibchen, die für 144 Stunden nur mit DMSO (Lösungsmittel des Inhibitors) behandelt wurden, zeigten den für unbehandelte Weibchen typischen Aufbau des Ovars mit unreifen Oocyten im anterioren und reifen Oocyten im posterioren Bereich. Der Ootyp enthielt ein aus Vitellocyten und Oocyten zusammengesetztes Ei (Abbildung 3.53 L). Diese Beobachtungen belegten die Spezifität der zuvor beschriebenen durch den Inhibitor hervorgerufenen Effekte.

Während der Behandlung der Pärchen mit dem Syk-Kinase-Inhibitor Piceatannol war im Vergleich zu den DMSO-behandelten Pärchen nach drei Tagen eine Reduktion der Eiproduktion zu beobachten, die mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen konform ist.

Am Tag der Perfusion entpaarte und nachfolgend in Abwesenheit von Männchen kultivierte Weibchen, die ebenfalls für 6 Tage mit 70  $\mu$ M Piceatannol behandelt wurden, zeigten morphologische Veränderungen im Ovar. Die Anzahl an reifen Oocyten im Ovar behandelter Weibchen (Abbildung 3.54 B) war im Vergleich zu den Kontroll-Weibchen (Abbildung 3.54 F) erhöht. Wie bei den unbehandelten (Abbildungen 3.54 E - H) konnten bei den behandelten Weibchen reife Oocyten im Ovidukt und im Ootyp nachgewiesen werden (Abbildungen 3.54 A - C). Das *Receptaculum seminis* der entpaarten Weibchen enthielt nach 6 Tagen der Entpaarung noch Spermien (Abbildung 3.54 D).



**Abbildung 3.54:** Einfluss von Piceatannol auf entpaarte Schistosomen-Weibchen

Adulte, entpaarte Schistosomen-Weibchen wurden für 144 Stunden mit 70  $\mu\text{M}$  Piceatannol behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Weibchen, die ebenfalls für 144 Stunden entpaart waren. Nach 144 Stunden wurden die Weibchen in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt. Die Auswertung erfolgte am KLSM (Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus (Anregung 488 nm, Detektion 470 nm *long pass*). **A - D:** Weibchen, die für 144 Stunden entpaart waren und in diesem Zeitraum mit 70  $\mu\text{M}$  Piceatannol behandelt wurden. **E - H:** Unbehandelte Weibchen nach 144 Stunden Entpaarung. *Scale bar:* 40  $\mu\text{m}$  bzw. 20  $\mu\text{m}$  (A, E). jO: junge, unreife Oocyten; Od: Ovidukt; Ot: Ootyp; rO: reife Oocyten; Rs: *Receptaculum seminis*; Vc: Vitellocyten.

Die Behandlung adulter *S. mansoni*-Weibchen mit dem Syk-Kinase-Inhibitor Piceatannol führte bei gepaarten aber auch bei entpaarten Weibchen zu Veränderungen im Ovar, da der Anteil an reifen Oocyten im Vergleich zu Kontroll-Weibchen erhöht war.

### 3.13 RNAi zur Inhibition von SmTK4

Die Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen mit einem Syk-Kinase-spezifischen Inhibitor führte zu deutlichen Effekten in den Testes und im Ovar (vgl. Abschnitt 3.12). Um zu beweisen, dass diese Effekte spezifisch auf SmTK4 zurückzuführen sind, wurden Versuche zur Inhibition dieser Tyrosinkinase über RNA-Interferenz (RNAi) unternommen.

Die Suppression eines Gens auf posttranskriptioneller Ebene mittels doppelsträngiger RNAs (RNAi) wurde in den letzten Jahren für prä-adulte Stadien von Schistosomen (Schistosomulae) über *soaking* oder Elektroporation erfolgreich angewandt (Skelly et al., 2003; Boyle et al., 2003; Correnti & Pearce, 2004; Correnti et al., 2005; Correnti et al., 2007; Morales et al., 2007b). Für adulte Schistosomen konnte diese Methode jedoch erst kürzlich etabliert werden (Ndegwa et al., 2007). Die dsRNAs können durch die Zugabe zu dem Kulturmedium über *soaking* in Adulte eingebracht werden. Durch Elektroporation in dsRNA-haltigem Puffer werden jedoch stärkere Effekte erreicht. Die dsRNAs führen in Form längerer Moleküle wie auch in Form der kürzeren siRNAs zu einer Supprimierung des Zielgens (Ndegwa et al., 2007). Bisher wurde die RNAi-Technik bei adulten Schistosomen nur für tegumental und gastrodermal exprimierte Gene erfolgreich eingesetzt (Alkalische Phosphatase (SmAP), Ndegwa et al., 2007; Cystein Protease Cathepsin B (SmCB1), Krautz-Peterson et al., 2007). Eine Reduzierung der Transkripte von SmTK4, die im Ovar und den Testes exprimiert wird, setzt voraus, dass über diese Methode auch tiefere Gewebe erreicht werden können.

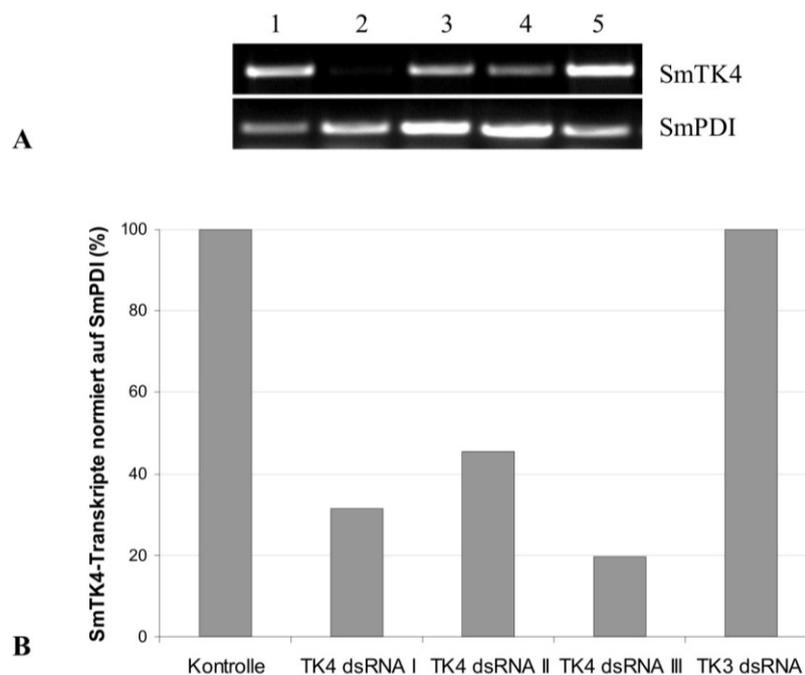
#### 3.13.1 *In vitro* - Behandlung von Schistosomen-Pärchen mit TK4-dsRNA

Für eine Inhibition von SmTK4 über RNAi wurden dsRNAs synthetisiert, die spezifisch gegen die Tandem-SH2-Domäne dieser Syk-Kinase gerichtet waren. Hierfür wurden zunächst einzelsträngige RNAs (ssRNA) *in vitro* transkribiert und anschließend zu doppelsträngiger RNA (dsRNA) hybridisiert. Um die dsRNAs in *S. mansoni*-Pärchen einbringen zu können, wurde eine Kombination aus *soaking* und Elektroporation verwendet. In drei verschiedenen Versuchen wurden jeweils 10 Pärchen von *S. mansoni* mit je 25 µg der TK4-SH2SH2-dsRNAs elektroporiert, anschließend in dsRNA-haltigem Medium für drei Tage und dann für drei weitere Tage in dsRNA-freiem Medium *in vitro* kultiviert. Als Kontrolle wurden Pärchen ohne dsRNAs elektroporiert. Um die Spezifität der Inhibition belegen zu können, wurden weitere Pärchen mit dsRNAs elektroporiert, die spezifisch gegen die *unique site* der Src-Kinase SmTK3 gerichtet waren und somit keine Kreuzreaktionen mit

mRNAs anderer Tyrosinkinasen zeigen sollten. Sechs Tage post Elektroporation wurde ein Teil der Pärchen für molekulare Analysen eingesetzt und die verbliebenen Pärchen mit Karminrot gefärbt sowie mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht.

### 3.13.2 Molekulare und mikroskopische Analyse TK4-dsRNA-behandelter Pärchen

Für eine Untersuchung der SmTK4-Transkriptmengen der elektroporierten Pärchen wurde Total-RNA isoliert und als *template* für eine reverse Transkription (SensiScript, Qiagen) mit einem Oligo(d)T-Primer eingesetzt. Ein Aliquot der resultierenden cDNA diente als *template* für die sich anschließende PCR mit dem Primerpaar TK4-linker-Sub3-5’/-3’. Für eine semiquantitative Abschätzung der Transkriptmengen wurde eine weitere PCR mit der gleichen cDNA und unter gleichen Reaktionsbedingungen mit Primern durchgeführt, die gegen Transkripte des *housekeeping*-Gens SmPDI gerichtet waren (PDI-5’/-3’; Abbildung 3.55 A).



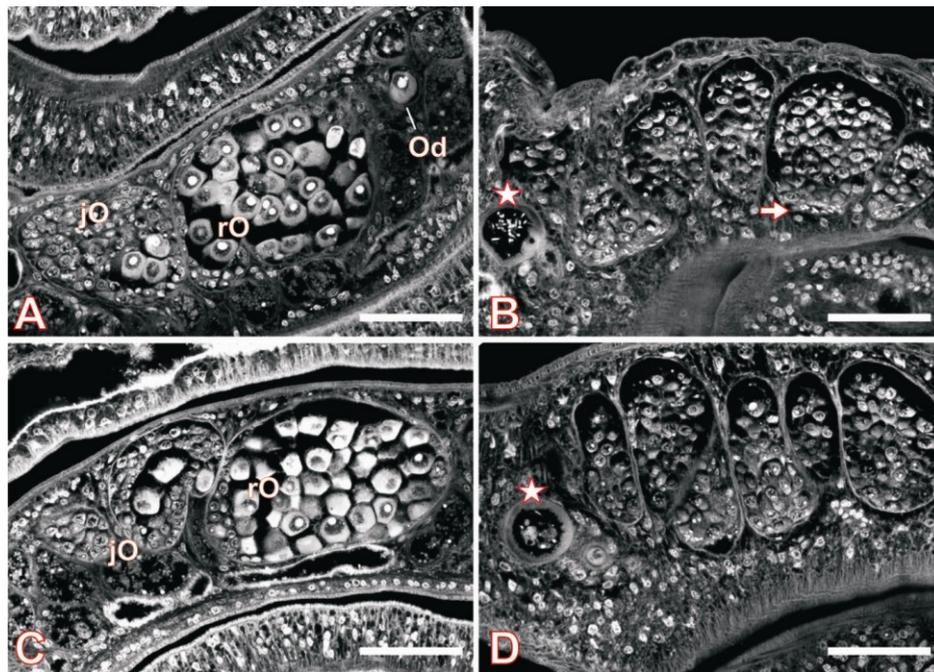
**Abbildung 3.55:** Semiquantitative RT-PCR-Analysen TK4-SH2SH2-dsRNA-behandelter Pärchen

**A:** RT-PCR-Analysen zum Nachweis von SmTK4-Transkripten (oben) und SmPDI-Transkripten (unten). Amplifikationsprodukte aus den RT-PCRs mit Total-RNA als *template* aus **1**: Pärchen, die ohne dsRNAs elektroporiert wurden; **2 - 4**: TK4-SH2SH2-dsRNA-behandelten Pärchen (n = 3). **5**: SmTK3-dsRNA-behandelten Pärchen. **B:** Vergleichende densitometrische Analyse (ImageJ) der PCR-Amplifikate (Reihenfolge wie in A).

Über die vergleichende RT-PCR und anschließende densitometrische Analyse der Amplifikate (Abbildung 3.55 B) konnte gezeigt werden, dass die Menge an SmTK4-

Transkripten nur in den Würmern signifikant reduziert war, die mit SmTK4-SH2SH2-dsRNAs behandelt wurden. In Würmern der Kontrollgruppe, die ohne dsRNAs oder mit SmTK3-dsRNAs behandelt wurden, zeigte sich keine Reduktion der SmTK4-Transkripte, was den spezifischen RNAi-Effekt der eingesetzten TK4-SH2SH2-dsRNAs belegte. In diesen Versuchen zur Inhibition von SmTK4 über RNAi konnte das SmTK4-Expressionsniveau auf 19 - 45% reduziert werden (Abbildung 3.55 B). Diese Reduktion der SmTK4-Transkripte nach Elektroporation mit SmTK4-dsRNAs zeigte, dass das Protokoll von Ndegwa et al. (2007) bei Adulten erfolgreich angewandt werden konnte.

Die mikroskopische Analyse der TK4-SH2SH2-dsRNA-behandelten und mit Karminrot gefärbten Pärchen am konfokalen Lasermikroskop zeigte schließlich morphologische Effekte in den Reproduktionsorganen, die qualitativ mit denen vergleichbar waren, welche nach der Behandlung mit Piceatannol beobachtet wurden (Abbildung 3.56; vgl. auch Abschnitt 3.12).



**Abbildung 3.56:** *S. mansoni*-Pärchen nach Behandlung mit TK4-SH2SH2-dsRNA

Adulte *S. mansoni*-Pärchen wurden mit TK4-SH2SH2-dsRNAs elektroporiert und für sechs Tage (144 Stunden) in der *in vitro* - Kultur gehalten. Als Kontrollen dienten Pärchen, die ohne dsRNAs elektroporiert und ebenfalls in Kultur gehalten wurden. Nach 144 Stunden wurden die Pärchen in AFA fixiert und mit Karminrot gefärbt. Die Auswertung erfolgte am KLSM (Leica TSC SP2) im Reflektions-Modus (Anregung 488 nm, Detektion 470 nm *long pass*). **A:** Kontroll-Weibchen. **B:** Kontroll-Männchen. **C:** Weibchen, 144 Stunden nach Elektroporation mit TK4-SH2SH2-dsRNA. **D:** Männchen, 144 Stunden nach Elektroporation mit TK4-SH2SH2-dsRNA. *Scale bar:* 40  $\mu$ m. jO: junge, unreife Oocyten; Od: Ovidukt; ro: reife Oocyten. Der Stern markiert die Samenblase im anterioren Bereich der Testesloben; der Pfeil markiert Spermien im ventralen Bereich der Testesloben. [anteriores Schistosomen-Ende links, dorsal oben]

Bei den mit SmTK4-SH2SH2-dsRNAs elektroporierten Weibchen war ein Effekt im Ovar feststellbar. Die Anzahl an maturen Oocyten war größer und die an immaturen Oocyten kleiner (Abbildung 3.56 C), wenn auch nicht in dem Maße wie nach der Behandlung mit Piceatannol. Bei den Männchen hingegen stellte sich in den Testes ein Effekt dar, der qualitativ und quantitativ dem einer Piceatannol-Behandlung entsprach. In den mit TK4-SH2SH2-dsRNAs elektroporierten Männchen waren die Spermien deutlich reduziert (Abbildung 3.56 D). Auch zeigte sich, dass anstelle reifer Spermien teils unreife Spermatocyten in der Samenblase vorlagen. Pärchen, die ohne dsRNAs (Abbildungen 3.56 A, B) oder mit SmTK3-dsRNAs (nicht gezeigt) behandelt und über den gleichen Zeitraum in Kultur gehalten wurden, wiesen diese Effekte nicht auf, was die Spezifität der zuvor beschriebenen Resultate belegt.

Die Ergebnisse der molekularen und mikroskopischen Analysen der TK4-SH2SH2-dsRNA-behandelten Pärchen zeigte, dass es gelungen war, SmTK4 im Ovar und in den Testes adulter Schistosomen posttranskriptionell supprimieren zu können was zu deutlichen Effekten in diesen Organen führte. Das von Ndegwa et al. (2007) für tegumental exprimierte Gene etablierte Protokoll konnte somit erfolgreich auch für ein in den Reproduktionsorganen exprimiertes Gen angewandt werden. Folglich eignet sich diese Methode auch für gewebespezifische RNAi-Versuche in tiefer gelegenen Schichten.

### 3.14 Transgene Schistosomen - Analyse des SmAct1-Promotors

Im Zusammenhang mit der Transformation von Schistosomen ist es wünschenswert, über konstitutiv aktive Promotoren zu verfügen, d.h. solche, die in Larven sowie in Adulten und in einer Vielzahl von verschiedenen Geweben aktiv sind. Diese würden die Möglichkeit einer ektopische Expression von Genen schaffen. Ein potentieller Kandidat für einen konstitutiv aktiven Promotor war die 5'-Region des Aktin-Gens SmAct1, da im Vorfeld über RT-PCR-Analysen gezeigt wurde, das SmAct1 sowohl in Adulten beider Geschlechter als auch in den freilebenden Larvenstadien (Miracidien und Cercarien) exprimiert wird (Busek et al., 2002; Knobloch et al., 2002b; El Bahay, 2003). Die SmAct1-5'-Region wurde kloniert, *in silico* charakterisiert und auf ihre Promotoraktivität über Particle Bombardment-Experimente mit adulten und larvalen Schistosomen überprüft.

#### 3.14.1 Identifizierung und Klonierung der regulatorischen Regionen des SmAct1-Gens

Ausgangspunkt für die Identifizierung und Klonierung verschiedener Fragmente der 5'-Region des SmAct1-Gens waren 170 bp der 5'-UTR, die zusammen mit der kodierenden Sequenz dieses Gens identifiziert worden waren (Oliveira & Kemp, 1995). Das 170 bp-Fragment wurde über eine PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert (Wippersteg, 2002). Eine erste Sequenzanalyse zeigte, dass innerhalb dieses kurzen Bereiches bereits potentiell wichtige Promotorelemente vorhanden waren (vgl. Abschnitt 3.14.2). Von der Aktin-3'-UTR wurde ein 370 bp langer Sequenzabschnitt mittels PCR amplifiziert, welcher das Poly-Adenylierungs-Signal beinhaltete und als Terminator in Transformationsvektoren dienen sollte (Wippersteg, 2002). Da aus Homologievergleichen zu anderen Aktingenen zu vermuten war, dass oberhalb der ersten 170 bp noch weitere regulatorische Elemente vorhanden sind, wurde die Sequenz der SmAct1-5'-Region mit Hilfe des *genome walkings* verlängert. Als Grundlage hierfür dienten sog. *genome walker libraries*, die aus Restriktionsfragmenten genomischer *S. mansoni*-DNA bestehen, welche mit Adaptern versehen wurden. Diese Pools Adapter-ligierter DNA-Fragmente dienten als *templates* für PCR-Reaktionen, bei denen ein Adapter-spezifischer Primer sowie ein Primer eingesetzt wurden, der gegen den bekannten Bereich der SmAct1-5'-UTR gerichtet war. In den PCRs wurden 400 - 500 bp große Amplifikationsprodukte erhalten, die kloniert und schließlich sequenziert wurden. Die Auswertung der Sequenzen zeigte, dass dieser Ansatz zu der Identifizierung von 445 bp der SmAct1-5'-Region führte, die weitere potentielle Promotorelemente enthielt (El Bahay, 2003). Da regulatorische Promotorelemente auch in größerem Abstand zum Transkriptions-

start vorliegen können, wurde die SmAct1-5'-Region mittels sogenannter *shot gun reads* aus den *S. mansoni* - Genomdaten *in silico* weiter verlängert (shisto8235f11.p1k, SMBK116TR M13 Rev end of clone SMBK116, SNEI709TF M13 For end of clone SNEI709, SMEHB42TR M13 Rev end of clone SMEHB42, shisto3946c04.q1k, SMDRE22TR M13 Rev end of clone SMDRE22, SNCDH09TF M13 For end of clone SNCDH09, SNDOW80TF M13 For end of clone SNDOW80, SMDO131TR M13 Rev end of clone SMDO131, shisto7687h09.p1k; www.sanger.ac.uk). Überlappende Abschnitte der Sequenzen wurden *in silico* zusammengesetzt, was in einer 3002 bp lagen putativen 5'-Region des SmAct1-Gens resultierte (Accession number: AM422832). Von diesen 3002 bp wurden drei verschieden lange Fragmente über PCRs mit den Primerpaaren Act<sub>500</sub>-5'/Act<sub>500</sub>-3' (445 bp), Act<sub>1000</sub>-5'/Act<sub>500</sub>-3' (1024 bp) und Act<sub>1500</sub>-5'/Act<sub>500</sub>-3' (1491 bp) amplifiziert. Die PCRs erfolgten mit je 250 ng genomischer DNA aus *S. mansoni*-Pärchen als *template*. Erhaltene Amplifikationsprodukte der erwarteten Größen wurden in den Klonierungsvektor pDrive kloniert und sequenziert (Act<sub>500</sub>, Act<sub>1000</sub>, Act<sub>1500</sub>).

Eine andere Version der 5'-Region des SmAct1-Gens wurde in einer parallel durchgeführten Arbeit von Correnti et al. (2007) unabhängig kloniert und ein ca. 1500 bp langer Subklon (Act3-luc pGL3basic) freundlicher Weise von Prof. Dr. E. Pearce (Universität von Pennsylvania) zur Verfügung gestellt. Datenbankanalysen beider 5'-Regionen zeigten höchste Homologie zu der 5'-Region von SmAct1. Eine vergleichende Analyse (ClustalW) beider 5'-Sequenzen mit einem genomischen Klon aus der *S. mansoni*-Datenbank (Contig 0014791) offenbarte eine Reihe von Unterschieden (vgl. Anhang 5.6). Die beiden 5'-Regionen aus den Laboren von Pearce und Grevelding zeigen untereinander 51 Nukleotidunterschiede. Die 5'-Region aus dem Labor von Pearce weist 14 Nukleotidunterschiede zu der Contig-Sequenz auf, von denen 10 in den ersten 200 bp oberhalb des Startcodons liegen. Die in unserem Labor klonierte 5'-Region zeigt hingegen 41 Nukleotidvariationen im Vergleich zu der Contig-Sequenz. Von diesen liegen nur drei in Regionen, für die potentielle Promotorelemente vorhergesagt wurden (vgl. Abschnitt 3.14.2 und Anhang 5.6).

Um untersuchen zu können, ob beide alternativen 5'-Fragmente Promotorfunktion besitzen, und ob die identifizierten Punktmutationen möglicherweise einen Einfluss auf die potentielle Promotoraktivität besitzen, wurden ebenfalls drei Subfragmente der 5'-Region aus dem Labor von Pearce subkloniert. Diese Fragmente hatten eine äquivalente Größe zu den drei ursprünglich subklonierten 5'-Bereichen aus unserem Labor. Die drei Subfragmente wurden über PCRs mit den Primerkombinationen Act1-5'/Act-3', Act2-5'/Act-3' und

Act3-5'/Act-3' sowie dem Plasmid Act3-luc pGL3basic als *template* amplifiziert und in den Klonierungsvektor pDrive kloniert (Act1, Act2 und Act3).

### 3.14.2 Sequenzanalyse der 5'-Region des SmAct1-Gens

Die etwa 3 kb lange, genomische SmAct1-5'-Region aus unserem Labor wurde auf konservierte Transkriptionsfaktor-Bindestellen über das Programm MatInspector untersucht, welches auf der Transkriptionsfaktor-Datenbank TRANSFEC basiert (Quandt et al., 1995; Heinemeyer et al., 1999). Die *core similarity* wurde auf 100% eingestellt und die *matrix similarity* optimiert, um eine hohe Übereinstimmung der identifizierten Elemente mit der Konsensussequenz sicher zu stellen. Innerhalb der SmAct1-5'-Region konnten verschiedene putative Promotorelemente identifiziert werden, die nachfolgend tabellarisch aufgelistet sind (Tabelle 3.12).

**Tabelle 3.12:** Spezifizierungen und Positionen der Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die in der 3002 bp langen 5'-Region des SmAct1-Gens identifiziert wurden

Regulatorisches Element	Relative Position (ATG: +1)	Beschreibung
E-Box	- 23	Bindestelle für einen <i>basic helix-loop-helix</i> (bHLH) Transkriptionsfaktor wie Myo-D
TATA-Box	- 35	Kern-Promotorelement, involviert in der Festlegung des Transkriptionsstarts
CArg-Box	- 70	Bindestelle für einen <i>serum response factor</i> ; involviert in Muskel-spezifische Genexpression
CAAT-Box	- 83, -154, - 178, - 1450, - 2220	Ubiquitäres, cis-agierendes Promotor-Element
CEBP-Element	- 118, - 812	Bindestelle für ein CAAT <i>enhancer-binding protein</i> , einen <i>basic leucin-zipper</i> Transkriptionsfaktor
S8-Element	- 351	Bindestelle für ein S8-Homöobox-Protein
GATA-Box	- 825, - 1143, - 2986	Bindestelle für ein GATA-Zinkfingerprotein, häufig involviert in Zelldifferenzierung
STAT-Element	- 963, - 1328, - 1844, - 2690	Bindestelle für Proteine der STAT-Familie, cytoplasmatische Transkriptionsfaktoren die in den Kern gelangen und Genexpression als Antwort auf eine Cytokin- oder Wachstumsfaktor-Stimulation regulieren
CDP-Element	- 1295	Bindestelle für ein CAAT <i>displacement protein</i> , einen Transkriptionsrepressor

Von Oliveira und Kemp (1995) wurden bereits eine CAAT-Box (Position - 83), gefolgt von einer CArG-Box (Position - 70) sowie einer TATA- und E-Box (Positionen - 35 und - 23) postuliert. In der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analyse konnten vier weitere CAAT-Boxen identifiziert werden (Positionen - 154, - 187, - 1450 und - 2220). Die CAAT-Box an Position - 83 zeigt einen Nukleotidunterschied zu der Konsensussequenz, während die weiteren CAAT-Boxen mit der *core*-Sequenz vollständig und mit der *matrix*-Sequenz zu 72 - 100% übereinstimmen. In der Nähe der CAAT-Box an Position - 83 wurde eine Bindestelle für ein CAAT *enhancer protein* (CEBP) an Position - 118 identifiziert, dessen Sequenz 100% mit der *core*- und 96% mit der *matrix*-Sequenz übereinstimmt. Ein weiteres CEBP-Element wurde an Position - 812 gefunden, das einen Nukleotidunterschied zu der Konsensussequenz aufweist. Eine Bindestelle für ein S8-Homöodomänen-Protein ist an Position - 351 lokalisiert, die eine Übereinstimmung von 100% mit der *core*- und von 99% mit der *matrix*-Sequenz aufweist. Weiterhin wurden drei GATA-Elemente gefunden (Positionen - 825, - 1143 und - 2986), die vollständig mit der Konsensussequenz übereinstimmen. Weiter 5'-wärts liegen vier putative Erkennungsstellen für STAT-Faktoren (*signal transducers and activators of transcription*; Positionen - 963, - 1328, - 1844 und - 2690), die eine Übereinstimmung von 100% mit der *core*-Sequenz zeigen. Zusätzlich zu diesen potentiell Transkriptions-aktivierenden Elementen wurde eine mögliche Bindestelle für ein CAAT *displacement protein* (CDP) identifiziert (Position - 1295), welches als Transkriptionsrepressor agieren kann (Nepveu, 2001).

### 3.14.3 Klonierung der SmAct1-Transformationsvektoren

Um die Funktion der verschiedenen 5'-Regionen des SmAct1-Gens (Grevelding, Pearce) untersuchen zu können, wurden Transformationsvektoren mit GFP als Reportergen konstruiert. Ursprünglich wurde das GFP-Gen flankiert von einem 170 bp langen 5'-Fragment des SmAct1-Gens (Grevelding) und dem Aktin-3'-Terminator (in pBlueskriptII SSK-) (Wippersteg, 2002). In einem ersten Test auf Promotoraktivität wurde das Act<sub>170</sub>-GFP-Act-Konstrukt für die Transformation adulter Männchen eingesetzt. Nach dem Particle Bombardment zeigte sich in der konfokalen Mikroskopie nur sehr schwache Reportergenaktivität im Bereich des Teguments (Wippersteg, 2002). Aus diesem Grund wurden die verlängerten SmAct1-5'-Bereiche kloniert und für weitere Vektorkonstruktionen verwendet. Hierfür wurde das Act<sub>170</sub>-5'-Fragment gegen die 5'-Fragmente Act<sub>500</sub>, Act<sub>1000</sub> und Act<sub>1500</sub> (Grevelding) ausgetauscht, die verschiedene Kombinationen der putativ wichtigsten regulatorischen Elemente beinhalten (siehe auch Tabelle 3.12). Weitere Konstrukte wurden

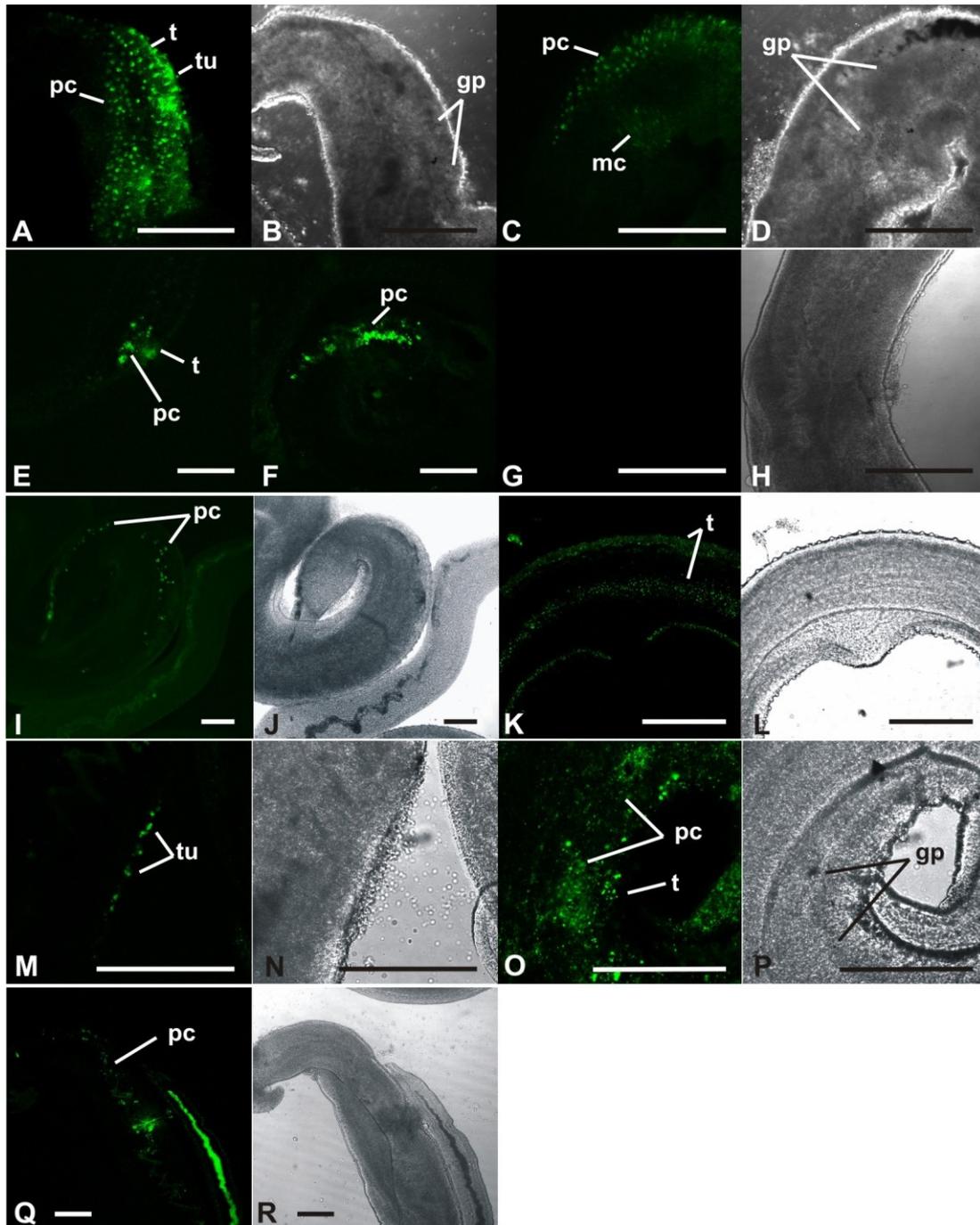
mit den alternativen 5'-Fragmenten Act1, Act2 und Act3 (Pearce) und dem Aktin-3'-Terminator kloniert. Der Austausch der 5'-Bereiche erfolgte jeweils über die Restriktionsschnittstellen *SacII* und *NcoI* und resultierte in den Transformationsvektoren Act<sub>500</sub>-GFP-Act, Act<sub>1000</sub>-GFP-Act, Act<sub>1500</sub>-GFP-Act bzw. Act1-GFP-Act, Act2-GFP-Act und Act3-GFP-Act.

#### 3.14.4 Particle Bombardment adulter und larvaler Schistosomen

Die erstellten Vektoren wurden für Transformationen adulter Männchen sowie Muttersporocysten eingesetzt, um so die unterschiedlichen 5'-Bereiche des SmAct1-Gens auf Promotoraktivität in verschiedenen Geweben und Stadien untersuchen zu können. Für das Particle Bombardment wurden Männchen verwendet, die über multisexuelle Infektionen erzeugt und anschließend vom Weibchen entpaart wurden. Muttersporocysten wurden über die *in vitro* - Transformation von Miracidien erhalten (vgl. Kapitel 2.2.1.4).

Das Particle Bombardment adulter Schistosomen-Männchen erfolgte mit einem Gasdruck von 1550 bzw. 1800 psi. Die lichtmikroskopische Untersuchung der beschossenen Männchen zeigte eine breite Verteilung der Goldpartikel im Tegument und weiteren Geweben im Inneren des Wurms. Nach dem Beschuss mit dem Act<sub>500</sub>-GFP-Act-Vektor fanden sich in konfokal-mikroskopischen Untersuchungen variierende Level von GFP-Fluoreszenz in den Männchen. Starke Signale wurden im Tegument einschließlich der Tuberkel beobachtet. Diese Bereiche korrelierten mit dem Auftreten der meisten Goldpartikel. Mittlere Level von Fluoreszenz wurden in Zellen des Parenchyms und der Muskeln detektiert (Abbildungen 3.57 A - D). Männchen, die mit den elongierten Promotor-Konstrukten Act<sub>1000</sub>-GFP-Act und Act<sub>1500</sub>-GFP-Act beschossen wurden, zeigten ebenfalls starke GFP-Fluoreszenz-Signale im Tegument und den Tuberkeln, die mit der Lokalisation der Goldpartikeln korrelierten. Schwächere Fluoreszenz wurde in Teilen des Parenchyms detektiert (Abbildungen 3.57 E, F).

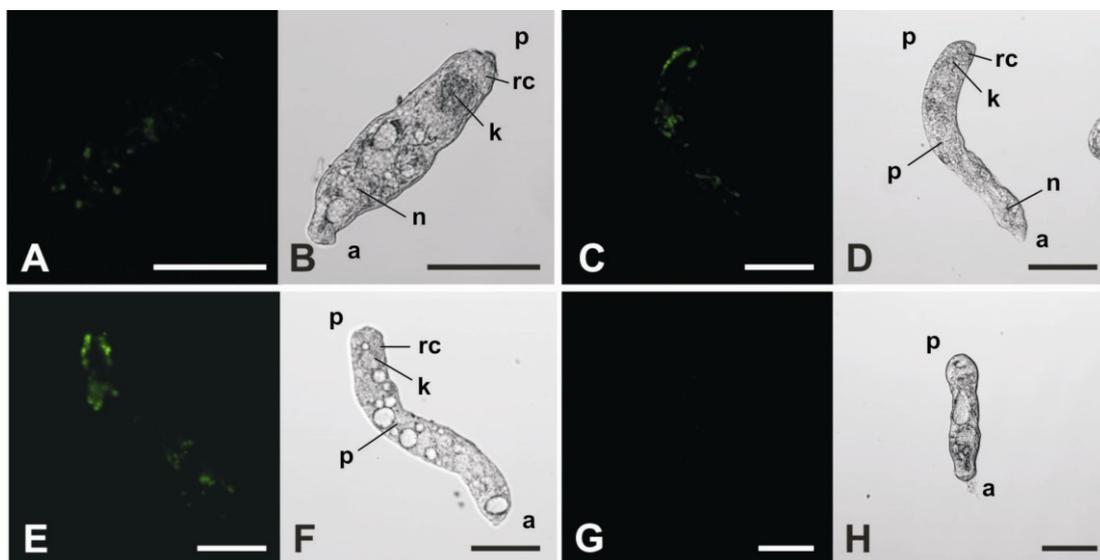
Analoge Experimente mit den Konstrukten Act1-GFP-Act, Act2-GFP-Act und Act3-GFP-Act lieferten vergleichbare Resultate. Bei den entsprechenden Männchen wurde ebenfalls GFP-Fluoreszenz in weiten Bereichen des Teguments einschließlich der Tuberkel sowie in parenchymatischen Zellen detektiert (Abbildungen 3.57 I - R). Sowohl zwischen den SmAct1-Promotorversionen aus den Laboren von Grevelding und Pearce als auch zwischen den Größenvarianten innerhalb der Versionen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Intensität oder Gewebeverteilung der GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Männchen, die mit Goldpartikeln ohne DNA-Beladung beschossen wurden, zeigten keine GFP-Signale (Kontrolle; Abbildungen 3.57 G, H).



**Abbildung 3.57:** Ergebnisse der konfokalen Lasermikroskopie und Lichtmikroskopie adulter *S. mansoni*-Männchen, die mit Aktin-GFP-Konstrukten transformiert waren

Männchen von *S. mansoni* wurden mit folgenden Aktin-Promotor-GFP-Reporter-Gen-Konstrukten mittels Particle Bombardment transformiert: **A - D:** Act<sub>500</sub>-GFP-Act (1550 psi); **E:** Act<sub>1000</sub>-GFP-Act (1800 psi); **F:** Act<sub>1500</sub>-GFP-Act (1800 psi); **G - H:** Kontrolle (nur Gold, 1550 psi); **I - L:** Act1-GFP-Act (I und J 1550 psi; K und L 1800 psi); **M - P:** Act2-GFP-Act (M, N 1550 psi; O, P 1800 psi); **Q - R:** Act3-GFP-Act (1800 psi). gp: Goldpartikel, mc: Muskelzellen, pc: Parenchym-Zellen, t: Tegument, tu: Tuberkel. *Scale bar:* 200 µm.

Neben adulten Männchen wurden auch Muttersporocysten mittels Particle Bombardment bei 1300 psi mit den Konstrukten Act<sub>500</sub>-, Act<sub>1000</sub>- und Act<sub>1500</sub>-GFP-Act transformiert und GFP-Fluoreszenzsignale mittels konfokaler Lasermikroskopie detektiert. Fluoreszenz wurde in parenchymatischen Zellen und den *Ridge Cytons* beobachtet (Abbildungen 3.58 A - F). In der neuralen Masse am anterioren Ende oder den Keimzellen am posterioren Ende wurden keine klaren Signale gefunden. Muttersporocysten, die mit Gold ohne DNA-Beladung beschossen wurden, zeigten keine GFP-bedingten Fluoreszenzsignale (Kontrolle; Abbildungen 3.58 G, H).



**Abbildung 3.58:** Ergebnisse der konfokalen Lasermikroskopie und Lichtmikroskopie von Muttersporocysten, die mit Aktin-GFP-Konstrukten transformiert waren

Muttersporocysten von *S. mansoni* wurden mit folgenden Aktin-Promotor-GFP-Reportergen Konstrukten mittels Particle Bombardment transformiert (1300 psi): **A - B:** Act<sub>500</sub>-GFP-Act; **C - D:** Act<sub>1000</sub>-GFP-Act; **E - F:** Act<sub>1500</sub>-GFP-Act; **G - H:** Kontrolle (nur Gold). k: Keimzellen, n: neurale Masse, p: Parenchym, rc: *Ridge Cytons*. Scale bar: 20 µm. [a: anterior, p: posterior]

Die Ergebnisse alle Particle Bombardment-Experimente, welche unter Verwendung der verschiedenen Aktin-Promotor-GFP-Konstrukte erhalten wurden, sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst.

Um die Präsenz der Act-GFP-Act-Transformationsvektoren und die Transkription des Reportergens auf molekularer Ebene nachzuweisen, wurden PCR- und RT-PCR-Analysen mit isolierter DNA und RNA aus den transformierten Schistosomen und GFP-spezifischen Primern (GFP-5'/-3') durchgeführt. Hierbei wurden Amplifikationsprodukte der erwarteten Größe (PCR) und äquivalenter Intensitäten (RT-PCR) erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt).

**Tabelle 3.13:** Zusammenfassung der Reporter-gen-Analyse der 5'-Region des SmAct1-Gens  
 [Stärke der Signale: +++: stark, ++: mittel, +: schwach, -: keine, n.u.: nicht untersucht]

Konstrukt	Promotorlänge (bp)	Adulte			Sporocysten
		Tegument	Parenchym	Muskeln	GFP-Expression
Act <sub>100</sub> -GFP-Act	170	+	-	-	n.u.
Act <sub>500</sub> -GFP-Act	445	+++	++	++	+
Act <sub>1000</sub> -GFP-Act	1024	+++	+(+)	-	+
Act <sub>1500</sub> -GFP-Act	1491	+++	+(+)	-	+
Act1-GFP-Act	509	++	+(+)	-	n.u.
Act2-GFP-Act	997	++	+(+)	-	n.u.
Act3-GFP-Act	1481	++	+(+)	-	n.u.

Die Ergebnisse der SmAct1-Promotor-Analysen und der Particle Bombardment-Experimente mit den Aktin-Promotor-GFP-Konstrukten sind bereits publiziert (Beckmann et al., 2007).

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Aufklärung der SmTK4-Signalkaskade

Schistosomen zeigen eine im Tierreich nahezu einmalige Reproduktionsbiologie, bei der die sexuelle Maturation des Weibchens von einem dauerhaften Paarungskontakt mit dem Männchen abhängt (Erasmus, 1973). Für dieses Phänomen sind molekulare Kommunikationsprozesse zwischen beiden Geschlechtern erforderlich (Kunz, 2001). Diese umfassen vermutlich auch Signaltransduktionsprozesse, um das vom Männchen ausgehende Signal zu den Reproduktionsorganen des Weibchens zu transduzieren und hier Proliferations- und Differenzierungsprozesse zu initiieren. Die Identifizierung der Signalkaskade(n) und der daran beteiligten Moleküle ist ein wichtiger Aspekt bei der Aufklärung der molekularen Grundlagen der Männchen-Weibchen-Interaktion. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Signalmoleküle in Schistosomen identifiziert und charakterisiert, darunter auch verschiedene cytoplasmatische Tyrosinkinasen (Kapp et al., 2001; Knobloch et al., 2002b; Kapp et al., 2004). Diese Moleküle sind in diversen Organismen an der Regulation von zellulären Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt (Thomas & Brugge, 1997), Prozesse, die bei *S. mansoni* zur paarungsabhängigen Ausdifferenzierung der Reproduktionsorgane im Weibchen führen.

Eine der identifizierten Tyrosinkinasen ist die Syk-Kinase SmTK4, die im Ovar des Weibchens und den Testes des Männchens von *S. mansoni* exprimiert wird (Knobloch et al., 2002b). Für sie wurde aufgrund der Expression in diesen Organen neben weiteren Funktionen auch eine Rolle bei der Differenzierung von Oocyten oder Spermien und damit eine Beteiligung an der Reproduktion der Schistosomen postuliert. Eine Möglichkeit, einer genaueren Funktionsanalyse von SmTK4 ist die Identifizierung von weiteren, interagierenden Signaltransduktionsmolekülen. Da Signalkaskaden innerhalb des Tierreichs sowohl strukturell als auch funktionell hoch konserviert sind, könnten solche Interaktionspartner Hinweise auf SmTK4-vermittelte Signalkaskaden geben und damit auch funktionelle Rückschlüsse zulassen.

Eine Suche nach SmTK4-Interaktionspartnern über ein Yeast Three-Hybrid Screening mit der SmTK4-Tandem-SH2-Domäne als *bait*-Protein unter der zusätzlichen Expression der SmTK3-TK-Domäne führte zur Identifizierung der Src-Kinase SmTK6. Des Weiteren wurde eine Interaktion von SmTK4 mit der Src-Kinase SmTK3 nachgewiesen (Beckmann, 2005).

Über *in situ* - Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass SmTK6 im Ovar des Weibchens sowie in den Testes des Männchens exprimiert wird (Beckmann, 2005). Die Src-Kinase SmTK3 wird ebenfalls überwiegend im Ovar und den Testes, aber auch im Vitellarium adulter Schistosomen exprimiert (Kapp et al., 2004). Die Co-Lokalisation der Expression von SmTK4 mit SmTK6 und SmTK3 in den Reproduktionsorganen Ovar und Testes war eine zusätzliche Bekräftigung ihrer im Yeast Two-Hybrid System detektierten Interaktionen.

#### 4.1.1 Verifizierung der Interaktion zwischen SmTK4 und SmTK6

Um die Interaktion zwischen den beiden zellulären Tyrosinkinase SmTK4 und SmTK6 biochemisch zu verifizieren, wurden Co-Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1). Da weder gegen SmTK4 noch gegen SmTK6 spezifische Antikörper zur Verfügung standen, wurde ein System ausgewählt, das es erlaubt, Proteine fusioniert mit einem Aminosäuresequenz-Motiv (Tag) zu exprimieren, gegen das kommerzielle Antikörper erhältlich sind. Für die Co-Immunopräzipitation wurden die Protein-Interaktionsdomänen von SmTK4 (Tandem-SH2-Domäne) fusioniert mit einem FLAG-Tag sowie die Vollängensequenz von SmTK6 fusioniert mit einem c-Myc-Tag in Hefezellen co-exprimiert. Die Expression beider Proteine stand unter der Kontrolle eines GAL-Promotors und konnte durch die Zugabe von Galaktose als Kohlenstoffquelle zu dem Medium induziert werden.

Vor Beginn der Co-Immunopräzipitationsexperimente wurde die Expression der FLAG-SmTK4-Tandem-SH2-Domäne sowie der c-Myc-SmTK6 in dem Proteinlysate einer Galaktose-induzierten Kultur über einen Immunoblot mit einem anti-FLAG- bzw. anti-c-Myc-Antikörper nachgewiesen (vgl. Abbildung 3.2). Nach erfolgten Immunopräzipitationen mit den Tag-spezifischen Antikörpern wurden die gebundenen Proteine auf eine Membran transferiert. Eine Protein-Anfärbung zeigte zwei prominente Proteine mit einem den Erwartungen entsprechendem Molekulargewicht der Fusionsproteine. Über einen anti-FLAG- bzw. einen anti-c-Myc-Antikörper konnte im anschließenden Immunoblot bestätigt werden, dass es sich bei diesen Banden tatsächlich um die FLAG-SmTK4-Tandem-SH2-Domäne sowie um die c-Myc-SmTK6 handelte (vgl. Abbildung 3.4). Beide Proteine lagen in dem Proteinlysate somit in Form eines Komplexes vor und konnten daher gemeinsam präzipitiert werden. Die Interaktion zwischen der Syk-Kinase SmTK4 und der Src-Kinase SmTK6, die zuvor im Yeast Two-Hybrid System detektiert und analysiert worden war (Beckmann, 2005), wurde über die durchgeführten Co-Immunopräzipitationsexperimente verifiziert.

Um die *in vivo* - Interaktion beider Tyrosinkinassen in *S. mansoni* analysieren zu können, müssten *pull down* - Assays mit Proteinlysaten aus *S. mansoni* durchgeführt werden. Hierbei würde die endogene (aus Proteinlysaten aufgereinigte) oder eine rekombinant exprimierte SmTK4 bzw. SmTK6 über einen spezifischen Antikörper an eine immobile Protein A-Sepharose-Phase gekoppelt werden. Bei einer Inkubation mit Schistosomen-Proteinlysat müsste der entsprechende Interaktionspartner binden und über einen ebenfalls spezifischen Antikörper nachzuweisen sein. Voraussetzung für derartige Experimente sind jedoch Antikörper gegen SmTK4 und SmTK6, die noch nicht zur Verfügung stehen (vgl. Abschnitt 4.4).

#### 4.1.2 Identifizierung von *upstream* - SmTK6-Interaktionspartnern

Zur weiteren Aufklärung des SmTK4- / SmTK6-Signalwegs, an dem auch SmTK3 beteiligt sein könnte, wurde ein Yeast Two-Hybrid Screening mit der SH2-Domäne von SmTK6 durchgeführt. Die SH2-Domäne wurde als *bait*-Protein verwendet, da Src-Kinasen über ihre SH2-Domänen an Tyrosinreste in *upstream*-Interaktionspartnern binden (Thomas & Brugge, 1997).

Eine Einschränkung des Yeast Two-Hybrid Systems ist das Fehlen posttranslationaler Protein-Modifikationen, wie beispielsweise die gezielte Phosphorylierungen von Tyrosinresten (van Crielinge & Beyaert, 1999). Bislang ist für Hefen keine spezifische Tyrosinkinase-Aktivität beschrieben worden. Hefen modifizieren Tyrosinreste in Proteinen nur zufällig durch eigene unspezifische Kinasen (Ptacek et al., 2005). Um diese Limitierung umgehen zu können, wurde ein Yeast Three-Hybrid System verwendet, mit dem Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden können, die abhängig sind von posttranslationalen Modifikationen (Osborne et al., 1995; Zhang & Lautar, 1996). In diesem System wird neben dem *bait*- und dem *prey*-Protein ein drittes Protein in den Hefen exprimiert, in diesem Fall eine schistosomale Tyrosinkinase. Dies führt allgemein zum Anstieg des Phosphorylierungsgrades intrazellulärer Proteine und damit auch zur Phosphorylierung potentieller Interaktionspartner, ein für die Interaktion wichtiger Faktor, da Phosphotyrosine hoch affine Bindestellen für SH2-Domänen darstellen. Hierdurch können putative Interaktionen begünstigt oder erst ermöglicht werden (Osborne et al., 1995). Für die Suche nach *upstream*-Interaktionspartnern der Src-Kinase SmTK6 fand das Screening daher mit der SH2-Domäne als *bait*-Protein und unter der zusätzlichen Expression der SmTK3-Tyrosinkinase-Domäne statt. Die zusätzliche Expression einer Tyrosinkinase-Domäne für die Suche nach Bindungspartnern von

SH2-Domänenproteinen war bereits in anderen und unserer Arbeitsgruppe erfolgreich (Wang et al., 2001; Philipp, 2004; Beckmann, 2005).

Vor dem eigentlichen Screening wurde zunächst die Funktionalität der erstellten *bait*-Konstrukte in Hefen überprüft. Die Expression der SmTK6-SH2-Domäne sowie der SmTK3-TK-Domäne konnte auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen und eine autonome Aktivierung der Reportergene durch das *bait*-Protein ausgeschlossen werden (vgl. Kapitel 3.2.2).

Das Screening mit der SmTK6-SH2-Domäne unter der zusätzlichen Expression der SmTK3-TK-Domäne wurde zweimal durchgeführt und resultierte in 14 bzw. 62 Klonen, die ein positives Wachstum auf den Selektionsplatten zeigten. Durch einen  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay konnte diese Zahl potentieller Interaktionspartner auf 7 bzw. 29 reduziert werden. Aus diesen Klonen wurden die *prey*-Plasmide, deren Inserts für die potentiellen Interaktionspartner kodierten, isoliert. Da in Hefeklonen aus einem Yeast Two-Hybrid Screening die *prey*-Plasmide gegenüber den *bait*-Plasmiden stark unterrepräsentiert vorliegen, ist dieser Schritt kritisch. Insgesamt gelang es dennoch, aus 4 der 7 bzw. aus 21 der 29 Klone die *prey*-Plasmide zu isolieren. Durch die Retransformation der einzelnen *prey*-Plasmide zusammen mit dem *bait*-Plasmid wurden die Interaktionen verifiziert. Die Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner erfolgte durch Sequenzierung der in den *prey*-Plasmiden enthaltenen Inserts und anschließender BlastX-Analyse der Sequenzen. Über die beiden Yeast Three-Hybrid Screenings konnten verschiedene Moleküle als potentielle Bindungspartner von SmTK6 identifiziert werden (vgl. Tabellen 3.2 und 3.3, Kapitel 3.2.3.3), auf die in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen wird.

#### 4.1.2.1 Ein Mucin-Homolog als Interaktionspartner von SmTK6

Von den 25 sequenzierten Klonen kodierten insgesamt 14 für ein Protein mit Homologie zu Mucinen, das damit der am häufigsten in den beiden Screenings gefundene Interaktionspartner von SmTK6 war. Bei allen 14 Klonen handelte es sich um unterschiedlich lange Partialsequenzen des gleichen Moleküls. Diese Partialsequenzen wurden mit Hilfe der *S. mansoni* - Sequenzdaten ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk), [www.tigr.org](http://www.tigr.org)) erweitert und hierdurch die vollständige cDNA-Sequenz von 9.261 bp identifiziert (CDS 29294.m000039), die für ein Protein von 3.086 AS kodiert (vgl. Anhang 5.7), welches hohe Homologie zu Mucinen aus verschiedenen Organismen besitzt.

In *S. mansoni* wurden zuvor zwei Mucine identifiziert (Menrath et al., 1995; Roger et al., 2007), die beide homolog, aber nicht identisch zu dem als Interaktionspartner von SmTK6

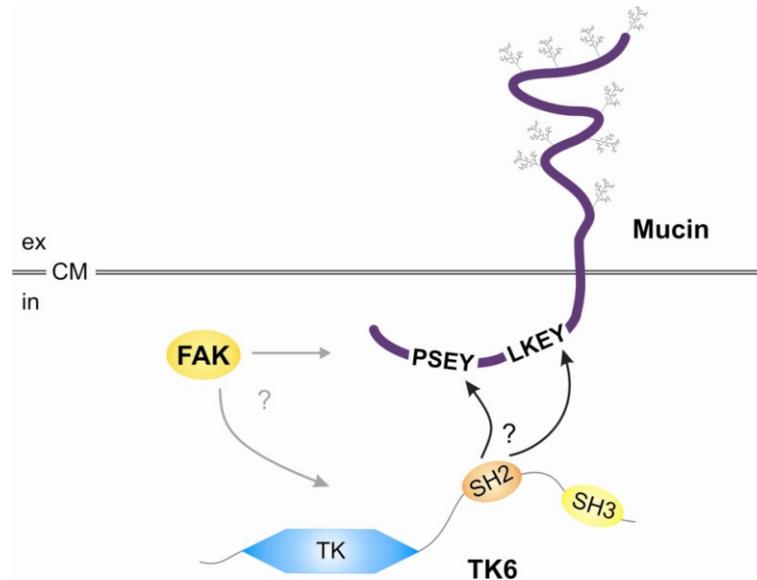
identifiziertem Mucin-homologen Protein sind. Die erste Partialsequenz eines Mucins, das spezifisch nur in Weibchen exprimiert wird, wurde von Menrath et al. (1995) identifiziert. Lokalisationsstudien zeigten eine spezifische Expression in Geweben, die den weiblichen Reproduktionstrakt umgeben, nahe seinem Übergang in den Ootyp. Für dieses Mucin wurde postuliert, dass es den Reproduktionstrakt auskleidet, hier eine schützende Schicht bildet und möglicherweise eine frühzeitige Ausbildung der Eischale verhindern soll (Menrath et al., 1995). Des Weiteren ist eine Gruppe von hoch polymorphen Mucinen beschrieben worden, die innerhalb sowie zwischen verschiedenen *S. mansoni* - Stämmen große Unterschiede aufweisen. Diese Mucine wurden daher als „*S. mansoni* polymorphic mucins“ (SmPoMuc) bezeichnet (Roger et al., 2007).

Mucine sind hochmolekulare, stark glycosylierte Oberflächenproteine die von epithelialen Geweben exprimiert werden (Hollingsworth & Swanson, 2004). Man unterscheidet zwischen sekretierten Mucinen, die in den extrazellulären Raum abgegeben werden und Transmembran-Mucinen, die eine einzelne Transmembrandomäne und unterschiedlich lange, intrazelluläre C-Termini aufweisen. Sekretierte Mucine bilden eine schützende Schicht auf Epithelien des respiratorischen, gastrointestinalen sowie des Reproduktionstraktes (Hollingsworth & Swanson, 2004). Transmembran-Mucine sind hingegen an Signaltransduktionsprozessen beteiligt, die durch biochemische Veränderungen der Umgebung initiiert werden und zu Konformationsänderungen ihrer extrazellulären Domäne führen. Durch eine direkte Bindung von Liganden an die extrazelluläre Domäne oder durch Interaktionen mit Rezeptoren für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren können Mucin-Signalkaskaden ebenfalls ausgelöst werden (Singh & Hollingsworth, 2006). Nach Perzeption eines entsprechenden Signals kommt es intrazellulär zu posttranslationalen Modifikationen wie der Phosphorylierung des Mucin-C-Terminus (Singh & Hollingsworth, 2006). Der cytoplasmatische Teil des am besten charakterisierten transmembranen Mucins MUC1 ist in verschiedene Signalwege involviert, u.a. durch die Interaktion mit Tyrosinkinasen (Singh & Hollingsworth, 2006). Src-Kinasen können über ihre SH3-Domäne an den C-Terminus von MUC1 binden und den Tyrosinrest innerhalb des Aminosäuresequenzmotivs YEKV phosphorylieren. Im phosphorylierten Zustand wird dieser dann direkt von der SH2-Domäne der Src-Kinase gebunden (Li et al., 2001; Al Masri & Gendler, 2005). Wie Src-Kinasen können auch zelluläre Tyrosinkinasen der Abl-Familie an den intrazellulären Bereich von transmembranen Mucinen binden (Raina et al., 2006). Nach Bindung phosphorylieren sie einen Tyrosinrest innerhalb eines YXXP-Motivs (X: beliebige Aminosäure), das C-terminal des YEKV-Motivs (Bindestelle der Src-SH2-Domäne) liegt.

Das phosphorylierte Tyrosin innerhalb des YXXP-Motivs dient dann wiederum als Bindestelle für die SH2-Domäne der Abl-Kinase (Raina et al., 2006).

Der C-Terminus von MUC1 ist zudem mit der FAK (*focal adhesion kinase*) assoziiert, einem Src-Substrat und zentralem Molekül in Integrin-vermittelten Signalwegen (vgl. Abschnitt 4.2.3). Es wird angenommen, dass durch die Interaktion der FAK mit dem C-Terminus des transmembranen Mucins die Rekrutierung einer Src-Kinase zu der Zell-Peripherie unterstützt wird, was die Interaktion mit ihren Substraten (beispielsweise FAK) verstärkt oder erst ermöglicht. Durch das Zusammenspiel von Mucinen mit Rezeptor-Tyrosinkinasen und anderen Signalmolekülen werden Signalwege initiiert, die letztlich zu zellulären Prozessen wie z. Bsp. auch Proliferationen führen (Singh & Hollingsworth, 2006).

Bei dem als Interaktionspartner von SmTK6 identifizierten Mucin handelt es sich vermutlich um ein transmembranes Mucin mit einer Transmembran-Helix im Bereich der Aminosäuren 2435 - 2453 (Orientierung: N-Terminus extrazellulär, C-Terminus intrazellulär), wie *in silico* - Analysen der Sequenz belegen (TMPred; Hofmann & Stoffel, 1993). Innerhalb des intrazellulär lokalisierten C-Terminus konnte eine Sequenzabfolge identifiziert werden (YEKL; Aminosäuren 2914 - 2917; vgl. Anhang 5.7), die mit Ausnahme der letzten Aminosäure mit dem YEKV-Motiv übereinstimmt, das als Bindestelle für Src-Kinasen beschrieben ist (Singh & Hollingsworth, 2006). In der Sequenz des Mucin-Homologs aus *S. mansoni* befindet sich anstelle eines Valins (V) ein Leucin (L). Da es sich in beiden Fällen um aliphatische, neutrale Aminosäuren handelt, die sich nur um eine CH<sub>2</sub>-Gruppe in der Länge ihrer Seitenkette unterscheiden, hat dieser konservative Aminosäureaustausch funktionell vermutlich keine Bedeutung. Das in *S. mansoni* identifizierte, Transmembran-Mucin enthält somit das Aminosäuresequenzmotiv, an das SH2-Domänen von Src-Kinasen binden können. Das YEKL-Motiv ist in den Mucin-Partialsequenzen der isolierten *prey*-Plasmide vorhanden und damit potentiell für die Interaktion mit der SmTK6-SH2-Domäne verantwortlich. C-terminal dieses Motivs liegt in dem intrazellulären Bereich des transmembranen Mucins ein Aminosäuresequenzmotiv (YESP, Aminosäuren 3016 - 3019; vgl. Anhang 5.7), das mit der Konsensussequenz YXXP übereinstimmt (Raina et al., 2006) und damit eine potentielle Bindestelle für die SH2-Domäne einer Abl-Kinase darstellt. Auch dieses Motiv ist in den Mucin-Partialsequenzen der *prey*-Plasmide vorhanden. Da SmTK6 Sequenzanalysen und phylogenetischen Untersuchungen zufolge auch Ähnlichkeiten zu Abl-Kinasen aufweist (Beckmann, 2005), sind beide Bindungen der SmTK6-SH2-Domäne an den Mucin-C-Terminus denkbar (vgl. Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1:** Modell zur Interaktion von SmTK6 und dem transmembranen Mucin

Aus den Ergebnissen des Yeast Two-Hybrid Screenings sowie aus Kenntnissen aus anderen Organismen wurde dieses hypothetische Modell zur SmTK6-Mucin-Interaktion erstellt. SmTK6 bindet über ihre SH2-Domäne an das YEKL- oder YESP-Motiv im intrazellulären C-Terminus des transmembranen Mucins. Durch die Interaktion einer FAK mit dem Mucin-C-Terminus könnte SmTK6 möglicherweise zur Plasmamembran rekrutiert werden. Die FAK wäre ihrerseits ein potentielles Substrat für SmTK6 (nähere Erläuterungen siehe Text). [CM: Cytoplasmamembran, ex: extrazellulär, in: intrazellulär]

Unabhängig davon, an welches der beiden Motive im Mucin-C-Terminus die SH2-Domäne von SmTK6 gebunden hat, war die Hefe-eigene, unspezifische Phosphorylierung ausreichend, um den Tyrosinrest innerhalb des Motivs zu phosphorylieren und so die Bindung zu ermöglichen. Durch die zusätzliche Expression der SmTK3-TK-Domäne konnte die Interaktion nur leicht verstärkt werden (vgl. Abbildung 3.8, Kapitel 3.2.3.5). Möglicherweise könnte sich die Expression der zugehörigen, spezifischen SmTK6-TK-Domäne verstärkend auf die Bindung auswirken. *In vivo* kommt es nach Bindung der SH3-Domäne an den Mucin-C-Terminus durch die Kinase-eigene, katalytische Domäne zur Phosphorylierung eines spezifischen Tyrosinrestes, der anschließend von der eigenen SH2-Domäne gebunden wird (Li et al., 2001; Raina et al., 2006). In folgenden Yeast Three-Hybrid Analysen könnte daher untersucht werden, ob sich die Expression der SmTK6-TK-Domäne im Vergleich zu der SmTK3-TK-Domäne verstärkend auf die Bindung auswirkt. Über gezielte Bindungsanalysen mit mutagenisierten Mucin-C-Termini (YEKL- bzw. YESP-Deletionsmutanten) könnte zudem geklärt werden, welches Motiv für die Bindung der SmTK6-SH2-Domäne verantwortlich ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten

auch einen weiteren Hinweis auf die Klassifizierung von SmTK6 als Src- oder Abl-Kinase geben, die Übereinstimmungen sowie Unterschiede zu beiden Kinase-Familien aufweist.

Da Interaktionen zwischen den intrazellulären C-Termini von Transmembran-Mucinen und den SH2-Domänen von Src-/Abl-Kinasen beschrieben sind und die für die *prey*-Proteine kodierenden Sequenzen die für diese Bindung verantwortlichen Motive aufweisen (YEKL, YESP), ist die Interaktion von SmTK6 mit dem identifizierten Mucin-Homolog aus *S. mansoni* als spezifisch anzusehen.

#### 4.1.2.2 Die Src-Kinase SmTK3 als Interaktionspartner von SmTK6

Der zweit-häufigste identifizierte Interaktionspartner von SmTK6 war die bereits bekannte Src-Kinase SmTK3 aus *S. mansoni* (Kapp et al., 2004). Insgesamt kodierten die Inserts von drei der sequenzierten *prey*-Plasmide für diese Tyrosinkinase und umfassten jeweils deren vollständige Sequenz.

Die Interaktion zwischen SmTK6 und SmTK3 war deutlich stärker als die Interaktion zwischen SmTK6 und dem Mucin-Homolog. Die Interaktion der beiden Src-Kinasen ist zudem Phosphorylierungs-abhängig, wie durch die Expression der SmTK3-TK-Domäne und einer damit verbundenen zusätzlichen Tyrosin-Phosphorylierung innerhalb der Hefen gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 3.8, Kapitel 3.2.3.5).

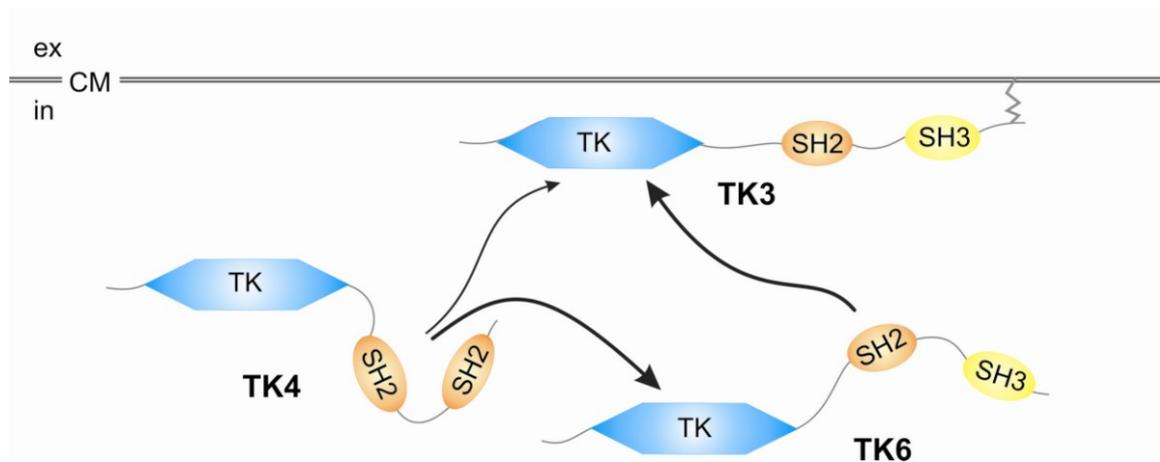
Neben der Expression im Vitellarium wird SmTK3 in Übereinstimmung mit SmTK6 und SmTK4 gewebespezifisch auch im Ovar und den Testes exprimiert (Knobloch et al., 2002b; Kapp et al., 2004; Beckmann, 2005). Daher ist es denkbar, dass diese drei Kinasen in Schistosomen in Form eines Komplexes vorliegen (vgl. Abschnitt 4.1.3).

#### 4.1.2.3 Weitere Bindungspartner von SmTK6

Die Sequenzierung der Inserts der verbliebenen *prey*-Plasmide zeigte, dass diese für sehr unterschiedliche Proteine kodierten, die jeweils nur einmal in diesem Screening identifiziert wurden. Sie besaßen Homologie zu dem Hämprotein Cytochrom p450, dem Motorprotein Dynein, zu Prefoldin  $\alpha$ , das an Proteinfaltungen beteiligt ist, sowie zu dem *Drosophila*-Protein Disc-large. Diese Proteine wurden als falsch-positive Interaktionspartner eingestuft, da sie nachweislich in Yeast Two-Hybrid Screenings unspezifische Bindungen mit einer Vielzahl verschiedener *bait*-Proteine eingehen ([www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html](http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html)). Zudem sind Interaktionen von Src-Kinasen mit diesen Molekülen in der Literatur bislang nicht beschrieben (USCD - Nature Signaling Gateway).

#### 4.1.3 SmTK4, SmTK6 und SmTK3 - Bestandteile eines Kinasekomplexes?

Nachdem als Interaktionspartner von SmTK4 und SmTK6 jeweils SmTK3 identifiziert wurde und SmTK6 ein *upstream*-Bindungspartner von SmTK4 ist, liegt die Vermutung nahe, dass diese drei zellulären Tyrosinkinasen im Ovar und den Testes von *S. mansoni* in Form eines Multi-Kinasekomplexes vorliegen (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2:** Modell zur möglichen Interaktion zwischen SmTK4, SmTK6 und SmTK3

Aus den Ergebnissen der Analysen im Yeast Two-Hybrid System wurde dieses hypothetische Modell zur Interaktion der drei Tyrosinkinasen SmTK4, SmTK6 und SmTK3 erstellt. Die Syk-Kinase SmTK4 bindet über ihre Tandem-SH2-Domäne an die Tyrosinkinase-Domäne (TK) der Src-Kinase SmTK6 oder SmTK3. SmTK6 bindet über ihre SH2-Domäne ebenfalls an SmTK3. Umgekehrt binden jedoch weder SmTK6 noch SmTK3 über ihre SH2-Domänen an SmTK4 (nähere Erläuterungen siehe Text). Dieser Kinasekomplex liegt wahrscheinlich unterhalb der Cytoplasmamembran, da SmTK3 über eine Myristylierung an dieser verankert werden kann (Kapp et al., 2004). [CM: Cytoplasmamembran, ex: extrazellulär, in: intrazellulär]

Innerhalb des postulierten Kinasekomplexes bindet SmTK4 über die Tandem-SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste in der Tyrosinkinase-Domäne von SmTK6 bzw. SmTK3 (Beckmann, 2005). SmTK6 bindet über die eigene SH2-Domäne an SmTK3, vermutlich ebenfalls an Phosphotyrosine in der Tyrosinkinase-Domäne. Weder SmTK6 noch SmTK3 können jedoch im Gegenzug über ihre SH2-Domänen an die „linker“-Region oder Tyrosinkinase-Domäne von SmTK4 binden, wie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Yeast Two-Hybrid Analysen belegen (vgl. Kapitel 3.4). Die Interaktionen verlaufen somit wahrscheinlich unidirektional.

Interaktionen zwischen Src- und Syk-Kinasen sind in der Literatur mehrfach beschrieben und scheinen in Signaltransduktionsprozessen eine wichtige Rolle zu spielen. Nach ihrer Aktivierung phosphorylieren Src-Kinasen diverse Proteinsubstrate, u.a. ITAMs (*immunreceptor tyrosine activation motifs*) in der intrazellulären Domäne von Immunrezeptoren. Diese rekrutieren wiederum die SH2-Domänen einer Syk-Kinase und führen zu der Aktivierung der Kinase (Zoller et al., 1997; Berton et al., 2005). Alternativ kann die Aktivierung einer Syk-Kinase auch über verschiedene Nicht-Immunrezeptoren erfolgen (Berton et al., 2005). Ein Beispiel hierfür stellt die Kinase-Interaktion *downstream* von Integrin-Rezeptoren dar (Yan et al., 1997; Obergfell et al., 2002; Arias-Salgado et al., 2003), worauf im folgenden Abschnitt 4.2 eingegangen wird. Neben dieser indirekten Aktivierung können Src-Kinasen *downstream* im Signalweg fungierende Syk-Kinasen auch direkt aktivieren und zur Plasmamembran rekrutieren (Kurosaki et al., 1994; Arias-Salgado et al., 2003). Hierbei phosphorylieren eine oder mehrere Src-Kinasen spezifische Tyrosinreste innerhalb der Syk-Kinase was zur Aktivierung ihrer Kinaseaktivität führt (Kurosaki et al., 1994; Zoller et al., 1997; Geahlen, 2007). Durch diese Phosphorylierung werden zudem innerhalb der Syk-Kinase hoch affine Bindestellen für *downstream* agierende Signalmoleküle geschaffen, die ihrerseits Syk-Substrate sind. Hierzu gehören u.a. wiederum Src-Kinasen oder FAKs (Geahlen, 2007). In *S. mansoni* kommt es somit möglicherweise durch die *upstream* agierende Src-Kinase SmTK6, ggf. im Zusammenspiel mit der Src-Kinase SmTK3, zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der Syk-Kinase SmTK4.

Für die Interaktion zwischen zwei Src-Kinasen ist bekannt, dass die Aktivität der einen Src-Kinase durch eine weitere Src-Kinase (beispielsweise eine C-terminale Src-Kinase, Csk) reguliert werden kann (Liu et al., 1993; Sabe et al., 1994; Roskoski, 2004; Vielreicher et al., 2007). Dies kann, wie auch die Src-Syk-Interaktion, *downstream* von Integrin-Rezeptoren stattfinden (Vielreicher et al., 2007). Die C-terminale Src-Kinase bindet an den C-Terminus der aktiven Src-Kinase und phosphoryliert diese an einem bestimmten Tyrosinrest (Tyr<sup>527</sup>). Dies führt zu einer intramolekularen Bindung der SH2-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrest, wodurch die Src-Kinase in eine geschlossene, inaktive Konformation übergeht (Obergfell et al., 2002; Cole et al., 2003). Womöglich kann SmTK3 ähnliche Funktionen für SmTK6 erfüllen oder *vice versa*. Alternativ ist es ebenfalls vorstellbar, dass SmTK3 kooperativ mit SmTK6 bei der Aktivierung von *downstream* Molekülen, wie z. Bsp. SmTK4 agiert, oder dass die beiden Src-Kinasen sich durch Phosphorylierungen in *trans* aktivieren.

#### 4.1.4 Identifizierung von *downstream* - SmTK4-Interaktionspartnern

Für die weitere Aufklärung des Signalwegs, an dem SmTK4 und möglicherweise auch SmTK6 und SmTK3 im Ovar und den Testes beteiligt sind, wurde ein Yeast Two-Hybrid Screening zur Identifizierung von *downstream*-Interaktionspartnern von SmTK4 durchgeführt. Potentielle Interaktionspartner binden an Motive in der Tyrosinkinase-Domäne der Syk-Kinase, wobei die Spezifität der Bindung durch die „linker“-Region, den Bereich zwischen der Tandem-SH2-Domäne und der Tyrosinkinase-Domäne, bestimmt wird (Moon et al., 2005). Ferner ist bekannt, dass Tyrosinreste in der „linker“-Region die Interaktion mit *downstream* - Effektormolekülen vermitteln (Moon et al., 2005; Geahlen, 2007).

Um diese Möglichkeiten abzudecken, wurden zwei verschiedene *bait*-Konstrukte erstellt. Eines umfasste die „linker“-Region zusammen mit der Tyrosinkinase-Domäne (TK4-bait1) und das andere ausschließlich die „linker“-Region (TK4-bait2) der SmTK4. Vor Beginn der Screenings wurde die Expression der beiden SmTK4-Fusionsproteine auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen und eine autonome Aktivierung von Reportergenen durch die *bait*-Proteine ausgeschlossen (vgl. Kapitel 3.3.2).

Aus dem Screening mit dem TK4-bait1 („linker“-Region und TK-Domäne) resultierten 20 und aus dem Screening mit dem TK4-bait2 („linker“-Region) 36 Hefeklone, die Wachstum auf dem Mangelmedium zeigten. Durch einen  $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay konnte die Anzahl auf 4 bzw. 16 Klone reduziert werden. Aus diesen Hefeklonen wurden die *prey*-Plasmide isoliert, was bei allen 4 Klonen des TK4-bait1-Screenings und bei 13 der 16 Klone aus dem TK4-bait2-Screening erfolgreich war. Die Inserts der isolierten *prey*-Plasmide wurden sequenziert und die von ihnen kodierten Proteine über eine BlastX-Analyse der Sequenzen identifiziert (vgl. Tabellen 3.5 und 3.6, Kapitel 3.3.3.3). Auf die potentiellen SmTK4-Bindungspartner wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

##### 4.1.4.1 Ein HSP-Homolog als Bindungspartner von SmTK4

Von den vier sequenzierten *prey*-Plasmiden des TK4-bait1-Screenings kodierten drei und von denen des TK4-bait2-Screenings fünf für ein Protein mit Homologie zu dem bereits bekannten Protein p40 aus *S. mansoni* (Smp40; Accession number: P12812), das damit der am häufigsten identifizierte Bindungspartner war. Während je zwei Klone aus den Screenings völlig identisch mit der Sequenz von Smp40 waren, besaßen die übrigen Klone hohe Homologie, jedoch keine Identität zu dieser Sequenz.

Smp40 wurde von Nene et al. (1986) als ein Haupt-Antigen von *S. mansoni* - Eiern identifiziert. Es wird am stärksten in Eiern und Miracidien exprimiert, sowie schwächer auch

in Cercarien, Schistosomulae und Adulten. Smp40 besitzt eine Größe von etwa 40 kDa und kommt in vier nahezu identischen Formen vor, die vermutlich von einer Multigenfamilie kodiert werden. Es wird angenommen, dass im Genom von *S. mansoni* mehrere, leicht unterschiedliche Kopien eines Smp40-Gens vorhanden sind, aber auch ein alternatives *splicing* der prä-mRNAs wird nicht ausgeschlossen (Nene et al., 1986). Die nicht-identischen, aber homologen Sequenzen der identifizierten Bindungspartner sind somit durch Variationen innerhalb der Smp40-Proteinfamilie zu erklären. In den verschiedenen Stadien bzw. Geschlechtern scheint die Expression der Smp40-Proteine unterschiedlich reguliert zu sein. In Weibchen lässt sich nur eine Smp40-Variante nachweisen, während in Eiern zwei und in Männchen vier auftreten (Nene et al., 1986). Die Smp40 Proteine besitzen hohe Homologien zu Hitzeschock-Proteinen (HSP), zeigen außerhalb definierter Homologie-Bereiche auch deutliche Sequenzunterschiede. Dennoch besitzt Smp40 aufgrund der gemeinsamen funktionellen Domänen vermutlich ähnliche Funktionen wie HSPs (Nene et al., 1986).

Hitzeschock-Proteine haben vielfältige Funktionen. Sie sind an der Stress-Reaktion von Zellen beteiligt, spielen eine wichtige Rolle als Chaperone, agieren aber auch in Signaltransduktionsprozessen (Calderwood et al., 2007). Für HSPs ist zudem im Zellkultur-System eine Interaktion mit Syk-Kinasen beschrieben worden (Castro et al., 2005; Bartis et al., 2007). Beide Moleküle co-lokalisieren und lassen sich co-immunopräzipitieren. Die Kinase wird durch das HSP vor einem Abbau in der Zelle geschützt, und ein Fehlen des HSPs führt zu ihrer Degradation (Castro et al., 2005). Möglicherweise kommt Smp40 ebenfalls eine derartige Funktion zu und schützt SmTK4 in ihrem inaktiven cytoplasmatischen Zustand vor dem Abbau. Bei Smp40 handelt es sich somit eher um ein SmTK4-assoziiertes bzw. bindendes Protein und weniger um einen spezifischen *downstream*-Effektor dieser Syk-Kinase (vgl. Abschnitt 4.1.4.3).

#### 4.1.4.2 Weitere Bindungspartner von SmTK4

Die Inserts der weiteren sequenzierten *prey*-Plasmide aus den Yeast Two-Hybrid Screenings zur Identifizierung von *downstream* SmTK4-Interaktionspartnern repräsentierten unterschiedliche Proteine, die jeweils nur einmal vertreten waren. Sie besaßen Homologie zu einer GlcNAc-Transferase, die an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt ist, zu dem Stoffwechsellzym ADH (Alkoholdehydrogenase), zu einem Zinkfinger-Protein, dem mitochondrialen Cytochrom C1 sowie zu dem Pol-Polyprotein (Bestandteil eines Retrotransposons; Reverse Transkriptase- und Protease-Aktivität) und dem Eischalvorläufer-Protein p48 aus *S. mansoni*. Diese Moleküle wurden alle in dem Screening

mit dem TK4-bait2 (SmTK4-,linker“-Region) identifiziert und als falsch-positive Interaktionspartner eingestuft. Zum Teil sind diese Moleküle dafür bekannt im Yeast Two-Hybrid System unspezifische Bindungen mit einer Vielzahl verschiedener *bait*-Proteine eingehen zu können ([www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html](http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html)). Zudem sind Interaktionen von Syk-Kinasen mit diesen Molekülen in der Literatur bisher noch nicht beschrieben (USCD - Nature Signaling Gateway). Die Inserts zweier weiterer *prey*-Plasmide aus dem TK4-bait2-Screening waren verschieden und wiesen keine Homologien zu bekannten Proteinen auf.

Als letzter potentieller Bindungspartner wurde ein Mucin-Homolog identifiziert, das identisch mit dem als Interaktionspartner von SmTK6 identifizierten Mucin ist (vgl. Abschnitt 4.1.2.1). Wie für Src-Kinasen ist auch für Syk-Kinasen eine Interaktion mit dem intrazellulären C-Terminus eines transmembranen Mucins möglich. Während eine Src-Kinase innerhalb eines YEKV-Motivs bindet, kann eine Syk-Kinase innerhalb einer ITAM-ähnlichen Sequenz binden und den C-Terminus des Mucins phosphorylieren (Singh & Hollingsworth, 2006). Innerhalb des intrazellulären C-Terminus des als Interaktionspartner von SmTK6 und SmTK4 identifizierten Mucins befindet sich N-terminal der Src-Kinase-Bindestelle im Bereich der Aminosäuren 2616 - 2631 auch ein potentielles ITAM (vgl. Anhang 5.7). Dieses ist mit der Konsensussequenz (YXXLX<sub>8</sub>YXXM; Singh & Hollingsworth, 2006) nicht völlig identisch und weist bezüglich der für die Phosphorylierung wichtigen beiden Tyrosinreste einen Abstand von elf anstelle von zwölf Aminosäuren auf. Des Weiteren befindet sich ein konservierter Lysinrest (L) an dritter anstelle vierter Position. Trotz dieser geringfügigen Abweichungen könnte dieses Motiv vermutlich von einer Syk-Kinase wie SmTK4 gebunden und phosphoryliert werden. Bemerkenswerter Weise wurde dieses Mucin nur in dem Screening mit dem TK4-bait1 (SmTK4-,linker“-Region und TK-Domäne) identifiziert. Daher kann postuliert werden, dass der intrazelluläre C-Terminus dieses Mucin mit einem Bereich der Sm-TK4-,linker“-Region und/oder TK-Domäne interagieren kann und die SmTK4-TK-Domäne diesen an den Tyrosinresten innerhalb des ITAM-ähnlichen Motivs phosphoryliert. Hierdurch werden Phosphotyrosine im ITAM geschaffen, die als hoch affine Bindestellen für SH2-Domänen-Proteine dienen. Möglicherweise können diese *in vivo* auch die SH2-Domäne(n) von wiederum SmTK4 rekrutieren, ein *feedback*-Mechanismus, der bereits beschrieben ist (Reth & Brummer, 2004). Es ist daher denkbar, dass neben SmTK6 auch SmTK4 zur Interaktion mit dem intrazellulären Teil des Mucins befähigt ist, zumal SmTK4 und SmTK6 Interaktionspartner sind und wahrscheinlich in Form eines Komplexes vorliegen (vgl. Abschnitt 4.1.3).

#### 4.1.4.3 Limitation der Identifizierung von *downstream* - SmTK4-Interaktionspartnern

Die Interaktion von Syk-Kinasen mit *downstream* im Signalweg gelegenen Molekülen ist möglicherweise von einem aktiven, phosphorylierten Zustand der Syk-Kinase anhängig (Moon et al., 2005). *In vivo* kommt es zu einer Autophosphorylierung der Syk-Kinase an allen für die Interaktion relevanten Tyrosinresten, die zwischen den beiden SH2-Domänen, in der „linker“-Region sowie in der Kinasedomäne liegen (Furlong et al., 1997). Die Phosphorylierung einiger dieser Tyrosinreste ist jedoch von einer Src-Kinase abhängig (Keshvara et al., 1998). Generell ist eine als Fusionsprotein mit der GAL4-Bindedomäne exprimierte Syk-Kinase zu einer Autophosphorylierung befähigt, wie Untersuchungen im Hefesystem belegen (Moon et al., 2005). In dem Screening mit der SmTK4-„linker“-Region (TK4-bait2) war diese Autophosphorylierung nicht möglich, da nur ein nicht-katalytischer Teil der Syk-Kinase SmTK4 in den Hefen exprimiert wurde. Dies würde für Phosphorylierungs-abhängige Interaktionen dann jedoch voraussetzen, dass spezifische Tyrosinreste von Hefe-eigenen Kinasen phosphoryliert wurden. Da Hefen selber jedoch keine spezifischen Tyrosinkinase besitzen und Tyrosinreste nur unspezifisch phosphorylieren (Ptacek et al., 2005), ist dies ein kritischer Punkt des durchgeführten Yeast Two-Hybrid Screenings. Bei dem Screening mit der SmTK4-„linker“-Region und Tyrosinkinase-Domäne (TK4-bait1) wäre eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der „linker“-Region durch die Tyrosinkinase-Domäne denkbar. Möglicherweise reicht diese jedoch nicht aus, um notwendige Bindestellen für *downstream* - Effektormoleküle zu schaffen, da hierfür Phosphorylierungen durch weitere zelluläre Tyrosinkinasen vom Src-Typ potentiell notwendig sind (Keshvara et al., 1998, vgl. Abschnitt 4.1.3).

Bei dem identifizierten Hitzeschockprotein-Homolog handelt es sich um ein SmTK4-bindendes Protein, das an der Stabilisierung dieser Syk-Kinase beteiligt sein könnte, aber vermutlich nicht um ein *downstream* - Effektormolekül. Spezifische *downstream* - Moleküle von SmTK4 konnten möglicherweise nicht identifiziert werden, da die für die Interaktion verantwortlichen Tyrosinreste in der „linker“-Region und/oder der Tyrosinkinase-Domäne nicht in *trans* durch z. Bsp. eine Src-Kinase (Geahlen, 2007) phosphoryliert vorlagen. Um die unterhalb von SmTK4 in der Signalkaskade gelegenen Moleküle dennoch über das Yeast Two-Hybrid System zu identifizieren, wird das Screenings mit dem TK4-bait1 unter der zusätzlichen Expression der SmTK3-TK-Domäne im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe derzeit wiederholt. Durch die zusätzliche Expression dieser schistosomalen TK-Domäne konnte in vorherigen Screenings eine Phosphorylierung von Interaktionspartnern in Hefen sichergestellt werden (vgl. Abschnitt 4.1.2).

## 4.2 SmRTK1 und Integrine als *upstream*-Interaktionspartner

In den durchgeführten Screenings mit der SmTK4-Tandem-SH2-Domäne oder der SmTK6-SH2-Domäne als *bait*-Proteine wurden mit Ausnahme des transmembranen Mucins keine Rezeptormoleküle als *upstream*-Interaktionspartner des postulierten Kinasekomplexes identifiziert. Mögliche Ursachen hierfür könnten technische Limitationen des Systems sein. Da nicht aus allen Hefeklonen *prey*-Plasmide erfolgreich isoliert werden konnten, ist es denkbar, dass sich unter diesen noch für Rezeptormoleküle kodierende Plasmide befinden. Das Yeast Two/Three-Hybrid System eignet sich zudem nur bedingt für die Identifizierung von Membran-Rezeptoren (Fields & Sternglanz, 1994). Ursache hierfür ist, dass diese oftmals Sequenzmotive beinhalten, durch die sie in der Membran verankert werden. Diese Motive können auch nach Expression als Fusionsprotein in den Hefen zum Einbau in die Cytoplasmamembran führen. Normalerweise werden die Fusionsproteine durch eine NLS (*nuclear location site*), die ein intrinsischer Teil der GAL4-BD und GAL4-AD ist, in den Zellkern der Hefen transportiert. Enthält ein Fusionsprotein neben der NLS jedoch zusätzlich noch eine Sequenz für den Einbau in die Membran, so erhält die Zelle zwei konträre Signale. Die Interaktion cytoplasmatischer Domänen von Membran-Rezeptoren mit einem *bait*-Protein wäre zwar theoretisch möglich, der Transport in den Zellkern jedoch aufgrund der möglichen Membranverankerung des *prey*-Proteins verhindert. Der Komplex aus *bait*- und *prey*-Protein, und damit die beiden Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors, müssen im Zellkern der Hefen lokalisiert sein, um die Expression der Reportergene aktivieren zu können. Eine putative Interaktion könnte bedingt durch die fehlende aber essentielle Lokalisation im Zellkern somit nicht detektiert werden. Die Identifizierung eines Rezeptormoleküls über das Yeast Two-Hybrid System wäre dann möglich, wenn die für dieses Molekül kodierenden cDNA-Sequenzen den Transmembranbereich oder die Membranverankerungs-Sequenzen nicht umfassten. Hierzu kann es bei der Herstellung der Yeast Two-Hybrid Bank bedingt durch eine unvollständige reverse Transkription bei der cDNA-Synthese als ein rein zufälliges Ereignis durchaus kommen.

Für die Untersuchung von Interaktionen mit Proteinen, die an oder in der Plasmamembran verankert sind, wurde ein vom klassischen, GAL4-basierenden Yeast Two-Hybrid System abgeleitetes System entwickelt. In diesem DUALmembrane System (Dualsystems) wird das Membran-integrale oder assoziierte Protein mit einer Hälfte eines Ubiquitins sowie mit einem Transkriptionsfaktor fusioniert. Das zweite Protein wird mit der anderen Hälfte des Ubiquitins fusioniert. Durch die Interaktion der beiden Proteine kommt es zur Rekonstruktion des funktionellen Ubiquitins, das daraufhin durch Hefe-Proteasen

gespalten wird und so den Transkriptionsfaktor freisetzt. Dieser wird in den Kern der Hefen transportiert und führt dort zur Aktivierung der Reportergene, die über Selektion nachgewiesen werden kann ([www.dualsystems.com](http://www.dualsystems.com)). Dieses System würde sich für die Identifizierung von cytoplasmatischen und transmembranen Proteinen als Interaktionspartner eignen, da die Expression der Reportergene unabhängig von der subzellulären Lokalisation der Interaktion aktiviert wird.

Um putative Interaktionen der drei zellulären Tyrosinkinasen SmTK4, SmTK6 und SmTK3 mit Rezeptoren über das klassische Yeast Two-Hybrid System untersuchen zu können, wurden zum einen Interaktionen mit der bereits bekannten Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1 aus *S. mansoni* getestet (Abschnitt 4.2.1). Des Weiteren wurden potentielle Interaktionen der drei Tyrosinkinasen mit Integrin-Rezeptoren aus *S. mansoni* untersucht (Abschnitt 4.2.3), da aus Literaturdaten bekannt ist, dass sowohl Syk- als auch Src-Kinasen mit Integrinen interagieren können (Woodside et al., 2001; Arias-Salgado et al., 2003).

#### 4.2.1 Interaktionen zwischen SmRTK1 und SmTK4, SmTK6 sowie SmTK3

SmRTK1 ist eine membrandurchspannende Rezeptor-Tyrosinkinase aus *S. mansoni*. Ihre extrazelluläre Domäne trägt ein *Venus Flytrap*-Motiv (VFT), das ein typisches Merkmal von Pheromonrezeptoren oder pharmako-aktivierbaren Ionenkanal-Rezeptoren wie dem GABA-B-Rezeptor ist (Vicogne et al., 2003). Die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne von SmRTK1 weist Homologie zu der katalytischen Domäne von Insulin-Rezeptoren auf. SmRTK1 wird RT-PCR-Untersuchungen zu Folge in allen Stadien des Lebenszyklus von *S. mansoni* exprimiert. In Adulten ist die Expression in den Oocyten (Ovar) und im Ovidukt des Weibchens sowie im Parenchym des Männchens lokalisiert worden (Vicogne et al., 2003). Aufgrund der Co-Lokalisation von SmRTK1 und SmTK4 im Ovar des Weibchens und da Syk-Kinasen mit den intrazellulären Bereichen von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) interagieren können (Geahlen & Burg, 1994; Geahlen, 2007), ist eine Interaktion von SmRTK1 und SmTK4 denkbar. Neben der Syk-Kinase SmTK4 werden auch die Src-Kinasen SmTK6 und SmTK3 im Ovar des Schistosomen-Weibchens exprimiert (Kapp et al., 2004; Beckmann, 2005). Da auch Src-Kinasen mit den intrazellulären Domänen von RTKs interagieren können (Thomas & Brugge, 1997; Bromann et al., 2004; Roskoski, 2004), sind SmTK6 und SmTK3 ebenfalls potentielle Bindungspartner von SmRTK1.

Die Interaktionen zwischen SmRTK1 und SmTK4 sowie SmTK6 oder SmTK3 wurden im Yeast Two-Hybrid System untersucht. Dazu wurde der Tyrosinkinase-Domäne-umfassende intrazelluläre C-Terminus von SmRTK1 mit den Protein-Interaktionsdomänen

der drei zellulären Tyrosinkinasen in Hefen co-exprimiert. Im einzelnen wurden so die Interaktionen mit der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4, der SH2- bzw. SH3SH2-Domänen von SmTK6 oder SmTK3 mit und ohne zusätzlicher Tyrosinphosphorylierung in Hefen überprüft und quantifiziert (vgl. Kapitel 3.5).

Sämtliche Konstrukte der drei zellulären Tyrosinkinasen waren zu einer Interaktion mit dem C-Terminus von SmRTK1 befähigt, jedoch in unterschiedlicher Stärke (vgl. Abbildung 3.16). Die Bindung der SH2-Domäne von SmTK3 an den intrazellulären Bereich von SmRTK1 war die schwächste der quantifizierten Interaktionen. Diese wurde zudem durch eine zusätzliche Phosphorylierung weiter reduziert. Im Vergleich zur isolierten SH2-Domäne zeigte die Expression der Kombination aus SH3- und SH2-Domäne von SmTK3 eine deutlich stärkere Interaktion. Diese war ebenfalls mit einer zusätzlichen Phosphorylierung negativ korreliert. Die Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 zeigte eine etwa doppelt so starke Bindung an den C-Terminus von SmRTK1 wie die SmTK3-SH2-Domäne. Diese Interaktion wurde durch eine zusätzliche Phosphorylierung jedoch verstärkt. Aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur zeigen SH2-Tandem-Domänen eine höhere Bindungsspezifität als individuelle SH2-Domänen (Ottinger et al., 1998). Für die Überprüfung der Spezifität der Interaktion zwischen SmTK4 und SmRTK1 wurde daher zusätzlich die Interaktion von SmRTK1 mit singulären SH2-Domänen von SmTK4 getestet. Sowohl die N-terminale als auch die C-terminale SH2-Domäne wiesen nur eine sehr schwache Bindung an den C-Terminus von SmRTK1 auf. Dies spricht für die Spezifität der SmTK4-Tandem-SH2-Bindung an SmRTK1. Von den drei zellulären Tyrosinkinasen zeigte SmTK6 die stärkste Bindung an SmRTK1, die durch eine zusätzliche Tyrosin-Phosphorylierung verstärkt wurde. Im Vergleich zur TK6-SH2-Domäne war die Interaktion der SH3SH2-Domäne von SmTK6 deutlich stärker.

Während SH2-Domänen der Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste dienen, binden SH3-Domänen an Prolin-reiche Regionen in Proteinen. Innerhalb des C-Terminus der Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1 konnten *in silico* mehrere potentielle Phosphotyrosinreste identifiziert werden (NetPhos, Blom et al., 1999), die potentielle Bindungsstellen für die SH2-Domänen der Src-Kinasen SmTK3 und SmTK6 darstellen. Durch die Kombination der SH2- und SH3-Domänen im Vergleich zu den individuellen SH2-Domänen konnte die Bindungen von SmTK3 bzw. SmTK6 an den intrazellulären Bereich von SmRTK1 deutlich verstärkt werden, so dass an der Interaktion beide Domänen der Src-Kinase beteiligt zu sein scheinen. In dem intrazellulären Bereich von SmRTK1 konnten zwei Zielsequenzen für SH3-Bindungen identifiziert werden, die mit der Konsensussequenz XPpXP (P: invariabler

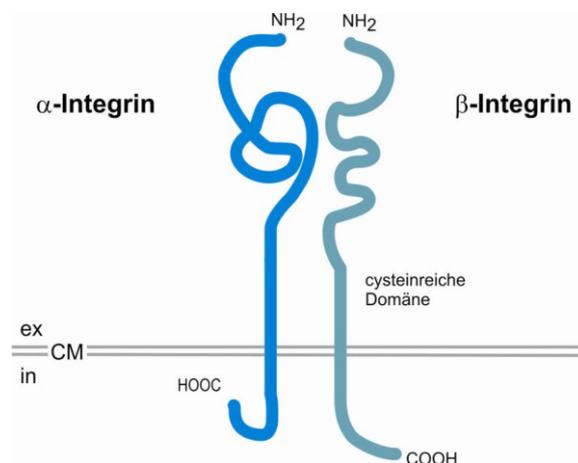
Prolin-Rest; X: variabel, meist aliphatisch; p: oftmals Prolin-Rest; Krauss, 1997) übereinstimmen. Die Bindung der SH3-Domänen von SmTK3 bzw. SmTK6 erfolgte somit wahrscheinlich an diese beiden Motive im C-Terminus von SmRTK1.

Syk-Kinasen binden über ihre Tandem-SH2- und nicht über singuläre SH2-Domänen an den intrazellulären Teil von Rezeptoren wie beispielsweise Insulin-Rezeptoren (Ottinger et al., 1998). Der intrazelluläre C-Terminus von SmRTK1 weist Homologie zu der katalytischen Domäne von Insulin-Rezeptoren auf (Vicogne et al., 2003). Die Ergebnisse der Bindungsassays im Yeast Two-Hybrid System stimmen somit mit Erkenntnissen aus anderen Systemen überein, indem sie für SmTK4 eine deutliche Bindung der Tandem-SH2-Domäne und nur eine sehr schwache Bindung der singulären SH2-Domänen an den SmRTK1-C-Terminus zeigten.

Aufgrund der Ergebnisse der Yeast Two-Hybrid Analysen zur Interaktion mit SmRTK1 kann angenommen werden, dass der postulierte Kinasekomplex aus SmTK4, SmTK6 und SmTK3 *downstream* dieser Rezeptor-Tyrosinkinase agieren kann, und eine oder mehrere der Kinasen nach Bindung an den SmRTK1-C-Terminus durch diesen phosphoryliert und aktiviert werden können.

#### 4.2.2 Identifizierung und erste Charakterisierung der $\alpha$ - und $\beta$ -Integrin-Rezeptoren

Integrine sind heterodimere Moleküle, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Jede Untereinheit weist eine lange extrazelluläre Domäne, eine Transmembran-domäne sowie einen kurzen intrazellulären Bereich auf (Hynes, 1987, Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3:** Schematischer Aufbau von Integrin-Rezeptoren

[CM: Cytoplasmamembran, COOH: C-Terminus, NH<sub>2</sub>: N-Terminus, ex: extrazellulär, in: intrazellulär]

Als Adhäsions-Rezeptoren verbinden Integrine die extrazelluläre Matrix mit dem Cytoskelett und spielen eine wichtige Rolle in Signalwegen, die Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung oder Migration von Zellen steuern (van der Flier & Sonnenberg, 2001). Signale, die zu solchen zellulären Antworten führen, werden über die cytoplasmatischen Teile der Integrin-Rezeptoren, die selber keine intrinsische, katalytische Aktivität besitzen, an verschiedene Signalmoleküle weitergegeben. Über Yeast Two-Hybrid Analysen und biochemische Assays wurden in der Vergangenheit verschiedene Integrin-Bindungspartner identifiziert (van der Flier & Sonnenberg, 2001; zusammengefasst in Zaidel-Bar et al., 2007), darunter auch Tyrosinkinasen der Src-, Syk- und FAK-Familie (Schlaepfer & Hunter, 1998; Woodside et al., 2002; Arias-Salgado et al., 2003). Nach Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix und Dimerisierung der Integrin-Rezeptoren kommt es somit nicht nur zur Rekrutierung und Reorganisation von Komponenten des Aktin-Cytoskeletts sondern auch zur Aktivierung von Signaltransduktions-Kaskaden, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse steuern. Integrine spielen u.a. eine Rolle bei der Spermatogenese der Maus oder als Spermien-Rezeptoren in Oocyten des Schweins und wurden in den Plasmamembranen von Spermatozoen und Oocyten nachgewiesen (Linfoot & Berger, 2000).

Da die Möglichkeit von Interaktionen der drei zellulären Tyrosinkinasen mit bislang unbekanntem  $\beta$ - und  $\alpha$ -Integrin-Rezeptoren aus *S. mansoni* in Betracht zu ziehen war, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach solchen Rezeptoren in den *S. mansoni* - Genomdaten ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk), [www.tigr.org](http://www.tigr.org)) gesucht. Im Falle des  $\beta$ -Integrin-Rezeptors wurden *in silico* zwei Sequenzen gefunden, die hohe Homologien zu den N- bzw. C-terminalen Bereichen von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren aufweisen. Jedoch konnte die putative Gesamtsequenz durch diese beiden Sequenzen nicht vollständig abgedeckt werden. Der noch fehlende Bereich wurde über eine RT-PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Hierdurch gelang es, die vollständige, 2598 bp lange Sequenz eines  $\beta$ -Integrin-Rezeptors aus *S. mansoni* (Sm $\beta$ -Int1) zu identifizieren (vgl. Kapitel 3.6.11). Über eine Analyse der Aminosäuresequenz (865 AS) wurden verschiedene, konservierte Domänen identifiziert. Sm $\beta$ -Int1 besitzt eine lange extrazelluläre Domäne, welche die  $\beta$ -Integrin-Untereinheit (INB) sowie eine *epidermal growth factor* (EGF) - Domäne beinhaltet. Es schließt sich ein kurzer Transmembran-Bereich sowie ein kurzer intrazellulärer C-Terminus ohne katalytische Domänen an. Dieser Aufbau entspricht der typischen Struktur von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren anderer Organismen (Luo et al., 2007). Die kodierende Sequenz für Sm $\beta$ -Int1 ist im Genom von *S. mansoni* auf 9 Exons mit einer Größe von 200 - 400 bp verteilt und umfasst unter Berücksichtigung der Introns rund

15 kb. Southern-Blot - Experimente zeigten, dass es sich bei Sm $\beta$ -Int1 um ein *single copy* - Gen handelt (vgl. Abbildung 3.22). Vergleichende RT-PCR-Analysen zeigten zudem, dass Sm $\beta$ -Int1 in Adulten sowie schwächer auch in Larven (Miracidien, Cercarien) exprimiert wird. Die Transkription von Sm $\beta$ -Int1 ist in paarungserfahrenen Adulten stärker als in paarungsunerfahrenen, dabei ist die Expression in Männchen generell stärker als in Weibchen (siehe Abbildungen 3.24 und 3.25). Über *in situ* - Hybridisierungen konnte die Sm $\beta$ -Int1-Transkription hauptsächlich im Ovar, Ootyp und Vitellarium weiblicher sowie in den Testes männlicher, paarungserfahrener Adulter lokalisiert werden. In den Testes ist die Transkription hauptsächlich auf den ventralen Bereich lokalisiert, in dem sich die reifen Spermien befinden. Weiterhin zeigte sich seitenpräferentiell im Weibchen Expression im Subtegument (vgl. Abbildung 3.26). In paarungsunerfahrenen Männchen konnte die Transkription von Sm $\beta$ -Int1 in den Testes sowie der Samenblase lokalisiert werden. In paarungsunerfahrenen Weibchen hingegen konnten keine Transkripte detektiert werden (vgl. Abbildung 3.27). In paarungsunerfahrenen Weibchen sind das Ovar und das Vitellarium undifferenziert und sehr klein. Möglicherweise liegen hier die Level der Sm $\beta$ -Int1-Transkripte unter der Nachweisgrenze einer *in situ* - Hybridisierung.

In den *S. mansoni* - Datenbanken wurde ferner eine kodierende Sequenz identifiziert, die hohe Homologie zu  $\alpha$ -Integrin-Rezeptoren aufweist. Diese 3657 bp lange Sequenz eines  $\alpha$ -Integrin-Rezeptors aus *S. mansoni* (Sm $\alpha$ -Int1) wurde zur Verifizierung in zwei sich überlappenden Teilsequenzen über RT-PCRs amplifiziert (vgl. Kapitel 3.6.2.1). Eine Analyse der Aminosäuresequenz (1219 AS) zeigte, dass Sm $\alpha$ -Int1 eine lange extrazelluläre Domäne mit drei  $\alpha$ -Integrin-Domänen, einen kurzen transmembranen Bereich sowie einen kurzen intrazellulären C-Terminus ohne katalytische Domänen aufweist. Die  $\alpha$ -Integrin-Domänen weisen sogenannte *beta propellor repeats* auf, die für diese Domänen charakteristisch sind (Luo et al., 2007). Der Aufbau von Sm $\alpha$ -Int1 entspricht damit der typischen Struktur von  $\alpha$ -Integrin-Rezeptoren. Die kodierende Sequenz von Sm $\alpha$ -Int1 ist im Genom von *S. mansoni* auf elf Exons mit Größen von unter 100 bis über 800 bp und zehn Introns verteilt und umfasst insg. etwa 36 kb. Sm $\alpha$ -Int1 wird in Adulten sowie in Larvenstadien (Miracidien, Cercarien) exprimiert. Wie bei Sm $\beta$ -Int1 ist die Transkription von Sm $\alpha$ -Int1 in paarungserfahrenen leicht stärker als in paarungsunerfahrenen Adulten und darüber hinaus in Männchen generell stärker als in Weibchen und Larven. Die Unterschiede in der Transkriptionsstärke weisen die gleiche Tendenz auf wie die von Sm $\beta$ -Int1, jedoch in schwächerem Maße (siehe Abbildungen 3.35 und 3.36). Die Transkription von Sm $\alpha$ -Int1 wurde über *in situ* - Hybridisierungen in

paarungserfahrenen Adulten im Ovar, Ootyp und Vitellarium des Weibchens sowie in den Testes des Männchens lokalisiert. In paarungsunerfahrenen Weibchen konnte die Sm $\alpha$ -Int1-Transkription nur im Ootyp, nicht aber im Ovar oder Vitellarium nachgewiesen werden. In paarungsunerfahrenen Männchen wurde wie in den paarungserfahrenen eine Transkription in den Testes nachgewiesen. Auch für Sm $\alpha$ -Int1 zeigte sich eine seitenpräferentielle Transkription in paarungserfahrenen Weibchen im Subtegument (vgl. Abbildung 3.37).

Die Transkription von Sm $\alpha$ -Int1 in adulten Schistosomen stimmt mit der von Sm $\beta$ -Int1 überein und ist vorwiegend in den Reproduktionsorganen adulter Schistosomen (Ovar, Ootyp, Vitellarium, Testes) lokalisiert, so dass eine Heterodimerisierung der beiden Rezeptoren in diesen Geweben als wahrscheinlich anzusehen ist. Die Transkription von Sm $\alpha$ -Int1 im Ovar des Weibchens war in großen, reifen Oocyten stärker als in kleineren, unreifen. Dies geht konform mit der Beschreibung von Integrin-Rezeptoren als Spermienrezeptoren auf reifen Oocyten des Schweins (Linfor & Berger, 2000). Möglicherweise erfüllen Sm $\alpha$ - und Sm $\beta$ -Int1 ähnliche Funktionen auch in *S. mansoni* und sind an der Oogenese oder der Befruchtung reifer Oocyten beteiligt. Ebenso ist aufgrund der Expression beider Rezeptoren in den Testes auch eine Rolle bei der Spermatogenese zu postulieren, wie sie in anderen Organismen für Integrin-Rezeptoren bereits beschrieben worden ist (Shinohara et al., 1999).

#### 4.2.3 Interaktionen von Sm $\beta$ -Int1 und SmTK4, SmTK6 sowie SmTK3

Für  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren sind Interaktionen mit Syk-Kinasen beschrieben (Woodside et al., 2001; Woodside et al., 2002). Dabei binden Syk-Kinasen über ihre Tandem-SH2-Domänen an die intrazellulären C-Termini von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren, können in Folge dieser Bindung über einen bisher noch nicht gänzlich aufgeklärten Mechanismus aktiviert werden und ihrerseits die Signale weiterleiten (Woodside et al., 2001). Auch für Src-Kinasen sind Interaktionen mit den C-Termini von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren beschrieben worden (Arias-Salgado et al., 2003; Arnaout et al., 2007).

Die Überprüfung möglicher Interaktionen zwischen dem intrazellulären C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 und den Protein-Interaktionsdomänen von SmTK4, SmTK6 und SmTK3 erfolgte im Yeast Two-Hybrid System. Hierfür wurde der C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 mit der Tandem-SH2-Domäne bzw. den singulären SH2-Domänen von SmTK4 oder den SH4SH3-Kombinations-Domänen bzw. den singulären SH3-Domänen von SmTK6 bzw. SmTK3 in Hefen co-exprimiert und die Bindungsstärken quantifiziert (vgl. Kapitel 3.6.1.5 und 3.6.1.6).

Alle drei Tyrosinkinassen interagierten mit dem C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1. Die stärkste Interaktion war dabei zwischen Sm $\beta$ -Int1 und der SH4SH3-Domäne von SmTK3, gefolgt von der SH3-Domäne von SmTK6 zu beobachten. Die Bindung der Tandem-SH2-Domäne von SmTK4 an Sm $\beta$ -Int1 war im Vergleich schwächer (vgl. Abbildung 3.31).

Die intrazellulären Bereiche von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren sind meist sehr kurz, besitzen keine intrinsische, enzymatische Aktivität und sind daher abhängig von der Rekrutierung intrazellulärer Signalmoleküle, um Effekte in der Zelle zu initiieren (Geiger et al., 2001). Häufig kommt es nach Integrin-Heterodimerisierung und Integrin-*cluster*-Bildung in nachgeschalteten Signalwegen zu Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen durch die Aktivierung verschiedener Kinasen wie Src-Kinasen (Arias-Salgado et al., 2005). Eine Src-Kinase ist über ihre SH3-Domäne an den intrazellulären Teil eines  $\beta$ -Integrin-Rezeptors gebunden. Im inaktiven Zustand ist diese Src-Kinase mit einer inhibitorischen, C-terminalen Src-Kinase assoziiert (Csk; vgl. Abschnitt 4.1.3). Eine Bindung des Integrin-Rezeptors an einen extrazellulären Liganden führt auf noch ungeklärte Weise intrazellulär zur Aktivierung der Src-Kinase verbunden mit der Dissoziation der Csk und einer in *trans*-Phosphorylierung der Src-Kinase. Diese wiederum phosphoryliert dann eine Syk-Kinase, die ebenfalls an den C-Terminus des  $\beta$ -Integrin-Rezeptors gebunden ist (Woodside et al., 2001; Arias-Salgado et al., 2003; Arnaout et al., 2007).

Wie Studien im Zellkultur-System zeigten, kann die Interaktion zwischen einer Src-Kinase und dem intrazellulären Bereich eines  $\beta$ -Integrin-Rezeptors über die SH3-Domäne der Kinase erfolgen, obwohl der intrazelluläre Teil des Rezeptors über keine Prolin-reichen-Sequenzen verfügt (Arias-Salgado et al., 2003). Wie die Resultate der vorliegenden Arbeit nahelegen, verläuft die Interaktion zwischen SmTK3 bzw. SmTK6 und Sm $\beta$ -Int1 in analoger Weise. Auch das  $\beta$ -Integrin-Homolog aus *S. mansoni* weist keine Prolin-reiche Region im cytoplasmatischen Teil auf, wird aber von der SmTK3- bzw. SmTK6-SH3-Domäne gebunden. Dies ist eines von mehreren Beispielen atypischer Src-SH3-Domänen-Bindungen (Arias-Salgado et al., 2003; Chan et al., 2003). Die SH4-Domänen spielen vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der Interaktion der Src-Kinasen mit  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren (Arias-Salgado et al., 2003). Für die SmTK3, die an der Aminosäure-Position 2 ein potentiell myristyliertes Glycin und damit eine SH4-Domäne besitzt, konnte dies über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen bestätigt werden. Durch die Expression der SH4SH3-Kombinations-Domäne im Vergleich zu der SH3-Domäne konnte die Bindung von SmTK3 an den C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 deutlich verstärkt werden (vgl. Abbildung 3.31). Bei SmTK6 hingegen war die Interaktion bei Expression der SH4SH3-Kombinations-Domäne

schwächer als bei alleiniger Expression der SH3-Domäne. SmTK6 besitzt zwar ein Glycin an Aminosäure-Position 2, jedoch nicht in der Sequenzumgebung für eine potentielle Myristylierung und damit keine hoch konservierte SH4-Domäne. Jedoch weist SmTK6 Sequenzmotive für eine potentielle Membranverankerung über Palmitoylierung auf (vgl. Kapitel 1.4.5). Die schwächere Interaktion bei der Expression des vollständigen N-Terminus wäre somit durch eine potentielle Membrananlagerung des Fusionsproteins in der Hefezelle erklärbar. Durch weitere Bindungsassays im Hefesystem könnten diese Vermutungen genauer untersucht werden. So könnte durch ein SmTK3-SH4-Domänen-Deletionskonstrukt (Austausch des Glycins an Aminosäure-Position 2) der verstärkende Einfluss der SH4-Domäne auf die Interaktion bestätigt werden. Durch SmTK6-Konstrukte, bei denen die beiden für die Palmitoylierung benötigten Cysteinreste (Aminosäure-Positionen 4 und 6) deletiert sind, könnte ferner untersucht werden, ob eine potentielle Membranverankerung in der Hefezelle zu einer schwächeren Interaktion geführt hat.

Nach dem *clustering* von Integrin-Rezeptoren durch die Bindung an extrazelluläre Liganden kommt es vermutlich zur Homo-Oligomerisierung der  $\beta$ -Untereinheiten (Li et al., 2003). Dies ist intrazellulär verbunden mit einer Erhöhung der lokalen Konzentration von Src-Kinasen. Durch die Interaktion zwischen dem C-Terminus eines  $\beta$ -Integrin-Rezeptors und der SH3-Domäne einer Src-Kinase wird möglicherweise die autoinhibitorische, intramolekulare Bindung ihrer SH3-Domäne gelöst und die Src-Kinase so in eine offene, prä-aktivierte Konformation überführt (vgl. Kapitel 1.4.3). Im inaktiven Zustand einer Src-Kinase ist zudem die SH2-Domäne intramolekular an einen konservierten, phosphorylierten Tyrosinrest (Tyr<sup>527</sup>) gebunden. Die Aktivierung einer Src-Kinase *downstream* eines  $\beta$ -Integrin-Rezeptors geht daher einher mit der Dephosphorylierung dieses Tyrosinrestes durch die Dissoziation einer Csk (Oberfell et al., 2002) sowie durch Tyrosin-Phosphatasen (Su et al., 1999). Dies führt zu einer Stabilisierung der aktiven Form der Src-Kinase. Durch die lokale Konzentration der Src-Kinasen kommt es zu einer in *trans*-Phosphorylierung eines konservierten Tyrosinrestes (Tyr<sup>416</sup>) in der Src-Kinase, durch welche diese in eine katalytisch aktive Form überführt wird (Harrison, 2003), die Substrate phosphorylieren kann. Die Phosphorylierung in *trans* ist in *S. mansoni* beispielweise zwischen SmTK6 und SmTK3 vorstellbar (vgl. Abschnitt 4.1.3). Die aktive Form der Src-Kinase ist wiederum die Voraussetzung für die folgende Aktivierung einer Syk-Kinase (Arias-Salgado et al., 2003). Die *downstream* der Src-Kinase im Signalweg lokalisierte Syk-Kinase wird zu dem intrazellulären Teil des  $\beta$ -Integrin-Rezeptors durch die direkte Interaktion der SH2-Domäne(n) mit dem  $\beta$ -Integrin-C-Terminus rekrutiert und durch die

Src-Kinase aktiviert (Arnaout et al., 2007). In Folge kommt es zur Phosphorylierung von Syk-Substraten, die u.a. an der Reorganisation des Cytoskeletts beteiligt sind (Oberfell et al., 2002). In *S. mansoni* wird somit vermutlich zunächst die Src-Kinase SmTK6 aktiviert, vermutlich im Zusammenspiel mit SmTK3, und führt ihrerseits zur Rekrutierung der Syk-Kinase SmTK4 zum intrazellulären Teil von Sm $\beta$ -Int1 und zu deren Aktivierung.

Syk-Kinasen können direkt über ihre Tandem-SH2-Domäne an den cytoplasmatischen Teil von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren binden (Woodside et al., 2001; Woodside et al., 2002). Diese Bindung wurde als unabhängig von Tyrosin-Phosphorylierungen des Integrin-Rezeptors oder von Phosphotyrosin-Bindestellen in der Syk beschrieben. Beides stimmt mit den Ergebnissen der Yeast Two-Hybrid Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit überein. Auch die Syk-Kinase SmTK4 bindet bevorzugt über ihre Tandem-SH2-Domäne an den C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1, wobei hierfür keine zusätzliche Tyrosin-Phosphorylierung notwendig ist. Für die Interaktion von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren mit Syk-Kinasen wurde auch beschrieben, dass diese über die erste SH2-Domäne sowie über den Bereich zwischen den beiden SH2-Domänen der Syk vermittelt wird (Woodside et al., 2002). In den in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien konnte dies durch Einsatz eines SmTK4-Tandem-SH2-Domänen-Konstrukts im Vergleich zu SmTK4-Einzel-SH2-Domänen-Konstrukten bestätigt werden (vgl. Abbildung 3.29).

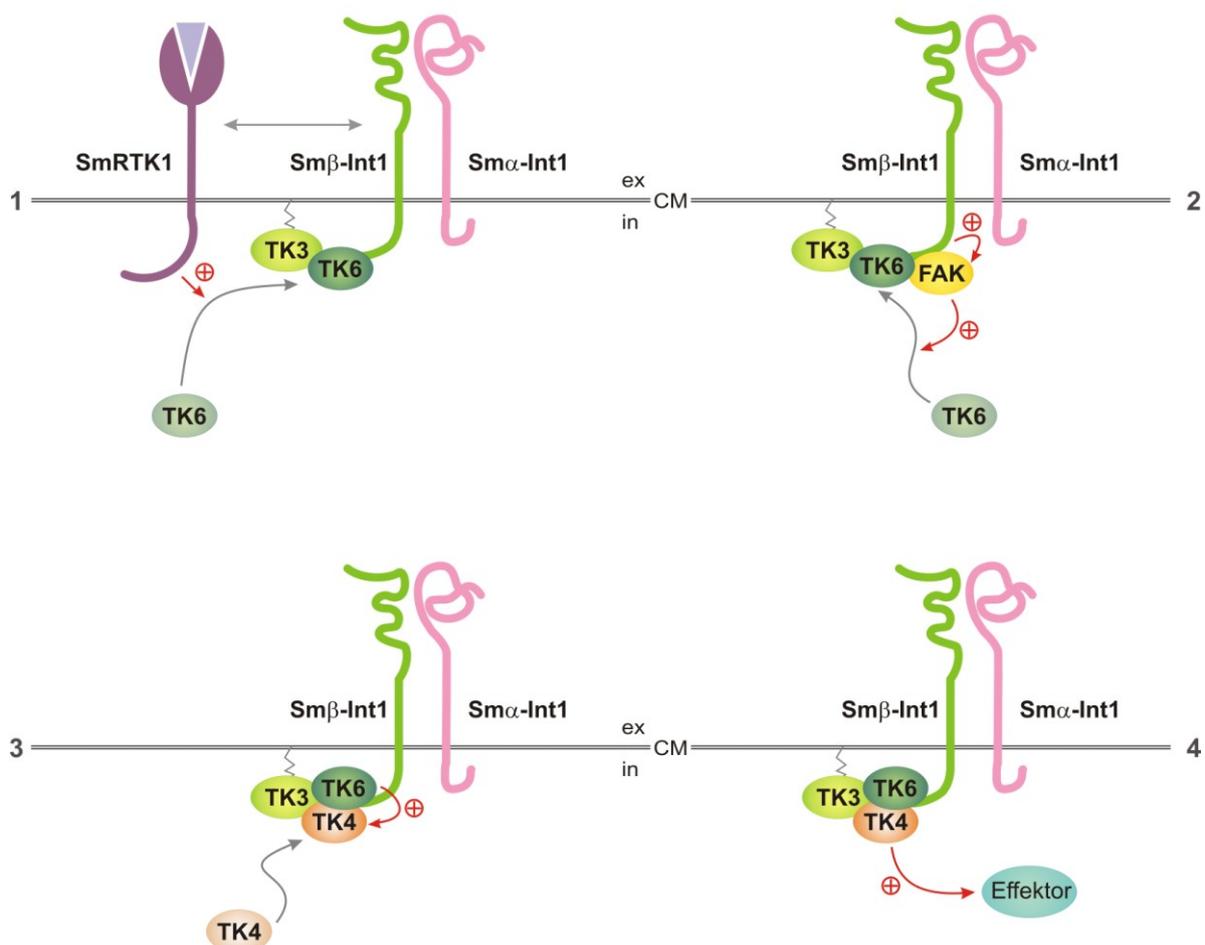
Die Weiterleitung von Signalen ausgehend von Integrin-Rezeptoren kann nicht nur über die Rekrutierung cytoplasmatischer Tyrosinkinasen (Src, Syk) erfolgen, sondern auch durch die interaktive Kooperation mit Rezeptor-Tyrosinkinasen (Guo & Giancotti, 2004). Da die putativ *downstream* von Sm $\beta$ -Int1 agierenden Kinasen SmTK4, SmTK6 und SmTK3 Bindungen mit dem intrazellulären C-Terminus von SmRTK1 eingehen können, ist eine Verbindung zwischen dem Integrin- und dem SmRTK1-Signalweg zu vermuten (vgl. Abschnitt 4.2.1). Biologisch erfüllt eine Kooperation von RTK- und Integrin-Signalwegen eine Funktion bei der Initiation der Zell-Proliferation. Die Zelle benötigt hierfür nicht nur Signale zur Einleitung der Mitose, wie sie von RTKs ausgehen (Hubbard & Till, 2000), sondern ebenfalls Signale für die zu diesem Zweck benötigte Reorganisation des Cytoskeletts. Diese können von Integrin-Rezeptoren vermittelt werden (van der Flier & Sonnenberg, 2001). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf ein mögliches Zusammenspiel von Mucinen und Rezeptor-Tyrosinkinasen bei Signalwegen, die u.a. zur Proliferation von Zellen führen (Singh & Hollingsworth, 2006). So ist es theoretisch denkbar, dass SmRTK1 auch mit dem schistosomalen, transmembranen Mucin kooperiert, das als Interaktionspartner von SmTK6 identifiziert worden ist.

Eine wichtige Rolle in Integrin-Signalwegen spielen auch *focal adhesion kinases* (FAKs). Diese werden über einen noch ungeklärten Mechanismus von  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren aktiviert, wobei es zur Autophosphorylierung eines spezifischen Tyrosinrestes in der FAK kommt. Der so generierte Phosphotyrosinrest dient als hoch-affine Bindestelle für die SH2-Domäne einer Src-Kinase (Mitra & Schlaepfer, 2006). Die Bindung an die FAK führt schließlich zur Aktivierung der Src-Kinase (Playford & Schaller, 2004). FAK-Src-Signalwege sind an der Regulation von zellulären Prozessen wie beispielsweise der Proliferation beteiligt. Die Bildung des FAK-Src-Komplexes ist vermutlich ein alternativer Weg zu der direkten Interaktion der Src-SH3-Domäne mit dem intrazellulären C-Terminus des  $\beta$ -Integrin-Rezeptors (Mitra & Schlaepfer, 2006). Weiterhin ist auch eine FAK-unabhängige Aktivierung der Src-Kinase durch  $\beta$ -Integrin-Rezeptoren beschrieben worden, bei der die cytoplasmatische Domäne eines  $\alpha$ -Integrin-Rezeptors direkt oder indirekt eine wichtige Rolle spielt (Hsia et al., 2005). Eine FAK aus *S. mansoni* (SmFAK) ist bereits in unserer Arbeitsgruppe identifiziert worden und wird gegenwärtig charakterisiert. Sollten zukünftige Lokalisationsstudien eine Co-Lokalisation der FAK und des  $\beta$ -Integrin-Rezeptors vor allem im Ovar und den Testes adulter Schistosomen zeigen, wäre eine derartige Interaktion in Schistosomen sehr wahrscheinlich und könnte durch Yeast Two-Hybrid Experimente analysiert werden.

Aus den Ergebnissen der Bindungsanalysen im Yeast Two-Hybrid System sowie der Erkenntnisse aus anderen Organismen kann das folgende, hypothetische Modell für einen Integrin-vermittelten Signalweg in *S. mansoni* postuliert werden (Abbildung 4.4).

1. SmTK6 wird nach Bindung der SH3-Domäne an den C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 direkt aktiviert. Nach *clustering* des  $\beta$ -Integrin-Rezeptors Sm $\beta$ -Int1 mit der aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1 kann die Aktivierung von SmTK6 alternativ auch über den SmRTK1-C-Terminus erfolgen.
2. Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung von SmTK6 durch die Bildung eines Komplexes mit der SmFAK, die ihrerseits zuvor durch Sm $\beta$ -Int1 aktiviert wurde. Die Interaktion zwischen SmTK6 und SmTK3 könnte ebenso an der Regulation von SmTK6 beteiligt sein. SmTK3 liegt hierbei wahrscheinlich ebenfalls gebunden an den Sm $\beta$ -Int1-C-Terminus vor. Vermutlich kommt es durch Phosphorylierungen in *trans* zwischen beiden Src-Kinasen zur Aktivierung von SmTK6.

3. Die aktive Src-Kinase SmTK6 führt zur Aktivierung der Syk-Kinase SmTK4, die über ihre SH2-Domänen ebenfalls an den intrazellulären Teil von Sm $\beta$ -Int1 gebunden hat. SmTK3 spielt in diesem Zusammenhang eine noch nicht genauer charakterisierte Rolle.
4. Durch SmTK4 kommt es zur Aktivierung von noch unbekanntem *downstream* Effektormolekülen, die an zellulären Prozessen wie zum Beispiel der Cytoskelett-Reorganisation oder Proliferation der Zelle beteiligt sind.



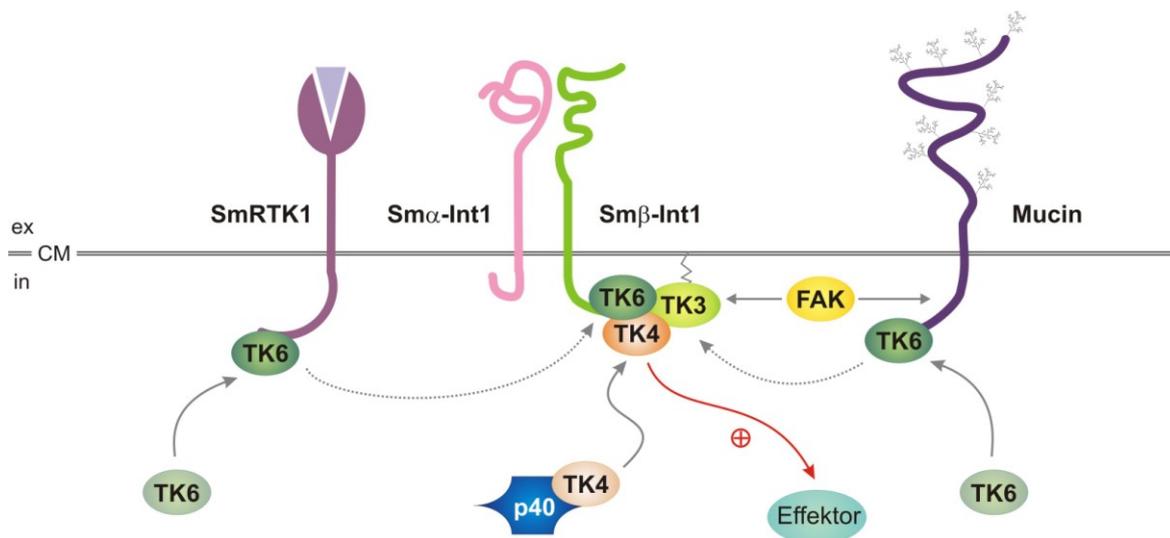
**Abbildung 4.4:** Modell zur Interaktion mit Sm $\beta$ -Int1

Aus den Ergebnissen der Bindungsanalysen im Yeast Two-Hybrid System sowie den Erkenntnissen aus anderen Organismen wurde dieses hypothetische Modell erstellt. 1: SmTK6 wird nach Bindung an den intrazellulären C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 direkt durch diesen, oder im Zusammenspiel mit dem intrazellulären Teil von SmRTK1 aktiviert. 2: Alternativ kann die Aktivierung von SmTK6 auch über SmFAK erfolgen. Ebenfalls ist eine Phosphorylierung in *trans* zwischen SmTK6 und SmTK3 vorstellbar 3: SmTK4 wird zu dem C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 rekrutiert, bindet an diesen und wird durch die aktive SmTK6 aktiviert. 4: SmTK4 führt ihrerseits zu der Aktivierung von *downstream* - Effektormolekülen (nähere Erläuterungen siehe Text). [CM: Cytoplasmamembran, ex: extrazellulär, in: intrazellulär]

Lokalisationsstudien zeigten, dass in Ovar und Testes adulter Schistosomen sowohl Sm $\alpha$ - und Sm $\beta$ -Int1 als auch die drei cytoplasmatischen Tyrosinkinase SmTK4, SmTK6 und SmTK3, sowie die Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1 co-lokalisieren. Mit den Yeast Two-Hybrid Ergebnissen zusammengekommen ist daher anzunehmen, dass die in Abbildung 4.4 dargestellten Signaltransduktionsprozesse in diesen Reproduktionsorganen ablaufen. Aufgrund der vorliegenden Daten wird eine Rolle dieser Moleküle in einem oder mehreren Signalwegen der Oogenese und Spermatogenese postuliert (vgl. Abschnitt 4.2.2).

### 4.3 Modell der SmTK4-Signalkaskade

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Yeast Two-Hybrid Analysen sowie aus Erkenntnissen über derartige Signalkaskaden in anderen Organismen wurde das folgende hypothetische Modell einer SmTK4-Signalkaskade erstellt (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5:** Modell zur SmTK4-Signalkaskade

Aus den Ergebnissen der Interaktionsanalysen im Yeast Two-Hybrid System wurde dieses vereinfachte, hypothetische Modell erstellt, in dem nur die stärksten der identifizierten Interaktionen berücksichtigt wurden. Die Src-Kinase SmTK6 wird durch die Interaktion mit dem C-Terminus des transmembranen Mucins oder der Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1 zur Cytoplasmamembran (CM) rekrutiert und aktiviert. SmTK6 führt ihrerseits zur Rekrutierung der Syk-Kinase SmTK4 und zu deren Aktivierung. SmTK6, SmTK4 und SmTK3 liegen als ein Kinasekomplex unterhalb eines Integrin-Rezeptor-Heterodimers vor und leiten Signale von diesem weiter in das Zellinnere. Die *in silico* anhand von *S. mansoni*-Genomdaten identifizierte SmFAK könnte ein Mediator zwischen den Signalwegen darstellen. Durch die aktive SmTK4 kommt es zur Aktivierung noch unbekannter *downstream*-Effektormoleküle (nähere Erläuterungen siehe Text). [ex: extrazellulär, in: intrazellulär]

FAK-Kinasen co-lokalisieren mit dem cytoplasmatischen Teil von transmembranen Mucinen. Die Interaktion eines Mucin-C-Terminus mit einer FAK führt vermutlich zu der Rekrutierung einer Src-Kinase zur Cytoplasmamembran (Singh & Hollingsworth, 2006). Da FAK-Kinasen auch unterhalb von Integrin-Rezeptoren agieren (vgl. Abschnitt 4.2.3), stellt SmFAK somit möglicherweise einen Mediator zwischen den Signaltransduktionsprozessen *downstream* des  $\beta$ -Integrin-Rezeptors und des Mucins dar. Durch die Interaktion von SmFAK mit dem Mucin-C-Terminus könnte SmTK6 zur Plasmamembran rekrutiert und durch SmFAK selber oder durch den C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 aktiviert werden (vgl. Abschnitt 4.2.3). Möglich wäre auch die Aktivierung von SmTK6 durch den C-Terminus einer im *cluster* mit Sm $\beta$ -Int1 vorliegenden SmRTK1 (vgl. Abschnitt 4.2.1 und 4.2.3). Eine in *trans*-Phosphorylierung der Src-Kinase SmTK6 durch die Src-Kinase SmTK3 kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden (vgl. Abschnitt 4.1.3). Durch die aktive SmTK6 kommt es zur Rekrutierung der *downstream* im Signalweg gelegenen SmTK4 an die Cytoplasmamembran. Im inaktiven Zustand wird SmTK4 im Cytoplasma durch Bindung eines HSPs (Smp40) vor dem Abbau geschützt (vgl. Abschnitt 4.1.4.1). SmTK4 bindet an der Innenseite der Cytoplasma-membran ebenfalls an den C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 und wird schließlich durch SmTK6-vermittelte Phosphorylierung aktiviert. Die aktive SmTK4 führt dann schließlich zur Aktivierung noch unbekannter *downstream*-Effektormoleküle (vgl. Abschnitt 4.1.4.3).

Da SmRTK1, die beiden Integrin-Rezeptoren sowie die drei cytoplasmatischen Tyrosinkinasen eine Co-Lokalisation im Ovar adulter Weibchen zeigen, ist eine Beteiligung von SmRTK1 an diesem Signalweg in Oocyten möglich. Neben bereits vorliegenden Immunolokalisations-Daten (Vicogne et al., 2003) zeigten auch erste eigene *in situ*-Hybridisierungen, dass SmRTK1 in den Testes des Männchen und dem Ovars der Weibchen (nicht jedoch im Vitellarium) exprimiert wird (nicht publiziert). Somit spielt SmRTK1 in diesen Geweben ebenfalls eine Rolle. Lokalisationsstudien für das Mucin sowie für SmFAK stehen noch aus. Sollten diese ebenfalls eine Expression in den Reproduktionsorganen zeigen, kann angenommen werden, dass die in Abbildung 4.5 schematisch dargestellte SmTK4-Signalkaskade im Ovar und Testes abläuft und eine Rolle bei der Regulation der Oogenese und Spermatogenese spielen könnte (vgl. Abschnitte 4.2.2 und 4.2.3).

Für Integrin-Rezeptoren sind Funktionen in der Gametogenese beschrieben (Shinohara et al., 1999; Linfor & Berger, 2000), aber auch für zelluläre Tyrosinkinasen ist eine Beteiligung an der Oogenese, Spermatogenese und Fertilisation bekannt (Kierszenbaum, 2006; Zheng et al., 2007; Braydich-Stolle et al., 2007). Von testikulären Zellen werden während der Spermatogenese u.a. Src-Kinasen exprimiert. Diese kommen dabei in zwei

Formen vor - einer Volllängenform sowie einer verkürzten Form, die beide die gleiche Funktion erfüllen und sich gegenseitig auch ersetzen können. Während die Volllängenform in verschiedenen, auch somatischen Geweben vorkommt, ist die Expression der verkürzten Form jedoch auf die Testes beschränkt (Kierszenbaum, 2006). In *S. mansoni* sind bisher noch keine verkürzten Formen von Tyrosinkinasen beschrieben worden. Allerdings zeigte eine Analyse der kodierenden SmTK4-Sequenz im Vergleich zu den Daten aus den *S. mansoni* Genomprojekten, dass es vermutlich auch eine kürzere Variante dieser Syk-Kinase gibt, der ein Teil der *linker*-Region sowie ein Teil des C-Terminus fehlt (unveröffentlicht).

Ein mögliches *downstream* - Effektormolekül von SmTK4 in dem postulierten Signalweg wäre Cortactin. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor mit mehreren HS1-*repeats* (Aktin-Bindedomänen) und einer C-terminalen SH3-Domäne (Daly, 2004). Im nicht-phosphorylierten Zustand liegt dieser im Cytoplasma der Zelle vor, mit verstärkter Konzentration in Cytoskelett-assoziierten Strukturen, die reich sind an *focal adhesion* -Proteinen (Maruyama et al., 1996). Im Zellkultur-System wurde beschrieben, dass nach Adhäsion von u.a. Integrin-Rezeptoren an die extrazelluläre Matrix verschiedene Proteine phosphoryliert werden (Suen et al., 1999; Arderiu et al., 2002). Als ein frühes Ereignis kommt es hierbei zu der Phosphorylierung und Aktivierung einer Syk-Kinase durch eine Src-Kinase. Die aktive Syk-Kinase phosphoryliert wiederum assoziiertes Cortactin. In diesem Zuge kommt es auch zur Phosphorylierung einer FAK (Arderiu et al., 2002). Nach Tyrosin-Phosphorylierung wird Cortactin in den Zellkern transportiert, wo er an der Transkriptionsregulation beteiligt ist und zu der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts und der Differenzierung der Zelle führt (Maruyama et al., 1996). Diese Signalwege sind bisher nur für Blut- und Immunzellen beschrieben worden (Gallet et al., 1999). Die Identifizierung eines Cortactin-Homologs in den *S. mansoni* - Datenbanken (predicted CDS: 29328.m000115) lässt jedoch die Vermutung zu, dass möglicherweise auch in Schistosomen die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors durch eine Syk-Kinase im Zusammenspiel mit Integrin-Rezeptoren und einer Src-Kinase stattfindet und zur Zelldifferenzierung in den Gonaden führen kann. Eine Beteiligung von Cortactin an der Spermatogenese (Kierszenbaum, 2006) und der Oogenese (Somogyi & Rorth, 2004) ist bereits postuliert worden.

#### 4.4 Versuche zur Herstellung von Antikörpern gegen SmTK4 und SmTK6

Für die weitere Charakterisierung der Tyrosinkinasen SmTK4 und SmTK6 auf Proteinebene wurde versucht, polyklonale Antikörper gegen diese beiden Tyrosinkinasen herzustellen. Hierfür sollten Subfragmente beider Moleküle rekombinant in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und schließlich für die Immunisierung eingesetzt werden.

Die bakterielle Expression schistosomaler Proteine erwies sich als sehr schwierig. Verschiedene Vektorsysteme und *E. coli* - Stämme sowie unterschiedliche Bedingungen für die Expression (Temperatur, Dauer, Induktor-Konzentration, t-Helfer-Plasmide) wurden getestet, jedoch ohne Erfolg. Erst durch die Verwendung eines pBAD-TOPO/Thio-Vektors, über den Proteine fusioniert mit einem N-terminalen Thioredoxin-Teil sowie C-terminalem V5- und His-Tag exprimiert werden, konnten SmTK4- und SmTK6-Subfragmente erfolgreich exprimiert werden. Für die Herstellung polyklonaler Antikörper, die möglichst spezifisch gegen SmTK4 bzw. SmTK6 gerichtet sind, wurde ein Teil der „linker“-Region von SmTK4 sowie die *unique site* von SmTK6 als immunogenes Proteinfragment ausgewählt. Diese Bereiche umfassen keine konservierten Domänen und sollten daher spezifisch für die beiden Kinasen sein und zu keinen Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen Tyrosinkinasen aus *S. mansoni* führen.

Unter Verwendung des pBAD-TOPO/Thio-Vektors wurden in *E. coli* ein Subfragment der SmTK4-„linker“-Region sowie die SmTK6-*unique site* rekombinant exprimiert und über den C-terminalen His-Tag mittels NiNTA-Agarose aufgereinigt. Die Überprüfung der Elutions-Fraktionen zeigte, dass diese neben den rekombinant exprimierten Proteinen noch weitere *E. coli* - Proteine enthielten (vgl. Abbildungen 3.39 und 3.45). Für eine Immunisierung sollte das Expressionsprodukt jedoch möglichst frei von weiteren Proteinen sein, so dass die Elutions-Fraktionen weiter aufgereinigt werden mussten. Hierzu wurden die vereinigten Eluate auf SDS-Maxi-Gelen mit höherer Auflösung aufgetrennt, nach einer speziellen Färbung der Gele die Zielproteine ausgeschnitten, elektroeluiert und aufkonzentriert. Über diese Methode war es möglich, ausreichende Mengen der rekombinant exprimierten SmTK4-„linker“-Region sowie SmTK6-*unique site* für eine Immunisierung aufzureinigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur das Subfragment der SmTK4-„linker“-Region für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Eine Immunisierung mit der SmTK6-*unique site* konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr erfolgen.

Die erhaltenen anti-SmTK4-Antiseren wurden in Western-Blot - Analysen auf ihre Reaktion mit *S. mansoni* - Gesamtprotein getestet. Unter Verwendung verschiedener Seren und Konzentrationen wurden in ersten Western-Blots jedoch keine Proteinbanden detektiert.

Nach einer Affinitätsreinigung der Seren gegen das für die Immunisierung verwendete Antigen, wurde keine Bande der für SmTK4 erwarteten Größe von 140 kDa, sondern ausschließlich ein 40 kDa großes Protein detektiert (vgl. Abbildung 3.42). Hierbei kann es sich aufgrund der geringen Größe nicht um SmTK4 handeln. Die Immunisierung erfolgte mit einem Fusionsprotein aus dem Subfragment der SmTK4-„linker“-Region und einem Thioredoxin-Teil. Theoretisch werden bei der Immunisierung somit Antikörper gegen beide Teile des Fusionsproteins gebildet. Dass es sich bei der detektierten 40 kDa-Bande um das Thioredoxin aus *S. mansoni* handelt, kann jedoch ausgeschlossen werden, da dieses eine Größe von etwa 12 kDa besitzt (Alger et al., 2002). Das zur Immunisierung verwendete rekombinant exprimierte Protein wurde im Western-Blot jedoch von den Seren erkannt. Hingegen führten Test-Immunolokalisationen mit den affinitätsgereinigten Seren zu keinen Ergebnissen. Da die Immunisierung mit denaturiertem Protein erfolgte, ist es möglich, dass Antikörper gegen Epitope gebildet wurden, die im nativen, gefalteten Zustand des Proteins nicht zugänglich sind. Dies würde erklären, warum die Seren in der Immunolokalisation keine Reaktion zeigten. Die fehlende, oder unspezifische Reaktion im Western-Blot ist hiermit jedoch nicht zu begründen, da für den Immunoblot das Schistosomen-Gesamtprotein zuvor mittels einer denaturierenden SDS-Page aufgetrennt wurde. In den ersten Western-Blots konnte vermutlich kein Protein von den Seren erkannt werden, weil die Konzentration des Antikörpers zu gering war. Nach der Affinitätsreinigung wurde dieser jedoch aufkonzentriert und detektierte unspezifisch ein 40 kDa-Protein. Die hergestellten anti-SmTK4-Antiseren konnten zur Charakterisierung von SmTK4 auf Proteinebene somit nicht verwendet werden. Die Expression weiterer Subfragmente von SmTK4 schlug fehl (vgl. Kapitel 3.8.5), so dass im Rahmen dieser Arbeit keine Immunisierungen mit alternativen SmTK4-Proteinfragmenten erfolgen konnten. Bei zukünftigen Versuchen zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen SmTK4 könnte in Betracht gezogen werden, die Immunisierungen mit nativem Protein durchzuführen. Hierfür würde das SmTK4-Subfragment nach rekombinanter Expression über spezielle Protokolle (Marshak et al., 1995) nativ aufgereinigt und für eine Immunisierung eingesetzt. Dies hätte den Vorteil, dass die Möglichkeit der Bildung von Antikörpern gegen „interne“ Epitope des Antigens reduziert ist. Eine Affinitätsreinigung der Seren könnte in diesem Fall gegen natives, an eine immobile Matrix gekoppeltes Protein erfolgen.

Eine mögliche Ursache für die fehlgeschlagene oder nur sehr schwache Expression von Subfragmenten der schistosomalen Tyrosinkinasen SmTK4 und SmTK6 in *E. coli* liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen *codon usage* der beiden Organismen (vgl. Kapitel 3.8.6). Schon wenige, von *E. coli* selten verwendete Codons in der zu exprimierenden

heterologen Sequenz reichen aus, damit ein Protein nicht oder nur in geringer Menge exprimiert werden kann (Brinkmann et al., 1989). Ein Vergleich der *codon usages* von *S. mansoni* und *E. coli* offenbarte eine Reihe von Unterschieden. Insgesamt beträgt der Unterschied im Codon-Gebrauch knapp 17%, bezogen auf einzelne Codons treten Diskrepanzen von bis zu 30% auf. Eine Analyse der kodierenden Sequenzen für die Subfragmente der SmTK4-„linker“-Region im Bezug auf die *codon usage* von *E. coli* zeigte, dass rund 45% der Aminosäuren in *E. coli* mit einer Häufigkeit von unter 20% und 5 - 11% mit einer Häufigkeit von unter 10% von den gleichen Codons kodiert werden, wie in *S. mansoni*. Für eine erfolgreiche Expression ist dies als kritisch anzusehen und vermutlich der Grund für die nur schwache oder fehlgeschlagene Expression. In *E. coli* selten vorhandene tRNAs können durch t-Helfer-Plasmide kompensiert werden. Der Einsatz solcher Helfer-Plasmide kann bei der Expression von heterologen Genen in *E. coli* dazu beitragen, dass es nicht zu einer Verzögerung oder zu einem Abbruch der Translation aufgrund eines erschöpften internen tRNA-pools kommt. T-Helfer-Plasmide kodieren jedoch nur für wenige tRNAs und im Falle von *S. mansoni* nicht für die kritischen und konnten somit auch nicht zu einer Verbesserung der Proteinexpression führen. Für die Expression von Subfragmenten schistosomaler Proteine sollten daher alternative Systeme in Betracht gezogen werden. Die zellfreie *in vitro*-Expression über Reticulocyten-Extrakte oder die Expression in Standard-Hefestämmen führt zu deutlich geringen Ausbeuten, die für eine Immunisierung nicht ausreichen. Eine Alternative wäre die Expression in Insekten-Zellen, in denen das Protein nach seiner Expression auch posttranslational modifiziert und korrekt gefaltet werden kann.

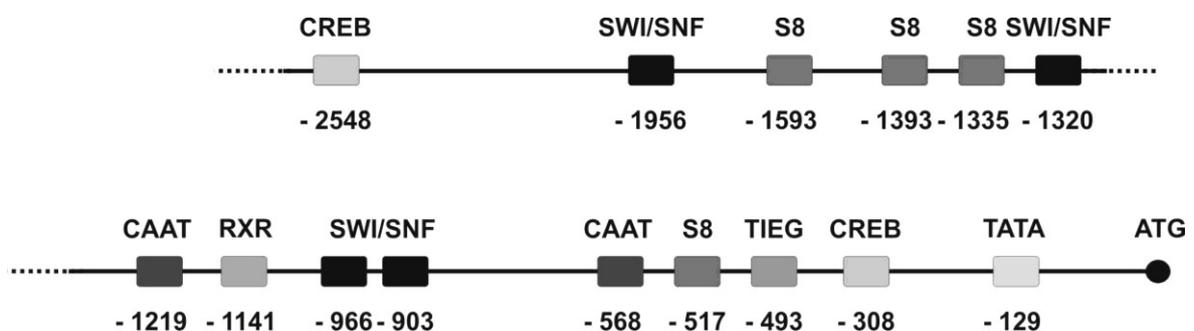
#### 4.5 Analyse der genomischen Sequenzen der SmTK4- und SmTK6-Gene

Mit Hilfe der Sequenzen aus dem *S. mansoni*-Genomprojekt wurden die genomischen Strukturen der SmTK4- und SmTK6-Gene aufgeklärt. Die kodierende Sequenz für die Syk-Kinase SmTK4 ist im Genom von *S. mansoni* auf 16 Exons und 15 Introns mit einer Gesamtgröße von etwa 71 kb verteilt. Während das SmTK4-Gen viele kleinere Exons umfasst, ist das SmTK6-Gen auf nur 6 größere Exons und 5 Introns verteilt mit einer Gesamtgröße von über 18 kb. Gene aus *S. mansoni* zeigen große Variationen in ihrer genomischen Struktur. Während manche Gene aus einer Vielzahl kleiner Exons aufgebaut sind (Sm $\alpha$ -Int1, SmTK4), weisen andere Gene nur wenige (SmTK6) oder gar keine

(p14, Köster et al., 1988; SmDia1, nicht publiziert) Introns auf. Die Größe der Introns kann beachtlich sein und über 10 kb umfassen (SmTK4).

Die Beobachtungen in *S. mansoni* stimmen mit den Kenntnissen aus anderen eukaryotischen Organismen überein (Gilbert, 1978). Auch im humanen Genom sind die Anzahl und die Länge der Introns variabel. So gibt es Gene ohne Introns (Histon-Gene) aber auch Gene mit Introns von insgesamt ca. 2,5 Millionen bp (Dystrophin-Gen). Ebenfalls die Länge der Introns variiert von 31 bp (SV-40-Gen) bis hin zu über 210.000 bp (Dystrophin-Gen) (Burglin & Barnes, 1992). Während die Gene für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Genom der Wirbeltiere keine Introns aufweisen, sind diese bei Homologen aus Nematoden jedoch vorhanden (Knippers, 2001). Introns, lange Zeit als funktionslose DNA-Abschnitte angesehen, werden mittlerweile Funktionen bei der Regulation der Gen-Aktivität zugeschrieben (Abelson, 1992).

Um erste Hinweise auf die mögliche Regulation der gewebespezifischen Expression von SmTK4 zu erlangen, wurde die 2627 bp lange, bekannte 5'-Region des SmTK4-Gens *in silico* mit Hilfe des Programms MatInspector auf das Vorhandensein konservierten Transkriptionsfaktorbindestellen analysiert (vgl. Kapitel 3.10.2, Anhang 5.5, Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6:** Schematische Darstellung der 5'-Region des SmTK4-Gens

Die in der 2627 bp langen 5'-Region des SmTK4-Gens identifizierten, putativen Promotorelemente sind mit ihren relativen Lage zum ATG-Startcodon (+1) wiedergegeben.

In der Analyse der SmTK4-5'-Region wurde 129 bp oberhalb des Translationsstartes (ATG-Startcodon) eine potentielle TATA-Box identifiziert. TATA-Boxen liegen in eukaryotischen Promotoren meist 26 bis 34 bp 5'-wärts des Transkriptionsstartes. 3'-wärts

dieser TATA-Box liegt im Abstand von 26 bp eine Sequenzabfolge im SmTK4-Gen, die mit dem Konsensus einer Inr (Initiator)-Sequenz übereinstimmt. Inr-Sequenzen sind pyrimidinreiche Abschnitte, die in vielen eukaryotischen Promotoren das Startnukleotid (Transkriptionsstart) beinhalten. Wahrscheinlich befindet sich auch im SmTK4-Gen der Transkriptionsstart innerhalb dieser Sequenz, der experimentell jedoch noch nicht bestimmt wurde.

Weiter 5'-wärts der TATA-Box wurden zwei CREB-Bindestellen (-308, -2548) gefunden. CREBs (*cyclic AMP response element (CRE)-binding protein*) vermitteln in Folge der Stimulation verschiedenster Signalkaskaden, induziert durch Peptid-Hormone, Wachstumsfaktoren oder Proteinkinasen, die Transkription von Zielgenen (Shaywitz & Greenberg, 1999).

An der Position -493 liegt eine putative Bindestelle für einen TIEG (*TGF-beta-inducible early gene*) - Protein. TIEGs sind Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, welche in TGF $\beta$ -induzierten Signalwegen zusammen mit Smads agieren und damit an der Regulation von Zell-Proliferationen und Zell-Wachstum beteiligt sind (Cook & Urrutia, 2000). Der TGF $\beta$ -/Smad-Signalweg ist der am besten charakterisierte Signalweg in Schistosomen (LoVerde et al., 2007) und vermutlich an der Regulation mitotischer Prozesse im Schistosomen-Weibchen beteiligt (vgl. Kapitel 1.3). Möglicherweise wird auch die Expression des SmTK4-Gens über den TGF $\beta$ -Signalweg reguliert. Bekräftigt wird diese Vermutung durch Lokalisationsstudien, die zeigten, dass der TGF $\beta$ -Rezeptor I (SmT $\beta$ RI) u.a. im Ovar des Schistosomen-Weibchens exprimiert wird (Knobloch et al., 2004). SmT $\beta$ RI könnte in diesem Organ somit eine Signalkaskade initiieren, die ein TIEG beinhaltet und letztlich zur der Expression des SmTK4-Gens führt.

In der 5'-Region des SmTK4-Gens wurden des Weiteren vier Bindestellen (-517, -1335, -1392, -1593) für S8-Homöodomänen-Proteine identifiziert. Diese Proteine stimulieren Transkription (Norris & Kern, 2001) und gehören zu der *paired* Homöodomänen-Subfamilie, die auch Schistosomen-Homologe umfasst (Webster & Mansour, 1992).

Zwei potentielle CAAT-Boxen (-568, -1219) wurden ebenfalls identifiziert, wobei es sich um ubiquitäre Promotorelemente handelt, die üblicherweise jedoch um die 100 bp oberhalb des Transkriptionsstartes lokalisiert sind. Ihre Beteiligung an der Transkriptions-Regulation des SmTK4-Gens ist daher aufgrund ihrer Position weit 5'-wärts des Startcodons fraglich.

Eine Bindestelle für einen Retinoid-Säure-Rezeptor (RXR) wurde ebenfalls identifiziert (Position - 1141). Retinoinsäure-Rezeptoren spielen eine Rolle bei der geschlechts-, gewebe- und entwicklungsspezifischen Regulation von Genen, die u.a. an Differenzierungsprozessen beteiligt sind (Pemrick et al., 1994), so dass eine Funktion bei der Expression des SmTK4-Gens vorstellbar ist. RXR-Homologe aus *S. mansoni* sind bereits identifiziert worden und scheinen auch in Schistosomen eine Rolle bei gewebe- und geschlechtsspezifischer Genexpression in den Gonaden zu spielen (Freebern et al., 1999a; Freebern et al., 1999b; Fantappie et al., 2001).

Interessanter Weise sind in der 5'-Region des SmTK4-Gens an vier Positionen (- 903, - 966, - 1320, - 1956) Bindestellen für SWI/SNF-Komplex-Proteine lokalisiert. SWI/SNF-Komplexe sind Chromatin-remodellierende Komplexe, die an der gewebespezifischen Transkription von Genen sowie an der Kontrolle von Zell-Proliferationen beteiligt sind (Simone, 2006). Die 60 kDa-Untereinheit eines SWI/SNF-Komplexes wurde als der stärkste *downstream*-Bindungspartner von SmTK3 in einem Yeast Two-Hybrid Screening identifiziert (Knobloch, 2002; Manuskript in Vorbereitung). Kinasen können Genexpression durch die direkte Interaktion mit Chromatin-modifizierenden Enzymen regulieren (Gillespie & Rudnicki, 2004). Die meisten Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes interagieren mit gewebespezifischen Faktoren und sind potentielle Ziele für Kinase-abhängige Signalkaskaden (Simone, 2006). Wahrscheinlich findet auch in *S. mansoni* eine direkte Interaktion von SmTK3 mit einer Untereinheit eines SWI/SNF-Komplexes statt. SmTK3 spielt somit möglicherweise nicht nur eine direkte Rolle bei der Regulierung der Aktivität von SmTK6 und damit vermutlich auch von SmTK4 (vgl. Abschnitt 4.1.3), sondern ist über die Interaktion mit einem SWI/SNF-Komplex auch an der Regulation der gewebespezifischen Expression des SmTK4-Gens beteiligt. Die im Yeast Two-Hybrid System identifizierte Untereinheit eines SWI/SNF-Komplexes aus *S. mansoni* wird derzeit im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe charakterisiert. Sollten zukünftige Studien eine Co-Lokalisation der Expression dieser Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes mit den Tyrosinkinase SmTK3 und SmTK4 zeigen, so kann die Interaktion zwischen SmTK3 und dem SWI/SNF-Komplex und damit die postulierte Beteiligung an der Regulation der SmTK4-Expression als wahrscheinlich gelten.

## 4.6 Funktionelle Analysen von SmTK4: Inhibitorstudien und RNAi

Die Ergebnisse der Yeast Two-Hybrid Analysen führten zu der Postulierung einer SmTK4-Signalkaskade im Ovar und den Testes adulter Schistosomen und einer Funktion dieser Syk-Kinase in der Gametogenese von *S. mansoni* (vgl. Abschnitt 4.2.3 und 4.3). Vermutlich ist SmTK4 im Ovar und den Testes im Zusammenspiel mit Integrin-Rezeptoren, aber auch mit Komponenten des Cytoskeletts in Prozesse involviert, die Zell-Proliferation und/oder Differenzierung steuern. Für die Differenzierung von Keimzellen während der Oogenese und der Spermatogenese ist in Vertebraten und Invertebraten die Reorganisation des Aktin- und Tubulin-Cytoskeletts von großer Bedeutung (Mansir & Justine, 1998; Sun & Schatten, 2006; Xiao & Yang, 2007). Eine Beteiligung von Syk-Kinasen an diesen Prozessen, über die direkte Phosphorylierung von Cytoskelett-Bestandteilen (Peters et al., 1996) oder indirekt über die Aktivierung weiterer Signalmoleküle (Bellier et al., 1997; Jiang et al., 2002), ist bereits gezeigt worden. Erfüllt SmTK4 die postulierte Funktion bei der Gametogenese von *S. mansoni*, so müsste sich eine Inhibition dieses Moleküls auf das Ovar und die Testes auswirken. Um die Funktion von SmTK4 in diesen Organen/Geweben genauer untersuchen zu können, wurde diese Syk-Kinase in adulten Schistosomen auf zwei verschiedene Weisen inhibiert und die Effekte auf die Reproduktionsorgane morphologisch analysiert. Hierfür wurden zum einen ein Syk-Kinase-spezifischer Inhibitor (Abschnitt 4.6.1) und zum anderen die erst kürzlich für adulte Schistosomen etablierte RNAi-Technik (Abschnitt 4.6.2) verwendet. Die Untersuchung möglicher Effekte auf die Reproduktionsorgane erforderte eine detaillierte morphologische Darstellung. Diese wurde durch die Etablierung einer *whole mount* - Färbung mit Karminrot mit anschließender konfokaler Lasermikroskopie ermöglicht. Diese Methode wurde erstmals 1998 für eine Darstellung der inneren Morphologie adulter Schistosomen eingesetzt (Machado-Silva et al., 1998) und auch für eine Darstellung des Reproduktionssystems verwendet (Neves et al., 2005). Das bislang nur von einer Arbeitsgruppe verwendete Protokoll wurde für die Färbung von Pärchen sowie für eine detaillierte, zellgenaue Darstellung der Reproduktionsorgane von *S. mansoni* optimiert.

Als Vorarbeiten für die Analyse Inhibitor- oder RNAi-behandelter Schistosomen, wurde zunächst die Morphologie der Reproduktionsorgane (vor allem Ovar, Ootyp und Testes) unbehandelter paarungserfahrener sowie paarungsunerfahrener Weibchen und Männchen von *S. mansoni* untersucht (vgl. Abbildung 3.48, Kapitel 3.11).

*S. mansoni*-Weibchen, die sich in einem Paarungskontakt befinden, zeigen im Vitellarium sogenannte *vitelline glands*, die aus einer Vielzahl von Vitellocyten mit einem

zentralen Nukleus unregelmäßiger Größe, bestehen (Neves et al., 2005). Das Ovar enthält Keimzellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung. Während sich im anterioren Bereich kleine, undifferenzierte Zellen befinden (Oogonien), reifen die Zellen zum posterioren Ende hin und nehmen an Größe zu. Im posterioren Bereich des Ovars befinden sich die reifen Oocyten, große hexagonale Zellen der Meiose II, die einen zentralen Nukleus aufweisen (Neves et al., 2005). Die Differenzierung und Reifung der Oocyten erfolgt im Ovar des Schistosomen-Weibchens somit von anterior nach posterior, wo das Ovar in den Ovidukt mündet. Während sich die undifferenzierten Zellen noch in einem dichten Zellverband befinden, liegen die reifen Oocyten eher einzeln und mit freien Bereichen zwischen benachbarten Oocyten vor. Die reifen Oocyten werden in den Ovidukt abgegeben. Eine Ausstülpung der Ovidukt-Wand bildet das elongierte *Receptaculum seminis*, in dem reife Spermien des Männchens gespeichert werden. Bei der Passage des *Receptaculum seminis* erfolgt die Befruchtung der Oocyte, die weiter über den Ovidukt in den anterior des Ovars gelegenen Ootyp transportiert wird. In den Ootyp mündet auch der Vitellodukt, über den die reifen Vitellocyten transportiert werden. Im Ootyp wird ein Schistosomen-Ei aus 30 - 40 Vitellocyten und einer Oocyte zusammengesetzt. Der Ootyp ist von Mehlischen Drüsen umgeben, die Substanzen sekretieren, die vermutlich an der Bildung der Eischale beteiligt sind (Mehlhorn & Piekarski, 1998). Das fertige Ei, das bei *S. mansoni* einen lateral gelegenen Stachel aufweist (Mehlhorn & Piekarski, 1998), wird vom Ootyp in den Uterus transportiert, der in einem Genitalporus unterhalb des Bauchsaugnapfes endet.

Das Ovar und das Vitellarium von paarungsunerfahrenen Weibchen aus unisexuellen Infektionen sind wesentlich kleiner als die von paarungserfahrenen Weibchen aus bisexuellen Infektionen (vgl. Abbildung 3.49). Das Ovar der paarungsunerfahrenen Weibchen enthält nur Keimzellen in einem frühen Stadium der Reifung ohne Differenzierung (Erasmus, 1973; Popiel et al., 1984; Neves et al., 2005), so dass nur kleine, einheitliche Zellen vorliegen und große Oocyten vollständig fehlen. Auch das Vitellarium solcher Weibchen ist undifferenziert und enthält nur wenige Vitellocyten (Neves et al., 2005). Im Weibchen wird durch die Paarung somit nicht die Differenzierung von Keimzellen aus pluripotenten Stammzellen initiiert. Vielmehr kommt es zur Proliferation und Differenzierung von Keimzellen, die bereits vor der Paarung angelegt sind, zu reifen Oocyten oder Vitellocyten (Kunz, 2001). Der Ootyp paarungsunerfahrener Weibchen ist angelegt, aber kleiner als der von paarungserfahrenen Weibchen und ebenfalls von Mehlischen Drüsen umgeben. Interessanter Weise befindet sich am posterioren Ende des Ootyps, in den der Ovidukt und der Vitellodukt münden, bei virginen Weibchen aus unisexuellen Infektionen eine filamentöse Struktur. Diese

bislang noch nicht beschriebene Struktur wurde im Zuge der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen entdeckt und kommt nicht am Ootyp paarungserfahrener oder entpaarter Weibchen vor. Scheinbar verschließt diese Struktur den Ootyp von Weibchen, die noch nie in einem Paarungskontakt mit einem Männchen waren. Hierdurch wird vermutlich verhindert, dass prä-mature Oocyten und Vitellocyten über Ovidukt und Vitellodukt in den Ootyp transportiert werden. Im Zuge der Paarungs-induzierten Maturation des Weibchens wird diese filamentöse Struktur dann möglicherweise direkt durch Signale des Männchens oder indirekt, beispielsweise nach dem Kontakt reifer Oocyten und/oder Vitellocyten aufgelöst. In entpaarten Weibchen ist diese Struktur nicht mehr vorhanden, vermutlich da sich diese bereits einmal in einem Paarungskontakt befunden haben. Beobachtungen zeigen, dass Weibchen aus unisexuellen Infektionen keine Eier legen, wohingegen entpaarte Weibchen entgegen der Erwartung teils abnormale Eier produzieren (Shaw & Erasmus, 1981; Neves et al., 2005). Vermutlich können bei entpaarten Weibchen, bei denen sich Ovar und Vitellarium durch die Entpaarung de-differenziert haben, unreife Vitellocyten und/oder Oocyten durch das Fehlen der filamentösen Struktur am Eingang des Ootyps in diesen transportiert werden, wo es in Folge zur Zusammensetzung abnormaler Eier kommt.

*S. mansoni*-Männchen besitzen Testes, die aus mehreren, im ventralen Bereich miteinander verbundenen Loben bestehen (vgl. Abbildung 3.48). Die Testesloben scheinen von einer dünnen, Albuginea-ähnlichen Verkapselung umgeben zu sein (Machado-Silva et al., 1998). Die Differenzierung von Spermien aus Spermatogonien über Spermatocyten und Spermatiden (Spermatogenese) erfolgt vom dorsalen zum ventralen Bereich der Testes hin. Während sich somit im dorsalen Bereich hauptsächlich größere Keimzellen befinden, sind die reifen, elongierten Spermien im ventralen Bereich der einzelnen Loben lokalisiert. Von hier aus werden die Spermien in den *Vas deferens* transportiert. Das Vorhandensein eines *Vas efferens*, der die einzelnen Loben mit dem *Vas deferens* verbindet, wird unterschiedlich diskutiert (Machado-Silva et al., 1998; Mehlhorn & Piekarski, 1998). Der *Vas deferens* führt von den Testes zu einer anterior gelegenen Samenblase, die aus einer Ausbuchtung dieses Ganges gebildet wird und mit Spermien gefüllt ist. Von hier aus werden die Spermien weiter ventral zu dem im gynaecophoren Kanal gelegenen Genitalporus transportiert und während der Paarung kontinuierlich abgegeben (Kitajima et al., 1976).

Neves et al. (2005) haben Unterschiede in der Morphologie paarungserfahrenen und paarungsunerfahrenen Männchen beschrieben. Nach ihren Beobachtungen weisen Männchen, die über unisexuelle Infektionen erhalten worden sind, in den Testesloben freie Bereiche zwischen den Keimzellen auf, während die Loben von paarungserfahrenen Männchen mit

Keimzellen dicht gefüllt sind. Diese Beobachtungen stimmen nicht mit den Ergebnissen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung paarungsunerfahrener Männchen überein. Diese zeigten, dass die Testesloben paarungsunerfahrener Männchen ebenso dicht mit Keimzellen gefüllt sind wie die paarungserfahrener Männchen. Die paarungsunerfahrenen Männchen aus unisexuellen Infektionen produzierten reife Spermien, und ihre Samenblase schien sogar noch stärker mit Spermien gefüllt zu sein, als die von Männchen aus bisexuellen Infektionen (vgl. Abbildung 3.50). Die von Neves et al. (2005) beobachteten und beschriebenen Veränderungen konnten jedoch als Folge der Entpaarung vom Weibchen beobachtet werden. Nach der Entpaarung nimmt die Größe der Testes sowie Keimzell-Anzahl in den einzelnen Loben ab, was zu freien Bereichen zwischen den einzelnen Zellen führt. Da paarungsunerfahrene Männchen vollständig differenzierte Testes aufweisen, ist diese Differenzierung vermutlich unabhängig von einem Paarungskontakt mit dem Weibchen. Die Entpaarung hingegen scheint zu Veränderungen in den Testes der Männchen zu führen.

#### 4.6.1 SmTK4-Inhibition durch den Syk-Kinase-Inhibitor Piceatannol

Für die funktionelle Charakterisierung von SmTK4 wurde der Syk-Kinase-spezifische Inhibitor Piceatannol verwendet (Geahlen & McLaughlin, 1989; Oliver et al., 1994). Mögliche Effekte des Piceatannol könnten höchst wahrscheinlich auf die Inhibition von SmTK4 zurück geführt werden, da es sich bei dieser um die bislang einzige bekannte Syk-Kinase in *S. mansoni* handelt (vgl. Abschnitt 4.6.2). Substanzen, die ursprünglich für die Inhibition von Tyrosinkinase aus Vertebraten entwickelt wurden, führten in vorangegangenen Versuchen bereits erfolgreich zur Inhibition von Tyrosinkinase in *S. mansoni* (Knobloch et al., 2006; Knobloch et al., 2007).

Schistosomen-Pärchen wurden in der *in vitro* - Kultur täglich mit Piceatannol in Konzentrationen von 35 bzw. 70  $\mu\text{M}$  behandelt. Nach zwei Tagen Behandlung mit 70  $\mu\text{M}$  Piceatannol waren bei den Männchen im ventralen Bereich der Testes keine Spermien mehr zu detektieren, während die anterior der Testes gelegene Samenblase weiterhin mit Spermien gefüllt war. Nach weiteren drei Tagen zeigten die Männchen weder in dem ventralen Bereich der Testesloben noch in der Samenblase reife Spermien (vgl. Abbildung 3.51). In Männchen, die mit 35  $\mu\text{M}$  Piceatannol behandelt wurden, traten diese Effekte ebenfalls, jedoch erst nach längeren Behandlungszeiträumen, auf. Bei den DMSO-behandelten Kontrollen waren nach dem gleichen Zeitraum keine Veränderungen zu beobachten, so dass die beobachteten Effekte als spezifisch für den Inhibitor zu werten sind. Durch Piceatannol kam es somit zu einer Störung der Spermatogenese, da die Differenzierung reifer Spermien ausblieb. Die nach zwei

Tagen Behandlung mit 70  $\mu$ M Piceatannol noch in der Samenblase vorhandenen Spermien waren wahrscheinlich vor Beginn der Behandlung produziert sowie gespeichert worden. Nach 5 Behandlungstagen waren diese vermutlich vollständig in den gynaecophoren Kanal abgegeben worden, so dass die Samenblase wegen dem ausbleibenden Nachschub keine oder fast keine Spermien mehr enthielt. Über den Behandlungszeitraum nahmen zudem die Größe der einzelnen Testesloben sowie die Keimzell-Anzahl ab. Auch in Männchen, die mit Beginn der Piceatannol-Behandlung entpaart wurden, waren diese Effekte zu beobachten (vgl. Abbildung 3.52). In diesen Männchen, nicht jedoch in den Kontrollen, waren nach der Behandlung im ventralen Bereich der Testesloben sowie in der Samenblase ebenfalls keine Spermien mehr zu finden, was auch bei entpaarten Männchen auf eine Störung in der Produktion reifer Spermien hindeutet. Interessanter Weise zeigten wie diese Piceatannol-behandelten Männchen auch die entsprechenden Kontroll-Männchen (entpaart, unbehandelt) eine leichte Reduktion in der Testesgröße und Keimzell-Anzahl. Beides war bei unbehandelten, gepaarten Männchen nicht zu beobachten, trat aber bei behandelten, gepaarten ebenfalls auf. Dieser Aspekt des Piceatannol-Effekts tritt somit vermutlich auch bei einer Entpaarung der Schistosomen auf. In den Samenblasen gepaarter oder entpaarter Männchen, die mit Piceatannol behandelt wurden, waren teilweise undifferenzierte Spermatozyten zu finden, die anscheinend anstelle reifer Spermien in die Samenblase transportiert worden sind.

Durch den Syk-Kinase-Inhibitor Piceatannol scheint die Spermatogenese von *S. mansoni* an einem frühen Punkt gestört worden zu sein, da nicht nur die Anzahl an reifen Spermien sondern auch die Anzahl an Spermatozyten abnahm. Möglicherweise wird durch den Inhibitor bereits die Proliferation der Spermatozyten im dorsalen Bereich der Testes gestört. Die Proliferation der Spermatozyten ist für die Initiation der Spermatogenese und die kontinuierliche Produktion von Spermien notwendig (Braydich-Stolle et al., 2007), so dass eine Störung der Spermatogenese an diesem Punkt auch in einem Fehlen von reifen Spermien resultiert. Dies stimmt mit Beobachtungen aus anderen Organismen (Maus, Mensch) überein, die zeigten, dass die Proliferation der spermatogonialen Keimzellen durch cytoplasmatische Tyrosinkinase aktiviert wird und dementsprechend Tyrosinkinase-Inhibitoren oder RNAi-Versuche zu einer Störung der Spermatogenese führen (Braydich-Stolle et al., 2007). Während für Tyrosinkinase der Src-Familie eine Beteiligung an der Spermatogenese beschrieben ist und auch für Kinasen der Lyn- und Fyn-Familie eine solche vermutet wird (Kierszenbaum, 2006; Braydich-Stolle et al., 2007), ist über die Beteiligung von Syk-Kinasen bisher nichts bekannt. Die Effekte des Syk-Kinase-spezifischen Inhibitors

auf die Spermatogenese in *S. mansoni* sind somit die erste Beschreibung für die putativ essentielle Funktion einer Syk-Kinase in der Spermatogenese.

Mit 70  $\mu$ M Piceatannol behandelte, gepaarte Weibchen wiesen morphologische Veränderungen im Ovar auf (vgl. Abbildung 3.53). Nach zwei Tagen Behandlung war eine geringfügige Zunahme des Anteils an reifen Oocyten im Ovar zu verzeichnen. Im Ootyp wurden weiterhin Eier aus Vitellocyten und Oocyten zusammengesetzt und das *Receptaculum seminis* war gefüllt mit Spermien des Männchens. Dies stimmt mit der zuvor beschriebenen Beobachtung überein, dass die Samenblase der Männchen in diesem Behandlungszeitraum weiterhin Spermien enthielt, diese somit bei der Paarung auch abgegeben und im *Receptaculum seminis* des Weibchens gespeichert werden konnten. Nach vier Tagen Behandlung mit Piceatannol zeigten sich deutlichere Effekte. Das Ovar enthielt mehr große, reife Oocyten, die nun auch im anterioren Bereich zu finden waren, wo sich bei unbehandelten Weibchen die undifferenzierten Keimzellen (Oogonien) befinden. Das *Receptaculum seminis* dieser Weibchen enthielt kaum noch Spermien, was vermutlich auf den fehlenden Nachschub durch das Männchen zurück zu führen ist, dass nach diesem Behandlungszeitraum auch in der Samenblase keine Spermien mehr aufwies. Bei Weibchen, die mit Beginn der Piceatannol-Behandlung entpaart wurden, zeigten sich vergleichbare Effekte (vgl. Abbildung 3.54). Auch bei ihnen war der Anteil an reifen Oocyten im Ovar erhöht. In gepaarten und entpaarten Kontroll-Weibchen (DMSO-behandelt, unbehandelt) konnte der erhöhte Anteil reifer Oocyten im Ovar nach identischer Zeit in der *in vitro* - Kultur nicht beobachtet werden, so dass dieser Phänotyp aus einem spezifischen Effekt des Inhibitors resultierte. Die Vitellarien beider Weibchen-Gruppen zeigten durch die Behandlung mit Piceatannol im Vergleich zu den Kontrollen keine morphologischen Veränderungen. Vorherige, molekulare Untersuchungen des Einflusses von Piceatannol zeigten, dass dieser Inhibitor keinen Effekt auf die Mitoseraten im Weibchen hat (Knobloch, 2002). Der Einsatz eines Src-Kinase-selektiven Inhibitors (Herbimycin A) führte hingegen zu einer deutlichen Reduktion der Mitosen. Dies ist vermutlich auf die mit der Inhibition von Src-Kinasen verbundenen, reduzierten Proliferationen im Vitellarium zurückzuführen (Knobloch et al., 2006; Knobloch et al., 2007), dem Organ höchster mitotischer Aktivität im Schistosomen-Weibchen. Im Gegensatz zu der Src-Kinase SmTK3 wird die Syk-Kinase SmTK4 nicht im Vitellarium exprimiert. Bei einer Inhibition dieses Moleküls waren daher auch keine Effekte und damit auch keine Reduktion von Mitosen in diesem Organ zu erwarten. Dies stimmt mit den morphologischen Untersuchungen des Vitellariums nach Piceatannol-Behandlung überein, die keine Veränderungen zeigten. Effekte der Syk-Inhibition im Ovar und den

Testes, in denen die Mitoseraten wesentlich geringer sind als im Vitellarium, waren vermutlich zu gering um über die DAPI/BrdU-Technik (Knobloch et al., 2002a) erfasst zu werden. In den vorausgegangenen Analysen wurden mögliche Einflüsse von Piceatannol auf die Mitoseraten im Weibchen nur für einen Behandlungszeitraum von maximal 2 - 3 Tagen untersucht (Knobloch, 2002). Wie die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten, morphologischen Untersuchungen zeigten, traten Effekte im Ovar oder den Testes erst nach längeren Behandlungszeiträumen mit Piceatannol auf. In folgenden Analysen sollten daher die Mitoseraten im Weibchen und Männchen nach längeren Zeiträumen der Behandlung mit Piceatannol quantifiziert werden.

Für cytoplasmatische Tyrosinkinase der Src-Familie ist eine essentielle Rolle in der meiotischen Reifung von Oocyten bei der Maus beschrieben worden (Zheng et al., 2007). Durch den Einsatz eines Src-Kinase spezifischen Inhibitors wurde der GVBD (*germinal vesicle breakdown*) unterbunden, wodurch die Oocyte nicht in die Meiose I eintreten und den ersten Polkörper abschnüren konnte (Zheng et al., 2007). In Oocyten von marinen Schnurwürmern führte der Einsatz des Syk-Kinase spezifischen Piceatannol ebenfalls zu einem reduzierten GVBD und damit zu einer unvollständigen Maturation der Oocyte, was hier für die Beteiligung einer Syk-Kinase an diesen Prozessen spricht (Stricker & Smythe, 2006). Für Syk-Kinasen aus *Drosophila* ist zudem eine Funktion bei der Oogenese bekannt (Tran & Berg, 2003). Bei dem Hermaphroditen *Caenorhabditis elegans* liegen in der Gonade, wie im Ovar von *S. mansoni*, die am wenigsten reifen Eizellen an einem Ende vor. Während ihrer Wanderung zum anderen Ende der Gonade durchlaufen sie die Meiose, was in der Bildung maturer Oocyten resultiert, die in die Spermatheca übertreten und hier befruchtet werden (Schedl, 1997). In *C. elegans* ist eine Tyrosin-Phosphatase, die zwei N-terminale SH2-Domänen sowie eine C-terminale Tyrosinphosphatase-Domäne besitzt, an der Oogenese beteiligt. Eine funktionelle Deletion dieses Moleküls führt zu Defekten in der Oogenese, die in der Bildung sehr großer Oocyten resultieren (Gutch et al., 1998). Möglicherweise kommt es durch den Ausfall dieses Moleküls zu einem verhinderten Austritt der Oocyte aus dem pachytänen Arrest der Meiose. Die Tyrosin-Phosphatase agiert während der Oogenese von *C. elegans* vermutlich in Signalwegen *downstream* von Rezeptor-Tyrosinkinase und cytoplasmatischen Tyrosinkinase und spielt eine Rolle bei der Differenzierung der Oocyte (Gutch et al., 1998).

Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Effekte von Piceatannols auf Schistosomen-Weibchen ist zu vermuten, dass eine Syk-Kinase in *S. mansoni* zu ähnlichen Effekten in der Oogenese führen kann, wie die Tyrosin-Phosphatase in *C. elegans*. Durch die Behandlung mit

Piceatannol kommt es in *S. mansoni* zu einer Reduktion der Eiproduktion. In *C. elegans* wurde bei dem funktionellen Ausfall der Tyrosin-Phosphatase ebenfalls eine Reduktion der Nachkommenschaft beobachtet (Gutch et al., 1998). Interessanter Weise besitzen beiden Moleküle den gleichen Aufbau, mit Ausnahme der funktionellen Domäne, die im Fall von SmTK4 zur Phosphorylierung und im Fall der Phosphatase zur Dephosphorylierung von Tyrosinresten führt. Es ist denkbar, dass es durch die Piceatannol-Inhibition von Syk-Kinasen zu Störungen der Meiose im Ovar des Schistosomen-Weibchens kommt, was in einer erhöhten Anzahl großer Oocyten resultiert, die eventuell durch einen verhinderten Austritt aus dem meiotischen Arrest nicht mehr durch ein Spermium befruchtet werden können.

Die unter Piceatannol-Behandlung beobachteten Effekte in Ovar und Testes adulter Schistosomen gehen wahrscheinlich spezifisch auf die Inhibition von SmTK4 zurück, die in diesen Reproduktionsorganen exprimiert wird (Knobloch et al., 2002b) und bei der es sich um die vermutlich einzige Syk-Kinase in *S. mansoni* handelt (vgl. Abschnitt 4.6.2)

#### 4.6.2 SmTK4-Supprimierung über RNAi

Der Syk-Kinase-spezifische Inhibitor führte bei adulten Schistosomen zu Störungen der Spermatogenese und Oogenese (vgl. Abschnitt 4.6.1). In *S. mansoni* ist bisher nur eine Syk-Kinase identifiziert worden (SmTK4, Knobloch et al., 2002b). Auch in den mittlerweile fast vollständigen Daten aus dem *S. mansoni* - Sequenzierungsprojekt (Sanger, TIGR) konnten keine weiteren Syk-Kinasen, sondern lediglich potentiell verkürzte SmTK4-Formen (29170.m001541; vgl. Abschnitt 4.3) sowie eine nur wenig homologe Tyrosinkinase mit Ankyrin-repeats (29097.m000991, 29097.m000638) identifiziert werden, die jedoch Homologie zur *Drosophila*-Shark (*SH2 domain ankyrin repeat kinase*) (Ferrante et al., 1995) aufweist. Um zu bestätigen, dass der Effekt von Piceatannol als SmTK4-Inhibitor spezifisch gewesen ist, wurden Versuche zur Inhibition von SmTK4 über RNAi durchgeführt. Diese Methode der posttranskriptionellen Supprimierung von Molekülen über doppelsträngige RNAs ist erst kürzlich für adulte Schistosomen etabliert worden (Ndegwa et al., 2007), wurde zuvor aber bereits erfolgreich für prä-adulte Stadien (Schistosomulae) angewandt (Skelly et al., 2003; Boyle et al., 2003; Correnti & Pearce, 2004; Correnti et al., 2005; Correnti et al., 2007; Morales et al., 2007b).

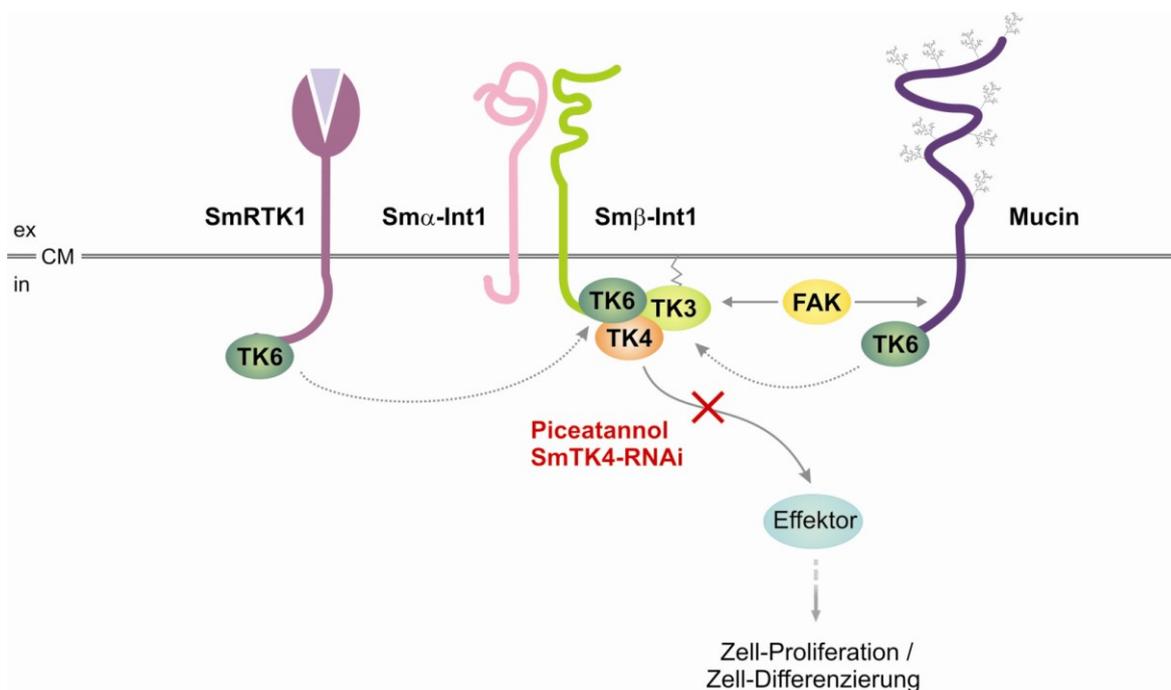
Für die Inhibition von SmTK4 auf posttranskriptioneller Ebene wurden dsRNAs hergestellt, die gegen die Tandem-SH2-Domäne dieser Syk-Kinase gerichtet waren. Diese dsRNAs wurden über ein kombiniertes *soaking*- und Elektroporations-Protokoll in Pärchen von *S. mansoni* eingebracht und der Effekt nach 5 Tagen untersucht. Die molekulare Analyse

der mit SmTK4-dsRNAs elektroporierten Pärchen zeigte, dass die Menge an SmTK4-Transkripten auf bis zu 19% reduziert werden konnte (vgl. Abbildung 3.55). In den Kontrollen, die ohne dsRNAs oder mit SmTK3-spezifischen dsRNAs behandelt wurden, waren die SmTK4-Transkriptmengen nicht reduziert, was den spezifischen RNAi-Effekt der eingesetzten SmTK4-dsRNAs belegt. Über das von Ndegwa et al. (2007) für adulte Schistosomen etablierte RNAi-Protokoll, das bisher nur für tegumental oder gastrodermal exprimierte Gene angewandt wurde (Ndegwa et al., 2007; Krautz-Peterson et al., 2007), konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals ein RNAi-Effekt für ein in tieferen Geweben bzw. Organen exprimiertes Gen gezeigt werden.

Der Einsatz von SmTK4-spezifischen dsRNAs führte zu einer deutlichen Reduktion der Transkriptmengen dieses Gens in den behandelten Pärchen. Da SmTK4 überwiegend in Ovar und Testes exprimiert wird (Knobloch et al., 2002b), war ein RNAi-Effekt in diesen Organen erwartet worden. Nach Karminrot-Färbung behandelter Pärchen wurde die Morphologie der Reproduktionsorgane mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht (vgl. Abbildung 3.56). In den Weibchen zeigte sich ein Effekt im Ovar, der Anteil an maturen, großen Oocyten war im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Dieser Effekt war qualitativ aber nicht quantitativ mit dem einer Piceatannol-Behandlung vergleichbar. In den Testes der Männchen zeigten sich Effekte, die qualitativ und quantitativ mit denen einer Piceatannol-Behandlung vergleichbar waren. Die Anzahl an reifen Spermien war deutlich reduziert und weder im ventralen Bereich der Testesloben noch in der Samenblase konnten diese detektiert werden. Pärchen, die mit SmTK3-spezifischen dsRNAs oder ohne dsRNAs behandelt wurden, zeigten diese Effekte nicht. Über die SmTK4-spezifischen dsRNAs war es somit gelungen, die Syk-Kinase SmTK4 im Ovar und den Testes adulter Schistosomen posttranskriptionell zu inhibieren. Dieser RNAi-Effekt konnte nicht nur molekular, sondern auch morphologisch nachgewiesen werden.

Der morphologische Effekt der posttranskriptionellen SmTK4-Inhibierung mittels dsRNAs (RNAi) war mit dem Effekt der Piceatannol-Behandlung qualitativ vergleichbar, wenn auch im Falle des Ovars schwächer. Dieser quantitative Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass das SmTK4-Expressionsniveau nicht vollständig, sondern bis auf 19% reduziert wurde. Unter der Annahme, dass die Piceatannol-Behandlung eine stärkere Inhibition der SmTK4-Kinaseaktivität bewirkt, ist der deutlichere Effekt der Inhibitor-Behandlung gegenüber der dsRNA-Behandlung zu erklären. Durch die Inhibition von SmTK4 mittels RNAi konnten die durch Piceatannol beobachteten Effekte in Ovar und Testes adulter Schistosomen spezifisch auf SmTK4 zurück geführt werden. SmTK4 ist daher vermutlich entscheidend an der Spermatogenese sowie an der Oogenese in *S. mansoni* beteiligt.

Als potentielle Interaktionspartner der Syk-Kinase SmTK4 waren die Src-Kinasen SmTK6 und SmTK3 sowie die Rezeptoren Sm $\beta$ -Int1 und SmRTK1 über Yeast Two-Hybrid Analysen und Co-Lokalisationsstudien ausfindig gemacht worden (vgl. Abschnitte 4.2 und 4.3). Allen ist gemein, dass sie im Ovar und den Testes adulter *S. mansoni* transkribiert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese Moleküle in kooperative Signalwege involviert sind, die möglicherweise die Teilung und Differenzierung von Keimzellen initiieren. Während die Integrin-Rezeptoren von Molekülen der extrazellulären Matrix angesteuert werden und zur Umorganisation des Cytoskeletts führen, werden RTKs von Wachstumsfaktoren aktiviert und vermitteln mitotische Aktivität. Synergistisch führen beide in *S. mansoni* vermutlich zu der Bildung reifer Oocyten und Spermien. Das zuvor erstellte Modell zur SmTK4-Signalkaskade (vgl. Abbildung 4.5) wurde um den Effekt der Piceatannol-Behandlung bzw. der spezifischen SmTK4-Inhibition durch RNAi ergänzt und ist nachfolgend in der Abbildung 4.7 dargestellt.



**Abbildung 4.7:** Die SmTK4-Signalkaskade hat einen Einfluss auf die Proliferation und/oder Differenzierung von Zellen in Ovar und Testes von *S. mansoni*

Dass aus den Ergebnissen der Interaktionsanalysen im Yeast Two-Hybrid System erstellte, hypothetische Modell der SmTK4-Signalkaskade (vgl. Abbildung 4.5) wurde um den Effekt des Syk-Kinase-Inhibitors Piceatannol und der SmTK4-spezifischen dsRNAs ergänzt. In Zellen des Ovars oder der Testes von *S. mansoni* kommt es durch Piceatannol oder durch eine SmTK4-Inhibition mittels RNAi vermutlich zur Verhinderung der Phosphorylierung (und Aktivierung) noch unbekannter, *downstream* von SmTK4 liegender Effektormoleküle. Dies hat wahrscheinlich negative Auswirkungen auf die Zell-Proliferation und/oder Zell-Differenzierung, was in Störungen der Oogenese und Spermatogenese resultiert (nähere Erläuterungen siehe Text). [CM: Cytoplasmamembran, ex: extrazellulär, in: intrazellulär]

#### 4.6.3 Zukünftige Experimente zur Aufklärung der SmTK4-Signalkaskade

Um die Beteiligung von SmTK4 an der Gametogenese von *S. mansoni* abzusichern, sollten weitere Piceatannol-Behandlungen mit verschiedenen Konzentrationen und Zeitprofilen sowie morphologische Untersuchungen erfolgen. In den bisherigen Versuchen zeigte sich bereits eine konzentrationsabhängige Inhibition, denn mit geringeren Konzentrationen traten Effekte erst nach einem längeren Behandlungszeitraum auf. Durch Beobachtungen in der *in vitro*-Kultur sollte zukünftig auch überprüft werden, inwieweit auch die Embryogenese durch die Behandlung betroffen ist. Hierzu sollte die Morphologie von Eiern wie auch von geschlüpften Miracidien, sofern sich diese unter Piceatannol-Einwirkung entwickeln, lichtmikroskopisch, aber auch konfokalmikroskopisch untersucht werden. Die *whole mount*-Färbung mit Karminrot und sich anschließende konfokale Lasermikroskopie konnte in der vorliegenden Arbeit auch für diese Stadien etabliert werden (Daten nicht gezeigt). Neben Piceatannol könnte auch der Einfluss von BAY 61-3606 (Sigma), einem weiteren Syk-spezifischen Inhibitor, auf adulte Schistosomen in der *in vitro*-Kultur getestet werden. BAY 61-3606 blockiert Syk-Aktivität mit einem IC<sub>50</sub> von 10 nM, wohingegen andere Tyrosinkinase wie Lyn, Fyn, Src, Itk oder Btk erst bei Konzentrationen jenseits 4,7 µM inhibiert werden (Yamamoto et al., 2003). Vergleiche zwischen BAY 61-3606- und Piceatannol-behandelten Schistosomen würden es ermöglichen, die Spezifität der beobachteten Effekte auf Inhibitorebene zu verifizieren.

Um die mögliche Funktion von SmTK6 in der Gametogenese zu untersuchen, die eigenen phylogenetischen Analysen zur Folge eine Verwandtschaft zu Abl-Kinasen aufweist (Beckmann, 2005), könnte der Abl-Kinase-Inhibitor Imatinib (Glivec, Novartis) (Druker & Lydon, 2000) eingesetzt werden. Imatinib inhibiert neben Abl-Kinasen auch die Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit, deren Kinase I-Domäne eine hohe Homologie zur Abl-Kinasedomäne aufweist, sowie den PDGF-R (*platelet-derived growth factor receptor*), der strukturelle Ähnlichkeiten zu c-kit aufweist. Es wäre daher nicht auszuschließen, dass beobachtete Effekte auch auf die Wirkung dieses Inhibitors auf andere Moleküle zurückgeführt werden könnte. Bislang wurden jedoch noch keine deutlichen Hinweise auf die Existenz von PDGF-R- und c-kit-Homologen in den *S. mansoni*-Genom-Datenbanken gefunden. Ist SmTK6 für die Aktivierung von SmTK4 von entscheidender Bedeutung, könnte der Einsatz von Imatinib zu ähnlichen Phänotypen wie unter Piceatannol-Behandlung führen.

Durch den Einsatz Integrin-spezifischer Inhibitoren wäre es ferner möglich, nicht nur die Beteiligung von SmTK4 (und SmTK6), sondern auch die der *upstream* im Signalweg lokalisierten Integrin-Rezeptoren, an der Oogenese und Spermatogenese von *S. mansoni*

nachzuweisen. Als Integrin-Inhibitoren wurden Desintegrine, Bestandteile von Schlangengiften, identifiziert (Gould et al., 1990). Mit kommerziell erhältlichen Desintegrinen (Sigma) könnten adulte Schistosomen *in vitro* behandelt und mögliche Effekte morphologisch analysiert werden. Hierbei würde man aufgrund der Identifizierung der Integrin-Rezeptoren als *upstream*-Interaktionspartner von SmTK4 einen ähnlichen Phänotyp wie bei der Behandlung mit Syk-Inhibitoren erwarten. Dies würde somit auch die postulierte Interaktion zwischen Integrin-Rezeptoren und SmTK4 in einem Signalweg stützen.

Um die Funktionen von SmTK4, SmTK6 und SmRTK1 sowie von Sm $\alpha$ - und Sm $\beta$ -Int1 genauer zu charakterisieren, sollten entsprechende RNAi-Versuche durchgeführt werden. Diese haben gegenüber Inhibitor-Versuchen den Vorteil, dass sie die Expression eines definierten Moleküls inhibieren und so eine Aussage über dessen spezifische Funktion erlauben. Hierbei können mögliche, durch Inhibitoren bedingte pleiotrope Effekte ausgeschlossen werden. Jedoch sind auch bei RNAi-Versuchen unspezifische *off target*-Effekte eingesetzter dsRNAs oder siRNAs nicht gänzlich auszuschließen (Svoboda, 2007). Aufgrund der Expression der genannten Moleküle im Ovar und den Testes wären Effekte vor allem in diesen Organen zu erwarten. Diese könnten molekularbiologisch und mikroskopisch analysiert werden. Wenn RNAi-Versuche zur Ausschaltung der SmTK6- und Integrin-Rezeptor-Funktionen zu identischen Phänotypen wie nach SmTK4-Inhibition führen, wäre damit ein deutlicher Hinweis erhalten, dass diese drei Moleküle im selben Signalweg in *S. mansoni* agieren. Aufgrund der postulierten synergistischen Interaktion zwischen den Integrin-Rezeptoren Sm $\alpha$ - und Sm $\beta$ -Int1 und der Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1, könnte eine funktionelle Inhibierung von SmRTK1 durch RNAi zu einem vergleichbaren Effekt wie eine Integrin-Inhibition führen.

#### 4.7 Ausblick

Würde sich über die voran beschriebenen Experimente die Beteiligung der postulierten Signalwege an der Gametogenese von *S. mansoni* bestätigen, würden die beteiligten Moleküle potentielle *targets* für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika zur Bekämpfung adulter Schistosomen und der von ihnen ausgelösten Krankheit darstellen. Hierbei wird derzeit auch die Rolle von Tyrosinkinasen als potentielle *targets* diskutiert (Knobloch et al., 2007; Dissous et al., 2007). Könnte man durch das gezielte Ausschalten einzelner Komponenten der Signalkaskade die Oogenese und Spermatogenese inhibieren und damit die Eiproduktion

unterbinden, so käme es nicht zur Ausbildung der gravierenden pathophysiologischen Effekte einer Schistosomen-Infektion. Denn die Pathogenität der Schistosomiasis beruht primär auf der hohen Anzahl abgegebener Eier, welche zu etwa 50% in innere Organe des Körpers verschleppt und dort zu schweren Veränderungen der Gewebe führen können (Mehlhorn & Piekarski, 1998; Chitsulo et al., 2000).

#### **4.8 Transgene Schistosomen - Analyse des SmAct1-Promotors**

Aktine sind hoch konservierte Proteine in Eukaryoten und erfüllen vielfältige Aufgaben. So sind sie an der Muskelkontraktion, Zellbewegung, Zellmorphologie und Cytoskelett-Organisation ebenso beteiligt wie an Transkriptionsprozessen im Zellkern (Marston & Goldstein, 2006; Miralles & Visa, 2006). Daher wurde auf der Suche nach einem konstitutiv aktiven Promotor in *S. mansoni* von der Möglichkeit ausgegangen, dass sich im 5'-Bereich des schistosomalen Aktin-Gens SmAct1 ein entsprechender Promotor befinden könnte. Gestützt wurde diese Vermutung durch die Analyse von Aktin-Promotoren anderer Organismen, die eine ektopische Expression von Reportergenen in transgenen Individuen induzieren konnten (Zhang et al., 1991; Hsiao et al., 2001; Kinoshita et al., 2003).

Aktine aus Schistosomen konnten erstmals mittels eines heterologen Antikörpers über Immunofluoreszenz in den Muskeln, dem Tegument einschließlich der Tuberkel und in den Spines adulter Würmer lokalisiert werden (MacGregor & Shore, 1990). In *S. mansoni* wurden zwei verschiedene Aktin-kodierende mRNAs identifiziert (Davis et al., 1985), die beide eine stärkere Expression in Männchen zeigten als in Weibchen (Abbas & Cain, 1989). Schwächere Expressionslevel wurden zudem in Larven (Cercarien, Schistosomulae) und Eiern nachgewiesen (Davis et al., 1985; Skelly et al., 1993; Busek et al., 2002). Die Klonierung und Sequenzierung der Aktin-Gene SmAct1 und SmAct2 zeigte, dass beide Gene höhere Homologie zu cytoplasmatischen Aktinen aus Invertebraten als aus Vertebraten aufwiesen (Oliveira & Kemp, 1995).

##### **4.8.1 Promotorelemente in der SmAct1-5'-Region**

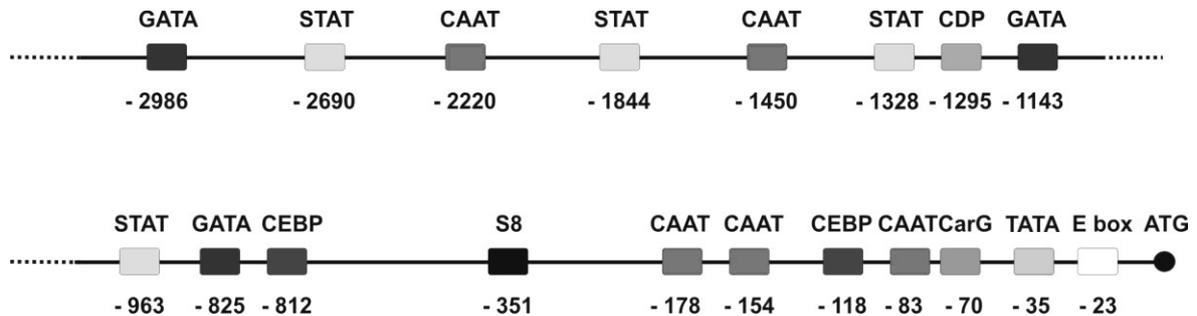
In den bislang bekannten 170 bp der 5'-Region des SmAct1-Gens waren bereits vier putative Promotorelemente (TATA-, CA<sub>n</sub>G-, CAAT- und E-Box) identifiziert worden (Oliveira & Kemp, 1995). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch die postulierten TATA-,

CAR<sub>G</sub>- und E-Boxen mit Hilfe des Programms MatInspector unter stringenten Vergleichsbedingungen (*core* und *matrix similarity*) nicht bestätigt werden. Busek et al. (2002) konnten aber über *band shift* - Assays zeigen, dass Komponenten nukleärer Extrakte von Schistosomen-Männchen und schwächer auch von Weibchen an diese TATA-, CAR<sub>G</sub>- und CAAT-Boxen binden können. Für die vorhergesagte E-Box zeigten Komponenten der Kernextrakte des Weibchens nur eine schwache, und die des Männchens gar keine Bindung. Obwohl die Sequenzen der TATA-, CAR<sub>G</sub>- und CAAT-Box nicht vollständig mit der Konsensussequenz übereinstimmen, deuten sowohl ihre Positionen in der 5'-Region des SmAct1-Gens als auch die Ergebnisse der *band shift* - Assays darauf hin, dass diese Boxen dennoch funktionelle Promotorelemente sein können.

TATA-Boxen sind in eukaryotischen Promotoren meist 26 bis 34 bp 5'-wärts des Transkriptionsstarts lokalisiert. In der 5'-Region des SmAct1-Gens befindet sich die TATA-Box 35 bp 5'-wärts des ATG-Startcodons (Translationsstart); die relative Position zum Transkriptionsstart kann nicht definiert werden, da dieser für das SmAct1-Gen noch nicht experimentell bestimmt wurde. CAR<sub>G</sub>-Boxen stellen Bindestellen für SRFs (*serum response factors*) dar und spielen eine Rolle bei der Muskel-spezifischen Genexpression. In Vertebraten spielt die CAR<sub>G</sub>-Box eine essentielle Rolle bei der Expression von Muskel-spezifischen Aktinenen (Taylor, 1991). Bei *Xenopus* liegt die CAR<sub>G</sub>-Box im Aktin-Promotor 85 bp 5'-wärts des Transkriptionsstarts (Taylor, 1991). Übereinstimmend mit dem Vertebraten-System wurde in der 5'-Region des SmAct1-Gens eine CAR<sub>G</sub>-Box 70 bp 5'-wärts des ATG-Startcodons identifiziert. E-Boxen sind Promotorelemente vieler zell- oder gewebespezifisch exprimierter Gene (Yamada & Miyamoto, 2005). In den meisten eukaryotischen Promotoren liegen E-Boxen 5'-wärts der TATA-Boxen. Da die putative E-Box (Position -23) in der 5'-Region des SmAct1-Gens 3'-wärts der TATA-Box liegt und die *band shift* - Assays zudem nur eine schwache oder gar keine Bindung von Komponenten aus Schistosomen-Kernextrakten zeigten (Busek et al., 2002), spielt dieses Element vermutlich keine oder nur eine geringe Rolle bei der Regulation der Transkription des SmAct1-Gens.

Ausgehend von der bekannten 170 bp-Sequenz der 5'-Region des SmAct1-Gens wurden mit Hilfe des *genome walkings* sowie unter Verwendung der *S. mansoni* - Genomdaten ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk), [www.tigr.org](http://www.tigr.org)) etwa 3 kb der 5'-Region dieses Gens identifiziert, kloniert und schließlich charakterisiert. Innerhalb dieser Sequenz wurden weitere putative *cis*-agierende Elemente ermittelt, so dass gegenwärtig neben den von Oliveira & Kemp (1995) postulierten Elementen (TATA-, CAR<sub>G</sub>- und E-Box) insgesamt fünf

CAAT-Boxen, zwei CEBP-Elemente, drei GATA-Boxen, vier STAT-Elemente, eine Bindestelle für ein S8-Homöodomänen-Protein sowie ein CDP-Element identifiziert worden sind (vgl. Abbildung 4.8, Anhang 5.6).



**Abbildung 4.8:** Schematische Darstellung der 5'-Region des SmAct1-Gens

Die in der rund 3 kb langen 5'-Region des SmAct1-Gens identifizierten, putativen Promotorelemente sind mit ihren relativen Lage zum ATG-Startcodon (+1) schematisch wiedergegeben.

CAAT-Boxen sind ubiquitäre Promotorelemente und üblicherweise um die 100 bp 5'-wärts des Transkriptionsstarts lokalisiert. Neben der bereits von Oliveira & Kemp (1995) postulierten CAAT-Box an Position -83 wurden im 5'-Bereich des SmAct1-Gens vier weitere CAAT-Boxen identifiziert. Computeranalysen einer Vielzahl von Promotorsequenzen Muskel- und nicht-Muskel-spezifischer Aktine aus Vertebraten führten zu einem Modell, in dem eine TATA-Box (-27 bis -139 bp), eine CarG-Box (-58 bis -332 bp) sowie eine CAAT-Box (-89 bis -421 bp) zu den Core-Promotorelementen gehören (Frech et al., 1998; Klingenhoff et al., 2002). Die 5'-Region des SmAct1-Gens zeigt einem diesem Modell analogen Aufbau, so dass diese drei *cis*-agierenden Elemente vermutlich auch für die Transkriptionsinitiation des Act1-Gens aus *S. mansoni* notwendig sind. Gestützt wird diese Vermutung durch die durchgeführten Transformationsexperimente mit Reportergenkonstrukten, die zeigten, dass ein rund 500 bp langes Fragment der 5'-Region des SmAct1-Gens (Act<sub>500</sub>, Act1; vgl. 3.14.1) für eine Initiation der Transkription des Reportergens ausreicht (s.u., Beckmann et al., 2007). Da CAAT-Boxen zu den proximalen Core-Promotorelementen zählen (Knippers, 2001), sind die vier im weiteren 5'-Bereich des SmAct1-Gens identifizierten CAAT-Boxen vermutlich für die Initiation der Transkription dieses Gens nicht oder nur von geringer Bedeutung.

Neben den TATA-, CArG- und CAAT-Boxen haben Computeranalysen gezeigt, dass auch CEBP-Elemente Bestandteile der meisten Muskel-Aktin-Promotoren sind (Frech et al., 1998). In der 5'-Region des SmAct1-Gens wurden zwei CEBP-Elemente identifiziert (Positionen - 118 und - 812). Diese sind potentielle Bindestellen für *basic leucin-zipper* - Transkriptionsfaktoren, die in einer Vielzahl von Zelltypen Proliferations- und Differenzierungsprozesse kontrollieren (McKnight, 2001). In dem Promotor des humanen *smooth muscle* - Aktinens 1 ist eine CEBP-Sequenz für die Genexpression essentiell (Hu et al., 2004).

Mitglieder der GATA-Familie von Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung, einschließlich der Aktin-Regulation. In *Xenopus* und im Huhn sind GATA-4, in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren wie SRFs, und GATA-6 an der Transkriptionsregulation von *smooth muscle* - Aktinengen beteiligt (Belaguli et al., 2000; Yin & Herring, 2005). Die Identifizierung von drei GATA-Elementen in der 5'-Region des SmAct1-Gens bestätigt die Annahme einer konservierten Funktion auch dieser Transkriptionsfaktoren.

STAT-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*) interagieren bei Invertebraten und Vertebraten in Signalwegen mit Janus-Kinasen (JAKs). STATs werden als Antwort auf Cytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung sowie in der Zellbewegung (Hou et al., 2002; Hombria & Sotillos, 2006). Vier Bindestellen für STAT-Faktoren in der 5'-Region des SmAct1-Gens deuten darauf hin, dass die transkriptionelle Aktivität dieses Gens auch über JAK/STAT-Signalwege beeinflusst wird.

S8-Proteine haben allgemein einen aktivierenden Einfluss auf die Transkription (Norris & Kern, 2001) und gehören zu der *paired* Homöodomänen-Subfamilie, die auch Schistosomen-Homologe umfasst (Webster & Mansour, 1992). Eine Bindestelle für ein S8-Protein wurde in der 5'-Region des SmAct1-Gens gefunden.

Als letztes Element wurde eine putative Bindestelle für ein CDP-Protein identifiziert. CDP/Cut/Cox sind konservierte Homöodomänen-Proteine der nukleären Matrix, die als Transkriptionsrepressoren in der Regulation von Zellwachstum und Zellentwicklung agieren. Eine Funktion für die Aktivierung der Transkription ist ebenfalls beschrieben (Nepveu, 2001).

#### **4.8.2 Transformationsexperimente mit verschiedenen Varianten der SmAct1-5'-Region**

Die durchgeführten Transformationsexperimente zeigen, dass alle verwendeten SmAct1-Promotorfragmente (Act<sub>500</sub> - Act<sub>1500</sub>, Act1 - Act3) zu einer Aktivierung der Reportergenaktivität führten (vgl. 3.14.4, Tabelle 3.13), was durch konfokale Mikroskopie

und RT-PCR-Analysen gezeigt wurde. Bei der Verwendung von Promotorfragmenten, die größer als 170 bp waren, wurden jeweils vergleichbare GFP-Signalintensitäten und Signalverteilungen erhalten, auch wenn subtile Unterschiede nicht ausgeschlossen werden können (vgl. Abbildung 3.57). Dieses Ergebnis war angesichts der unerwartet vielen Nukleotidunterschiede zwischen den Promotorvarianten (Act<sub>500</sub> - Act<sub>1500</sub> und Act1 - Act3) überraschend. Ein Vergleich der in unserem Labor klonierten 5'-Region des SmAct1-Gens (Promotorfragmente Act<sub>500</sub> - Act<sub>1500</sub>) mit der parallel im Labor von Prof. Dr. E. Pearce (Correnti et al., 2007) klonierten SmAct1-5'-Sequenz (Promotorfragmente Act1 - Act3) offenbarte eine Reihe von Unterschieden (vgl. Anhang 5.6). Diese umfassen 51 Punktmutationen, die vermutlich spezifische Variationen zwischen den beiden *S. mansoni*-Stämmen darstellen. Von diesen Mutationen betreffen drei putative regulatorische Elemente (E-Box an Position - 23, CAAT-Box an Position - 154 und CEBP-Element an Position - 812; vgl. Anhang 5.6). Da keine offensichtlichen Unterschiede in der GFP-Aktivität zwischen Act<sub>500</sub>-GFP-Act und Act1-GFP-Act oder zwischen Act<sub>1000</sub>-GFP-Act und Act2-GFP-Act beobachtet werden konnten, beeinflussen die Nukleotidunterschiede die Funktionen der betreffenden Promotorelemente nicht signifikant, oder aber diese Elemente sind für die Promotoraktivität nur von untergeordneter Bedeutung. Hierfür gab es bei der E-Box bereits Hinweise (Busek et al., 2002). Diese Vermutung trifft für die CAAT-Box wahrscheinlich nicht zu, da ihre essentielle Rolle als ein Kern-Promotorelement für die Aktivität von Aktin-Genen, wenn auch in Vertebraten, bereits gezeigt wurde (Frech et al., 1998; Klingenhoff et al., 2002). Daher hat der Nukleotidunterschied in der CAAT-Box an Position - 154 vermutlich keinen Einfluss auf die Transkriptionsfaktor-Bindung. Ähnliches gilt auch für das CEBP-Element an Position - 812. Auch die Bedeutung dieses Elementes für die Transkription von Vertebraten-Aktinen wurde gezeigt (Hu et al., 2004). Der Nukleotidunterschied scheint die Funktion des Act<sub>1000</sub>-Promotorfragmentes nicht zu beeinflussen und hat daher vermutlich einen zu vernachlässigenden Effekt.

Adulte Schistosomen, die initial mit Act<sub>170</sub>-GFP-Act transformiert waren, zeigten nur eine schwache Reporterogenaktivität (Wippersteg, 2002). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass weiter 5'-wärts gelegene Sequenzelemente für eine Verstärkung der Transkriptions-Aktivität bedeutend sein könnten. Adulte, die mit Act<sub>500</sub>-GFP-Act transformiert waren, zeigten eine deutlich stärkere GFP-Aktivität, was den Schluss zulässt, dass zwischen - 170 und - 446 Promotorelemente liegen, die einen positiven Einfluss auf die Transkription haben. Ein mögliches Element für diesen Effekt ist die Bindestelle für ein S8-Protein an Position - 351. Die potentiell verstärkende Wirkung des S8-Elementes auf die Transkriptions-Initiation

könnte über S8-Deletionsvarianten des Promotors im Vergleich zu dem Act<sub>500</sub>-Promotor in Transformationsexperimenten überprüft werden.

Zwischen den einzelnen 5'-Fragmenten von SmAct1 (> 170 bp) konnten keine signifikanten Unterschiede in der GFP-Aktivität in adulten oder larvalen Schistosomen beobachtet werden (vgl. Abbildungen 3.57 und 3.58). Der Act<sub>500</sub>-Promotor enthält daher vermutlich die minimal notwendigen Elemente für eine Transkriptions-Initiation, was mit den Ergebnissen aus Analysen von Aktin-Promotoren in Vertebraten übereinstimmt. Für das *α-skeletal* Aktin des Huhns wurde gezeigt, dass die ersten 411 bp der 5'-Region, die eine CAAT- und eine TATA-Box enthalten, ausreichend für eine gewebe- und stadienspezifische Transkription sind (Grichnik et al., 1986). Eine Verlängerung des Promotors führte zu keiner Verstärkung der Aktivität. Gleiches wurde auch für den Promotor des humanen β-Aktins beobachtet (Frederickson et al., 1989).

In transgenen Sporocysten wurde in der konfokalen Lasermikroskopie eine schwache GFP-Fluoreszenz in vielen, jedoch nicht in allen Zelltypen detektiert (vgl. Abbildung 3.58). In adulten Männchen waren die GFP-Signale primär auf den tegumentalen Bereich konzentriert und konnten in der Muskulatur und dem Parenchym nur in schwächerer Intensität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen vollständig mit vorherigen Untersuchungen überein, in denen mit einem spezifischen Antikörper gegen Aktin aus Vertebraten Immunolokalisationen in adulten Schistosomen durchgeführt wurden (MacGregor & Shore, 1990). GFP-Aktivität in Bereichen des Darms oder weiteren Geweben konnte trotz einer weiten Verteilung der Goldpartikel in tieferen Geweben der transgenen Männchen nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend ist aus den Ergebnissen der Transformationsexperimente zu schlussfolgern, dass die untersuchten regulatorischen 5'-Sequenzen des SmAct1-Gens (Act<sub>170</sub> - Act<sub>500</sub>, Act1 - Act3) Promotor-Eigenschaften zeigten und hauptsächlich im Tegument, dem Parenchym und der Muskulatur adulter Männchen zu gewebespezifischer Reporterexpression führten. Eine Gewebespezifität ist auch für die Sporocysten anzunehmen, da GFP-Expression nicht in allen Zelltypen detektiert werden konnte. Es kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass in Larven und Adulten eine ubiquitärere Aktivität der 5'-Fragmente des SmAct1-Gens in beispielsweise den Nukleoli (Miralles & Visa, 2006) parenchymatischer Zellen, der syncytialen Gastrodermis der Adulten oder Keim- und Neuralzellen der Sporocysten vorliegt. Eine schwächere Aktivität hätte hier zu schwächeren Leveln an GFP-Expression geführt, die möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Im Zusammenhang mit der Transformation von Schistosomen wäre es wünschenswert, über konstitutiv aktive Promotoren zu verfügen, die eine ektopische Expression von Genen ermöglichen. Da bislang die vermutete konstitutive Aktivität des SmAct1-Promotors in adulten oder larvalen Schistosomen nicht bestätigt werden konnte, sollten zukünftig die 5'-Bereiche anderer Kandidatengene (beispielsweise von Elongationsfaktor-kodierenden Genen; El Bahay, 2003) auf ihre konstitutive Promotoraktivität hin untersucht werden.

## 5. ANHANG

### 5.1 Partielle cDNA-Sequenzen der *prey*-Plasmide aus den TK6-*upstream* Yeast Two-Hybrid Screenings

Nachfolgend sind die partiellen cDNA-Sequenzen der *prey*-Plasmide aus den TK6-*upstream* Screenings, sowie in Klammern die Längen der jeweiligen sequenzierten Bereiche angegeben.

#### 5.1.1 Screening 1 mit dem *bait*-Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK pBridge

##### Klon 2.2 pGADT7-5' (1387 bp)

TGCNANCANCCGNGTNTNAAANGNCNCCNTTCTGGNCCCATNTTGCGCNGGGGATTAAGTGNCNCGTACACATN  
CTCTTTCTNGACATATGTCNCTCCAGTACATCNCAGTNACTNNTNGTGTGCNATGGGCANTTTNNANANCTNCCG  
CTCNTCTCAAGTNGGNNTTTNAGCNANNGNCGTNGTNAAGTNNANNTNAACATNGNNNACGANCCCGTNGANANC  
GNGNCNCTNCCCCTGAAGCTGCCGCACTCTGGCNGNTCNAACGTNTGNTANGNAATCCTTTGAANNNTGCNCCTT  
GTNCTNTTACCTCTCCCGAAGTTCCAANATGTNTGCCANNTNTTNGNATTAGANTATNTNCANCTTNGGTGNA  
NATGCGCCGCGAGTCTCTCGGNTATCNGANGNTGACCACNACAAGGACACNANGCGNNCNTTGNCTGGANNGG  
TGAANNNTGTCAGAGNACNAGGNGNTAGNANNNTTACGNGCNCNCCGNGNGANNAGAGNTGNATCTCNNCTGAT  
NCGANCGGNTTGCAACTNNCCTGCTNNGAGCNNTGATGTNGCTCCNCATNGACNNNGAAAAANCTNTATGACCACA  
CGNACTTTATNCGNGGATTGCGCATGAANCGNTCTCNTTGTAAANNAAGCNGTNGTNGAGNGGTCAAATTAGTGAN  
NANCGCNCNACNGNCNGACGANNTCGGNTGGANNCTTACCCTGNTGAGNNTANGTTCAGCGCTGTAGGGNCNT  
GNAANNACNCAANGTNACNGGNGTNTGNTTGGCTTTATTTGANNANNACCGTTNNAACGTTNAAAACGCNCNNAT  
AANTNTAATNTGAATANNNGGATCNNNNNTGNANAACNGAGNTTGATTCNCTTTTNCATCTCANGGNCGNATA  
NCAANNNGANACANNAAGNAANGNANAGANGGNTTNGGTGGTTTTCNCTCCTTNNNCAAACANAGGCCANAC  
TTNAANTTATTTTTCTANNNNTTTTTNGNGNAACCNNGGNGNANATCNCNCGGNNNTAGCCNCCNTTAGNNNT  
CCATAGGNNNGTCTNANANTGANTANNNNNNGCTTNCNNTTTTGNAGNTGGTNNNCNTTATCNCNCCNCAATGTG  
NNAAGTTCCNCAAANTNAGCNCNCTATGTNNNCGCNCNCCCGCNAANAATTTNNANCTNTNTNCNNTNCTTNT  
ANTATNNNGTATTCTCNNNANCANTGANGAANNNTGGNCTNTNGTGTNTNCTNGNGGNNCTNTANNCTTGTGG  
NCCCNANATNGATTCAANNNGNCAGCCTNCANNNTCCCGGNTNTNCTTTGNNTNTCCCNNGNGTCTNGTAAGNN  
NNGCNCNANTNTCNCNNTNTNTNCTTNCNCA

##### Klon 6.9 pGADT7-5' (615 bp)

TGTAGGCATTTCTGAGTTATTTGTCCGAGTCACTGCATGGGGCAAGCTGGAGGGGAGAAGGTGAAGGTATCTCTG  
GAATCGTAAAGACAGCGTCTGTGGAGGGGATGGGCTTCTGTCTTAAAAAAGGGTCTCCGGTTTCGGCCAATCT  
AACGTTGATCTCTGCCTGGAACCGGCTGTGACCTCTGGATGCTTCGTCAACAAAATGGCAGCAACATATAGGTTT  
TCCTTGCTGCTCTGTCCCCGATCCGAAATGGCACACGCAAAGGTATCTGGCCTTTTATAGTATTTTCACACGG  
ACTCTGGGAGAATTGGCTGTATTTTCATCAGGAGGCATCAGTAAGGTCCAGAGTGGGGCTCATGTCCAGACTTCA  
GGGGTTAAAGATTTTATCCCCGACATATCGATTATAATAACACATTTTAAATGAACATAATTAAGTTAGAAGATT  
TGTGTTTTTAAATATAAAATATATGGCATACTGGATCCATTGCATGATAAATCTTGGTTTTGGATGCGGCTTAAC  
CATTTATTTTCACTTGCTGGTCTGCAATATGTGGGTGTGGAAAACTTTCTTGGGAACGAGAGGACCATTGTAGT  
AGAGAAAGGAGATAG

##### Klon 9.2 pGADT7-5' (815 bp)

ATACCAGTACATGGATGATGTATATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCCAACCAACCAAAAAAGAGAT  
CTTTAATACGACTCACTATAGGGCGAGCGCCGCCATGGAGTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGC  
CATGGAGGCCAGTGAATTCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGAGCTACTGCCG  
TGTAATTTGGTTTTCAGCGCATAATGGATGATTTGCAAACATCTGAAGAGACAACCTTTGTCCAAGACGAAAGTAAA  
AAACATAGTTAAAGAGAGCATAGAAGGCATCATTGGTTCTAGTTCTTATTCACATAATAAAGTACAACAGTGGAC  
TTCGTCTGTGATTGAACAATGCCTCAGTCAGCTGACTAAACTTGGAAAACCTTTAAGTACATCGTCACATGTGT  
AATAATGCAGAAAAGTGGAGCTGGACTACATACTGCAAGCTCTTGTATTGGGATAGTACTACTGACGGGAGTTG  
TACAGTAAAATGGGAAAACAAGTCTATGTATTTTACGTTACAGTGTGGCTTAGCAATATAATCCTTGTGCGAC  
CAAAGAAAATAGTTTCAAACAACCTAATCAGATTGTATTAAGACCGTCTGTATTCTAAACAACAGTGTGAACATTGG  
TTTTTTTGGGGTTTTAACGTGATATGAACTTTATAAATTTTTCGTTGACACAGTTTACTTGAGTATTTCCGCCGC  
TCAGCTGAGTTACTATGCTAAATAAACAGATTATGTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**Klon 15.1 pGADT7-5' (903 bp)**

AACCGTACATGGATGATGTATATACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCT  
 TTAATACGACTCACTATAGGGCGAGCGCCGCCATGGAGTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCC  
 TGGAGGCCAGTGAATTCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGGGAAGTTTACGTTA  
 CCGTCCTTGGGATGACGTCTGGAAGTGTAGTATCAAAGAGTTGACCATCCCACAGCTTCAAGATCTTGCACGGC  
 AATTCGAGCAAAAAGTTCAATTTATATCTGCTTCTATACAGCAACTCAAGTCTCTACAGGCTCAGTTTCGTTGCC  
 CCAAAAATTGTCTGGGCGAGCTTAACCCCGAAAAGAGAAAATACAAAATATTCTTGTCCCTTTAACTTCAACCTTGT  
 GTGTTTCTGGGAACTTTCTGATGCTTCGCATGTGCTTGTGGATATTGGAAGTGGGTACTATGTTGAAATGACCG  
 TTCCAGAAGCTGAAAGCCACTTTTGGCCGTCGAGTAGAATATATCAATAAACAAAATAAGGAAGATTTTGCCTGTTT  
 TGGAGGAAAAACACAAGCACATAAGTCCATTTTCCAGACGTTCTGGATGCTAAAATTCAGAGTTTATTAAGTTC  
 GAACAGCAGCGTGTCTTGAATTGTTGACGTATGCTTTTATAGGCTCCTTTTTCATTAGGATCCATCCATCTTATGG  
 TTTTTGTGCTTACAGCGAACGTTTTCATGCTTGTATTGTTGATTCCATTATTGACAACCTCAGAGTGTGTTTTGTTGTC  
 CGGGACATAGTGTCTCCTAACAAATGTCAATATCTGGAAAACCTAAAAGCCTTGTAAATACGAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAA

**Klon 22.5 pGADT7-5' (1266 bp)**

ATCCCGTACATGGATGATGTATATACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCCAAAAAAGAGATC  
 TTTAATACGACTCACTATAGGGCGAGCGCCGCCATGGAGTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCC  
 ATGGAGGCCAGTGAATTCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGAACACAGACTAGT  
 GATATTCTCCTTATCACTCGACCTCCACACAAAAATAAAAGGATACAACGTGGCCGTAGCTTTCATTTCTGGAGGA  
 ACAAATCAGCCACCACCGACGCGTAGTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGCCCGGACAACAGAAGAACTGACAAGT  
 CATCATCGTCAACACGGGATAACAAGTATGCAGACACGTACTTCCCATCCATTTAATTTGGCCACTACCACATTT  
 ACAGAGACTACACAAGAGCAATCGACATTCAGTATTGAACATACAGTCCAGACTTATACATGTCCAACATGTGGG  
 AGTCAAGCTAACATTCCAGTGACCGTTTTCATTACAAAATACAACCTCAAACACTACCAATAACGCAATTAAGGAC  
 GCCAATCACAACTCGGTTTATGGGGCAGATGACAACCTGATAATAACTGCACATATCTACCAACTTACCTAAGT  
 GATGAAGAAGTAATTCGCATAAATCAGAGCCAGAAAATTGAAGACAGAGAATTTTCGATGGTGACATGGCATCCA  
 GCAGAAATACGAGATACAGAACGCCGTAGGGATAGCGACACAAGTAACCAGATACGAGATGAAGTTTGGGTTGAT  
 AGTCTTGGGAAATTGCTGGAAGTCAAATAACTGGAGTAATAGTACCTGGAACAAGCGAAATCGTTAGCGCAAGT  
 GAAGCATTTTACCGTGGTCTACTAAGAGTAGTATACTGGGATTATGAAAAACTTGGACCTAGACAATCATCAGTA  
 GATTCACAGTTTCCATACCCTCGCAGATGCAGTGATTTCTAAGGCAGTTTCGGTTAGCTAGTGATAGATATCGAA  
 GAACGCAGCATCATGGATGCCAAAATAGTTTGGAGGACCAGAGATACACGAGTAGTATCTAGTACATTCATAGTA  
 CTGATGCAGTCAAACAGCTAACCAATTATCTGGGACGGTGCATCTGCATACGAGCTTGTCTATGAAAAGACGGTC  
 AAGTGGTGTTTTACATCGTCCGAGTTCCATTGAATCGGATCCGGATGAGATTAAGGGGGTATGAG

**5.1.2 Screening 2 mit dem *bait*-Konstrukt TK6-SH2 + TK3-TK pBridge****Klon 1.13 pGADT7-5' (1167 bp)**

CCATGAGGCAGACGTCCACTATGCAAAACGTGGAGATCGTTCGAGTAGTACATGAAGAATTACTTACAGAGGACTA  
 TAGGGAAAGAGGAAGTTCACTTACTCTCGTGTGGCCACGGACAGTTTCCAAGAGAAAACACCCCACAGGATAT  
 AGATTTGCATGAAATGCATGAACATGAGACAGTCATATATACTGATGCTGAGATTTGTTTGCAGAAATTTACTGAA  
 AGTATGGGGAGAGCAATACTTGTCTTCTAGATTACGAACGATCGGTAGATACTCAGAGCTTTCAGTTAGTCTTGA  
 TCGAAGTATACATACAGCAGAAAAATCACGGCTGGTTGAAGCGAAGACACAGTTTACTTCAACGGGTAACCTTAGT  
 GAGTCAAATCAGAAATCTTGAGAATATAGGAACACAGACTAGTATGATATTCTCCTTATCACTCGACCTCCACACAA  
 AAATAAAGGATACAACGTGGCCGTAGCTTTCATTTCTGGAGGAACAAATCAGCCACCACCGACGCGTAGTGGCTC  
 GGTAGTAAGTCCACTGTCCCGGACAACAGAAGAAGTACAAGTCAATCCTCAACACGGGATAACAAGTATGCA  
 GACACGTACTTCCCATCCATTTAATTTGGCCACTACCACATTTACAGAGACTACACAAGAGCAATCGACATTCAG  
 TATTGAACATACAGTCCAGACTTATACATGTCCAACATGTGGGAGTCAAGCTAACATTCCAGTGACCGTTTCATTC  
 ACAAATACAGCCTCAAACACTACCAATAACGCAATTAAGGACGCCCCAACCAAACTCGGTTTATGGGGCAGAT  
 GACAACCTGATAATAACTACACATATCTACCAACTTACCTAAGTATGAAGAAGTAATTCGCATAAAATCAGAGCCA  
 GAAAATTGAGACAGAGAATTTTCGATGGTGACATGCATCCAGCAGAATACGAGATACAGAACGCCGTAGGATAGC  
 GACACAGCACAGATACGAGATGAAGTTTGGTGATAGTCTGGAAATGCTGACTCAAATAACTGGGAGTATAGTACT  
 GACAGCGAATCGTTAGCGCAGTGAAGCTTACGTGCTCACTAAGAGAGATACTGGGATTATGAAAAACTTGGACT  
 AGACAATCTCTCAGTGGATTCCACGGTTCCTTACACCTCCCC

**Klon 6.1 pGADT7-5' (1083 bp)**

GACTTTGGCGGGGCGATGACACTGATAATAACTGCACATATCTACCAACTTACCTAAGTATGAAGAAGTAATTC  
 GCATAAATCAGAGCCAGAAAATTGAAGACAGAGAATTTTCGATGGTGACATGGCATCCAGCAGAAAATCAGAGATA  
 CAGAACGCCGTAGGGATAGCGACACAAGTAACCAGATACGAGATGAAGTTTGGGTTGATAGTCTGGGAAATTCG

TGGAACCTCAAATAACTGGGGTAATAGTACCTGGAACAAGCGAAATCGTTAGCGCAAGTGAAGCATTTTACCGTG  
 GTCTACTAAGAGTAGTATACTGGGATTATGAAAACTTGGACCTAGACAATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCA  
 TACCACTCGCAGATGCAGTGATTTCTAAGGCAGTTTCGGTTAGCTAGTGATAGAATATCGACAGAAACGCAGCCAT  
 CATTGGATGCCAAAATAGTTTGGAGGACACCAGAGATACAACGAAGTAGGTATCTAGTACATTCAATTAGACCTG  
 ATGCAGGTCAAACAAGCATAACCCAATTAATCTGGACGTTGCATCTGCAATACGAGCTGGTCTAATTGACAAAAG  
 AAACCGGTCAAATGTTGTTTACACATTCTGTTTACGAGTCACCATTTAGTACTGATTCACCGATAAGTAAAAAAG  
 GTGATAGTAGCTCTGACCAAACCTGAACGATTGTCAGTCAGAGAAGCAATTGTACGTGGATTTTTAGTTGCGGAAT  
 TAATAGAACCAGAATCATCGTATATAACAAAGCAAAGTTTACCATTTATTGTTCCAAGTACAAGTTATTCACACT  
 CTCCAACCTGATGTTGACATTTGACCTGTGTTTGTGATCATTATTATTATTATTGAAAAAAGCGAATACACATGAAG  
 CATGTTTGTAACTCGAAAACCTGACCCCGTCTGTGTATAAGTATGGCTCTCTCAAAGAAAAATAAATAAGCGTCTG  
 CATTATTTATCACACTCTACGTCGTATGATGTGTAGCTATATTCAGCATCACTACTCTTTTCTGTTTACGTGCGT  
 TTTCTTTTAAACAAACAAACGAACATACTACT

### Klon 6.1 pGADT7-3'(invertiert) (1103 bp)

AGAGTATGCATAATCAGACCAGAAATGAGACAGAGAATTTTCGATGTGACATGCATCCAGCAGAAATCGAGATACA  
 AAACGCCGTAGGATAGCGACACAGTACCAGAAACGAGATGAGTTTGGGTGATAGTCTGGGAAAATGCTGAACTCC  
 AAAAACTGGGTAATAGTACCTGGACAAGCGGAAATCGTTAGCCCAAGTGAAGCATTTACCGTGGTCTACTAAGA  
 GTAGTATACTGGGATTATGAAAACTTGGACCTAGACAATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCATACCCTCGCAG  
 ATGCAGTGATTTCTAAGGCAGTTTCGGTTAGCTAGTGATAGAATATCGACAGAAACGCAGCCATCATTGGATGCCA  
 AAATAGTTTGGAGGACACCAGAGATACAACGAAGTAGGTATCTAGTACATTCAATTAGACCTGATGCAGGTCAA  
 ACAAGCATAACCCAATTAATCTGGACGTTGCATCTGCAATACGAGCTGGTCTAATTGACAAAAGAAACCGTCAA  
 TGTGTTTACACATTCTGTTTACGAGTCACCATTTAGTACTGATTCACCGATAAGTAAAAAAGGTGATAGTAGCT  
 CTGACCAAACCTGAACGATTGTCAGTCAGAGAAGCAATTGTACGTGGATTTTTAGTTGCGGAATTAATAGAACCAG  
 AATCATCGTATATAACAAAGCAAAGTTTACCATTTATTGTTCCAAGTACAAGTTATTCACACTCTCCAACCTGATG  
 TTGACATTTGACCTGTTGTTTGTGATCATTATTATTATTATTGAAAAAAGCGAATACACATGAAGCATGTTTTGTA  
 ACCTCGAAAACCTGACCCCGTCTGTGTATAAGTATGGCTCTCTTCCAAAAGAACAAATAAAATTAAGCGTCTGC  
 ATTATTTAATCAACACTTTACGTCGTATGTATGTGTAGCTAATTATTTCAAGCATCAACTTACTCTTTTCTGTT  
 TTACGTCGCTTTTTCTTTTTAAACAACAAAACAAAACGAAACCACTTACTTACCTAACCAAAATATTTAATATA  
 AACAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAGTAGCCGTTGGGTT

### Klon 9.10 pGADT7-5' (1096 bp)

CCATGCGGGACTCACCTACCAATAACGCAATTA AAAAGACGCCAATCACAAAACCTCGGTTTATGGGGCAGATGACA  
 ACTGATAATAACTGCACATATCTACCAACTTACCTAAGTGATGAAGAAGTAATTCGCATAAATCAGAGCCAGAAA  
 ATTGAAGACAGAGAATTTTCGATGGTGACATGGCATCCAGCAGAAATACGAGATACAGAACGCCGTAGGGATAGC  
 GACACAAGTAACCAGATACGAGATGAAGTTTGGGTTGATAGTCTGGGAAAATGCTGGAACCTAAAAATAACTGGA  
 GTAATAGTACCTGGAACAAGCGAAATCGTTAGCGCAAGTGAAGCATTTTACCGTGGTCTACTAAGAGTAGTATAC  
 TGGGATTATGAAAACTTGGACCTAGACAATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCATACCCTCGCAGATGCAGTG  
 ATTTCTAAGGCAGTTTCGGTTAGCTAGTGATAGAATATCGACAGAAACGCAGCCATCATTGGATGCCAAAATAGTT  
 TGGAGGACACCAGAGATACAACGAAGTAGGTATCTAGTACATTCAATTAGACCTGATGCAGGTCAAACAAGCAT  
 AACCCAATTAATCTGGACGTTGCATCTGCAATACGAGCTGGTCTAATTGACAAAAGAAACCGTCAAATGTTGTTT  
 ACACATTCTGTTTACGAGTCACCATTTAGTACTGATTCACCGATAAGTAAAAAAGGTGATAGTAGCTCTGACCAA  
 ACTGAACGATTGTCAGTCAGAGAAGCAATTGTACGTGGATTTTTAGTTGCGGAATTAATAGAACCAGAAATCATCG  
 TATATAACAAAGCAAAGTTTACCATTTATTGTTCCAAGTACAAGTTATTCACACTCTCCAACCTGATGTTGACATT  
 TGACCTGTGTTTGTATCATTATTATTATATGAAAAAGCGATACACATGAAGCATGTTTTGTACCTCGAAAACCTGA  
 CCCCCTCTGTGTATAAGTATGTCTCTCAAAGACATAATAAAGCGTCCGATAATATCACCTCTACGTCGTATGTAT  
 GTGTAGCTATATTCAGCATCACTACTCTTTTTCTGTTTACGTCGCT

### Klon 10.2 pGADT7-5' (1127 bp)

CCATTGAGGTACGCATTACAGACGCCAATCACAAAACCTCGGTTTATGGGGCAGAATGACAACCTGATAATAACTGCA  
 CATATCTACCAACTTACCTAAGTGATGAAGAAGTAATTCGCATAAATCAGAGCCAGAAAAATGAAGACAGAGAAT  
 TTTTCGATGGTGACATGGCATCCAGCAGAAATACGAGATACAGAACGCCGTAGGGATAGCGACACAAGTAACCAGA  
 TACGAGATGAAGTTTGGGTTGATAGTCTGGGAAAATGCTGGAACCTAAAAATAACTGGAGTAATAGTACCTGGAA  
 CAAGCGAAATCGTTAGCGCAAGTGAAGCATTTTACCGTGGTCTACTAAGAGTAGTATACTGGGATTATGAAAAAC  
 TTGGACCTAGACAATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCATACCCTCGCAGATGCAGTGATTTCTAAGGCAGTTC  
 GGTTAGCTAGTGATAGAATATCGACAGAAACGCAGCCATCATTGGATGCCAAAATAGTTTGGAGGACACCAGAGA  
 TACAACGAAGTGGGTATCTAGTACATTCAATTAGACCTGATGCAGGTCAAACAAGCATAACCCAATTAATCTGG  
 ACGTTGCATCTGCAATACGAGCTGGTCTAATTGACAAAAGAAACCGTCAAATGTTGTTTACACATTCTGTTTACG  
 AGTCACCATTTAGTACTGATTCACCGATAAGTAAAAAAGGTGATAGTAGCTCTGACCAAACCTGAACGATTGTCAG  
 TCAGAGAAGCAATTGTACGTGGATTTTTAGTTGCGGAATTAATAGAACCAGAAATCATCGTATATAACAAAGCAA  
 GTTTACCATTTATTGTTTCCAAGTACAAGTTATTCACACTCTCCAACCTGATGTTGACATTTGACCTGGTGTGTTGA  
 TCATTATTATTATTATTGAAAAAAGCGATACACATGAAGCATGTTTTGTACCTCGAAAACCTGACCCCGTCTGTG  
 TATAAGTATGGTTCTCTTCCAAAGACAGTAAATAAGCGTCCGATATATCACACTCTACGCCGATGGATGTGGAG

CTATTATTTCAGCATCACTACTCTGCGAGTACGCGCGCTTTTTTTCTTTTTTAACAACAAAACAAAACGGAACATA  
AC

### Klon 17.10 pGADT7-5' (1118 bp)

CCTATGGGCTGCATGGTTCAGACGCGTAATCGTTCTCTTCGAGAATAAGGTGACTGGACGGGAAGAGAGAAGGAG  
GCCAGAACTGTGAACGGGGGAGAACGAAGGGCGCTCCCCACCGGGACCATCCCATGGAAAGCGCCCGCGCCTTT  
CGTTCGATGTCCCCTTCCCAACCCCGGACTTTATAACTCAATGCCCGGAACGGGCCCGTCAACGGCATATTTAA  
TGATGCATTCTTGTAGTGCAGCCTTACACAAAAAATGGGACTTCTTTTAATTGATTTTTAGGGCACGGAACCG  
GAAAATACAAAACTACGTCATAGTTAAAGCGTTCAGCGAGACTAACCAGCGCAACTAGCCTCCGCTTGAATCT  
AACTCAGAAAGGAAACTGGGGGTGTGTACGTCTCCAACATCTGCTGACGAGACTGCAGCTCCTCGGAGACCT  
ACGGAAGACTGAGCCCCGACGTTTGGCGTTAATCGAATGCTATGACTGATTTCGCGAAAAATACAGAGCAGGAAGAC  
TATGGATGTGCAACCTCACTTGTAAAAGATACGGTATTACCGCCACTGACAACGAAAAATGCAGATCGGAACCCG  
AGGGCCCCCCTCTCTGAATGACTCTGATGACTACATCAATGTCCCCTTCCCTGTGGGTGACAGGAAGGCATTT  
CTGGAGACTGCTCTGGTGCTCCCGATTTTCGACCCCTCCTCTGGTTTTCCAGGAAGGGACCCCGAGAGTGGAATG  
CGTCTCCTTTCTCTGGCGGGGTGTTGTCTGCTCCGACCCCGAGATCCGTGATGGTGACGGCATCTCAGGTCAC  
GAGACCATCTCTTTTCGTACGGGGTAAAGGTTTTTCGCTTCCACCTGCCAAATGTCCCTGGTTCTCTATTGAGAA  
AAAGTATATCCCCATGTCCGGGAGATGGAGGATCCACGCCGAATTCGTGCGGTGATGAGTAGCGTTTCTCTCTGA  
TAGCCACCATGCAATGCCTGAGTCTTGCGTAAGAATAAGCTGGATGCCAAGAGCAATATGCTCGCTCTGTCCG  
AGAACTGGTAGAATACTACGTTTCGGCGGACCTATAATAAACAGGGACAGTCCCTCTCCGTTGTCAAT

### Klon 18.4 pGADT7-5' (1090 bp)

CCAGGCGGTAGCGTAGTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGTGCGCGACAACAGAAGAAGTGCAGTGCATCATCGTC  
AACACGGGATAACAAGTATGCAGACACGTACTTCCCATCCATTTAATTTGGCCACTACCACATTTACAGAGACTA  
CACAAGAGCAATCGACATTCAGTATTGAACATACAGTCCAGACTTATACATGTCCAACATGTGGGAGTCAAGCTA  
ACATTCAGTGACCGTTTCAATTCACAAATACAACCTCAAACACTACCAATAACGCAATTAAGGAGCGCCCAATCAC  
AAACTCGGTTTATGGGGCAGATGACAACCTGATAATAACTGCACATATCTACCAACTTACCTAAGTGATGAAGAAG  
TAATTCGCATAAATCAGAGCCAGAAAATTGAAGACAGAGAATTTTCGATGGTGACATGGCATCCAGCAGAAAATAC  
GAGATACAGAACGCCGTAGGGATAGCGACACAAGTAACCAGATACGAGATGAAGTTTGGGTTGATAGTCTTGGGA  
AATTGCTGGAACCTAAAATAACTGGAGTAATAAAAACCTGGAACAAGCGAGATCGTTAGCGCAAGTGAAGCCTTTT  
ACCGTGAACCTCCCAATATTAACCTGGCTTTAACACGCAATTCGACGACCGTCCCCAGTCAACAGAAAGGA  
ATTTTCAGACTATTGGTATATGCAATTGATTGAGCGACGGTCTGATGTATATACTACAGGAGGAGAAAGTGA  
GAGGACACTGTCTCAGGTTTGATTGGCAGTACATTCGTGTCTTGTATACCAGAGACAAATGCTGAAGATAATATT  
CAGCTCTCGACAGATAAATACTGCTATGACTGAATCTTGGACTTACAACCTGCAATGGTGCTAGACTACTATTCCG  
CGAGACCTGTTCTCATGTTCCGTATAATTTTCTTCTTTAAGATTTCGACTCATACTTACACATATCTACTGCTAC  
CCACGAGCAAATGCTGAGTCTCGAAAATGTGAGCACTACCCCGCTCATTCTTCTTCTGTCTTGACTCTTATGAGA  
TACTCTGTGTTTTTCTAAACAGGACCACTCCGACGTTTCAAT

### Klon 36.3 pGADT7-5' (1140 bp)

NACGTCCGGCAGNCCACGTANGCCAAACGNNGGAAGNATCGTTTCGAGCTAGGTACATGCAAGCAATTAAGTGTAC  
NGNAGGACTATAGGGNAAAGAGGAAGATTACATTGACTCTCGTGTGGCCACCGACAGTTTTCCAAGAGCAAAC  
NCACCCACAGGATATAGATTTGCATGAAATGCATGAACATGAGACAGACATNTNACTGATGCTGAGATTTGTTT  
GCNNAATTTACTGAANGTATGGGGAGAGCAATACTTGTCTTCTAGATTACGAACGATCGGTAGATACTCAGAGCT  
TTCAGTTNGTCTTGATCGANGTATACATACAGCAGAAAAATCACGGCTGGTTGANGCGAAGACACAGTTTTACTTC  
ANCGGGTAACTTAGTGAGTCAAATCAGAAATCTTGAGAATATAGGAACACAGACTAGTGATATTTCTCCTTATCAC  
TCGACCTCCACACAAAAATAAAAGGATACAACGTGGCCGTAGCTTCAATTTCTGGAGGAACAAATCAGCCACCACC  
GACGCGTAGTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGTGCGCGACAACAGAAGAACTGACAAGTGCATCATCGTCAACACGG  
GATAACAAGTATGCAGACACGTACTTCCCATCCATTTAATTTGGCCACTACCACATTTACAGAGACTACGCAAGA  
GCAATCGACATTCAGTATTGAACATACAGTCCAGACTTATACATGTCCAACATGTGGGAGTCAAGCTAACATTC  
AGTGACCGTTCAATTCACAAATACAACCTCAAACACTACCAATAACGCAATTAAGGAGCGCCCAATCACAACCTC  
GGTTTTATGGGGCAGATGACAACCTGANTATAACTGCACATATCTACCAACTTACCTAAGTGAAGAAAGTANTT  
CGCNTAAATCCAGAGCCCAGAAAAATTGGAAGACNGANGAATTTTTTCGATGGGGGACATGGGCATCCCGCCCGNA  
AATNCCNAGATTACAGAAACGCCCCGNTAAGGGAATNCCCGNCCCAAGTNAACCCNGNATTCNAAAAATGAAANN  
TTTGGGGTTGAAAAAGNCCCGGNAATNGNTTGGGANCTCCAAAAAACTNNGGAGNAAAAGTACCNNNGGAA  
NCNAGCCCCAAATNG

### Klon 38.32 pGADT7-5' (932 bp)

GATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCCAACCAACCAAAAAAGAGATCTTTAATACGACTCAC  
TATAGGGCGAGCGCCGCCATGGAGTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAA  
TTCCACCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGAACGAAGGTCAACATATGCAAAAACGT  
GGAGATCGTCGAGTAGTACATGAAGAATTACTTACAGAGGACTATAGGGAAAGAGGAAGTTCACTTGACTCTCGT  
GTGGCCACCGACAGTTTTCCAAGAGAAACACACCCACAGGATATAGATTTGCATGAAATGCATGAACATGAGACA  
GACATATATACTGATGCTGAGATTTGTTTGCAGAATTTACTGAAAGTATGGGGAGAGCAATACTTGCTTTCTAGA

TTACGAACGATCGGTAGATACTCAGAGCTTTCAGTTAGTCTTGATCGAAGTATACATACAGCAGAAAAATCACGG  
 CTGGTTGAAGCGAAGACACAGTTTACTTCAACGGGTAACCTTAGTGAGTCAAATCAGAAATCTTGAGAATATAGGA  
 ACACAGACTAGTGATATTCTCCTTATCACTCGACCTCCACACAAAAATAAAAGGATACAACGTGGCCGTAGCTTC  
 ATTTCTGGAGGAACAAATCAGCCACCACCGACGCGTAGTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGTCGCCGACAACAGAA  
 GAACTGACAAGTCATCATCGTCAACACGGGATAACAAGTATGCAGACACGTACTTCCCATCCATTTAATTTGGCC  
 ACTACCACATTTACAGAGACTACACAAGAGCAATCGACATTGAGTATTGAACATACAGTCCAGACTTATACATGT  
 CCAACCATGTGGGAGTCAAGCTAACATTCCAG

#### Klon 40.8 pGADT7-5' (1050 bp)

CCAATGCGGGGATCAATCAGAATCTTGAGAATATAGGAACACAGACTAGTGATATTCTCCTTATCACTCGACCTC  
 CACACAAAAATAAAAGGATACAACGTGGCCGTAGCTTCATTTCTGGAGGAACAAATCAGCCACCACCGACGCGTA  
 GTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGTCGCCGACAACAGAAGAACTGACAAGTCATCATCGTCAACACGGGATAACAA  
 GTATGCAGACACGTACTTCCCATCCATTTAATTTGGCCACTACCACATTTACAGAGACTACACAAGAGCAATCGA  
 CATTTCAGTATTGAACATACAGTCCAGACTTATACATGTCCAACATGTGGGAGTCAAGCTAACATTCCAGTGACCG  
 TTCATTACAAATACAACCTCAAACACTACCAATAACGCAATTTAAAAGACGCCCAATCACAAACTCGGTTTATGG  
 GGCAGATGACAACCTGATAATAACTGCACATATCTACCAACTTACCTAAGTGATGAAGAAGTAATTCGCATAAAATC  
 AGAGCCAGAAAATTGAAGACAGAGAATTTTCGATGGTGACATGGCATCCAGCAGAAAATACGAGATACAGAACGCC  
 GTAGGGATAGCGACACAAGTAACCAGATACGAGATGAAGTTTGGGTTGATAGTCTGGGAAATTTGCTGGAACCTCA  
 AAATAACTGGAGTAATAGTACCTGGAACAAGCGAAATCGTTAGCGCAAGTGAAGCATTTTACCGTGGTCTACTAA  
 GAGTAGTATACTGGGATTATGAAAACTTGGACCTAGACAATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCATACCCTCG  
 CAGATGCAGTGATTTCTAAGGCAGTTCGGTTAGCTAGTGATAGAATATCGACAGAAAACGCAGCCATCATTTGGATG  
 CCAAAATAGTTTGGAGGACACCAGAGATACAACGAAGTAGTATCTAGTACATTCAATTAGACCTGATGCAGTCAA  
 ACAAGCATAACCCAATTAATCTGGACGTGCATCTGCAATACGAGCTGGTCTAATGACAAGAAAACCGGTCAAATGT  
 TGTTTAC

#### Klon 41.4 pGADT7-5' (1160 bp)

ACATGGGCGGGGCTCAAAAAGTCCATTCATCATCTGTAATACCTAATGAACGATATCGTTCTTACCAGATTTTAT  
 CAAATGAAAAGTACCATAAATCACAACCTGACTAAAACCGTCACAACAACAAATAATCCATGCTTTGGTTCAACTG  
 GTCAGAATACTAGAAAAATAGAATGGTTGGTATAATTGATTATGCAGCAGCTGCTTCAGTGTCCAACCTTACTTA  
 ATGAATGGCCAAATGCTCGTCTAGTTACATTCGAAGTGGTTCGTAACGAATTAATCTATGAGTCGAAATC  
 AAACGGATAAATCTGATATAAATCAACGTGGTTACTCATCAAATAGTGAAGAAAACCTGGTTTAAATATTTGTTG  
 GTGGTGATGGTTCAGAAGCAACATTTATTTCTCATATACAACCTGATAAACCGGCTGGTTTATCAAAAAGGATAT  
 TGGTTGGTGATCGATTGTTAACAGTTAATGGCATAGATGTCGCTAAGTATGGGCATGAGAAAACGGCTGCAGCTT  
 TACGAGATGCGCGTGATCGTGTGATCTTCTTCTAGTCTATAGTCTTGAAGAATATGCTAGTTTTGAGCAACATT  
 TCAGTCTGTCAGCTTAAAGCAGTTGGTTCATAAATATCTTATAAATGCTTACATTCACTGAAAAGCTAAAACCTGCCA  
 ATAGAACAGGGATAGACGGTAAAGATAAAGGATCACCTATACCAGTTATCAAGATAAAAAAGCAATCTGAAGTGA  
 AGAAAGATGAGCTGAAACAAAAAACATAGAACATATTGATAAAAAACGGCAGAAAACATCGTCAACAGAAGCAAA  
 GCGTCAACTTACGAATGAAGCACCTGGCGAAGAAGGAACACATGAAGAGAGTGACGCTAATGAATTGAGTAAAT  
 ATCCTGATGTACTGTTATTACGCTGTCAAGTTGATTATGACCCAATGAAAGAAAATCATCACAAACTATACCTA  
 AAAAGTATTCACTCTAAAGTCAGGTGATTTGGTTCATGTTATTAATACATTGATCCTGAATGTGGCAAGCTCGGA  
 GATCGACCCAGATCATGACACTGGTCATCGGTCTAATTCTAGTCTGTTACGCTAGAAAAGAAAAGACGTACAGGACC  
 GTCATGTAAATTTTTATGGCTAAAAACAGTCGATC

#### Klon 43.3 pGADT7-5' (918 bp)

CGCAATGACGGGCAGCTTACTTACGGGTAACCTTAGTGAGTCAAATCAGAAATCTTGGAATATAGGAACACAGA  
 CTAGTGATATTCTCCTTATCACTCGACCTCCACACAAAAATAAAAGGATACAACGTGGCCGTAGCTTCATTTCTG  
 GAGGAACAAATCAGCCACCACCGACGCGTAGTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGCCGCCGACACAGAAGAACTGAC  
 CAGTCATCATCGCCAAACCGGACGATGAAGCAAGTTTTCCCGGATTTCCCATCCATTTATCTTGGGCACTACCAC  
 ATTTAAGAGACTAACCTGAGCACTCGACATTAACTATTGAAACTATGGTAGTGACTTAATTTAGTCTTGACCGC  
 TTCTTTCTTTTTGGAATTAAGAAATAGTTTATTTCTTTTTCCCGATCTTTGATATTCCACTGGGAATFACAAAA  
 ACGCACATTTCTTTTCGATTCCCTTTTTTCTGAACTGATCACCTTAGCAGAACTCTTGATCTCTACCAGCAGTGA  
 TCTCTACCAGCTGTCACTGGTGCTCTCAGAGAGCGGATGACTGAAAAACCAAATCCAGGAACGCAACTGACCTCT  
 ACTTCTGGACTCCAGCCTCCTTCTTATAAAGTCCCATGAACTTCTTAGTGAGAATCTAACCTGTCAAAGTACAAT  
 AGAGCCACCTATGGAGTAAGGGATCTGCGTTTCTCATCTTAGAATGAAATGCCCTTTGAATCAGGCAAGAAAACGT  
 AACATAGAAGACAACCTTTAAGACTCCCCTTACAACACACTGTTAATTTATACACCATCACTGGACCACGTACTC  
 TCCAGATGCCTTCGTATATGCACCTTCTTCTCCTTGATAATTTAAATGAAAAGTATCTCTAACCTGCCAAGCAGCA  
 GAAATTGAGACGATTCTT

#### Klon 45.4 pGADT7-5' (1174 bp)

CCCAGTGGCGGGGAGGCTGGCTGAGCGAGACACAGTTTACTTCAACGGGTAACCTTAGTGAGTCAAATCAGAAATC  
 TTGAGAATATAGGAACACAGACTAGTGATATTCTCCTTATCACTCGACCTCCACACAAAAATAAAAGGATACAAC  
 GTGGCCGTAGCTTCATTTCTGGAGGAACAAATCAGCCACCACCGACGCGTAGTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGT

CGCCGACAACAGAAGAACTGACAAGTCATCATCGTCAACACGGGATAACAAGTATGCAGACACGTTACTTCCCATC  
 CATTTAATTTGGCCACTACCACATTTACAGAGACTACACAAGAGCAATCGACATTCAGTATTGAACATACAGTCC  
 AGACTTATACATGTCCAACATGTGGGAGTCAAGCTAACATTCCAGTGACCGTTTCATTACAAAATACAACCTCAA  
 CACTACCAATAACGCAATTAAGACGCCCAATCACAACTCGGTTTATGGGGCAGATGACAACCTGATAATAACT  
 GCACATATCTACCAACTTACCTAAGTGATGAAGAAGTAATTCGCATAAATCAGAGCCAGAAAAATTGAAGACAGAG  
 AATTTTCGATGGTGACATGGCATCCAGCAGAAATACGAGATACAGAACGCCGTAGGGATAGCGACACAAGTAACC  
 AGATACGAGATGAAGTTTGGGTTGATAGTCCTGGGAAATTGCTGGAACCTCAAAAATAACTGGAGTAATAGTACCTG  
 GAACAAGCGAAATCGTTAGCGCAAGTGAAGCATTTTACCGTGGTCTACTAAGAGTAGTATACTGGGATTATGAAA  
 AACTTGGACCTAGACAATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCATACCCTCGCAGATGCAGTGAATTTCTAAGGCAG  
 TTCGGTTAGCTAGTATAGAATATCGACAGAAACGCAGCCATCATTGGATGCCAAATAGTTTGGAGGACACCAGA  
 GATACAACGAAGTAGGTATCTAGTACATTCAATTAGACCTGATGCAGGTCAAAAACAAGCATAACTCAATTAATCT  
 GGACGTTGCATCTGCAATACGAGCTGGTCTATGACAAGAAGCGGTCAAATGTTGTTTACACATCTGTTACGAGTC  
 ACCATTTAGTACTGATCACCGAATAAGTAAAAAGGTGAATAGTTAGCTC

### Klon 50.9 pGADT7-5' (1052 bp)

TAATGGCGGCAGGAGTGAAGTTATGGGAATTCTAATTCGTCTAATAATGATCAAAACAGTTGGATCACGGTTAC  
 TCCTAATGACGCTTCTGCGCCTATGTTTGAACCATCACTTCGGTCTGTAGTAGAAAAGACGACCTATTTCCCCTC  
 TAAAAATTCGCTCAATAATGGTCAAGCATCCAATTCTATGCTTCCAGCAGCGATAGCACCAGATTCTTCACAAAG  
 CTTTGATCAGATACGCTACCAACCCTGTAATGCTAATTATGTTTCCGATGTAGTTCAGCAGATCAAGGGAGCGAA  
 ACGGACAAATGATTTTCGTAGGTGTTCCAGTGACTATTGGAGATAAATCGTCTATTGGAAATTCATCATGTCTACC  
 TAACACTCATCAGTCAACGAACCTTCTCACCACACTCAACAGCCTGCTAACTTCCCTAAACAATTCAGTTGCACATAT  
 GCGAAATAATCCATCACATAATTCACCCAGATACCTACAGAAGGGCAGTTTGTGCTTTACATGATTATGTTAA  
 ACGTGTAGATGATGATTTGAATATGACCAAAGGACAAAATATTCAATATACTCGATAATTCACACTGTGATTGGTG  
 GTATGCGGAATGTGTATCTACTGGTAATCGAGGATATGTACCCAAAAATCATTTAGCAGCTGTTACCAGTTTGGGA  
 ATCCAATGAATGGTATTTTGGAGAATTGAAACGTATTGAAGCTGAACATTATCTTCAACTCCCGGGAAATGATCA  
 TGGCTCTTTTTTGGTTCGAATCAGTGAATCTCAATCCAGTGAATATTCTTTATCAGTACGAGAAGAGAATACTGT  
 CAAGCATTATCGTATTCGATCAAGATATTCACGAACCTGATCCTACATTA AAAACGTTTCTACATTTCAAGACATTG  
 CCTTTTGTGATATTCAACAGCTAGTCAATCATTATTTAGAGAATCAATCTGGTTTATGTTGTGCGATGGAAACCGT  
 GTATTGCACACTCATCAGACCTGTGGGTCTTTCACACAACCTCATGATAAATGGAAATCCAAATCTCATTATTTGA  
 GA

### Klon 54.7 pGADT7-5' (1069 bp)

CATTTGGCCGGGGTGGGAGATGACAACCTGATTATAACTGCACATATCTACCAACTTACCTAAGTGATGAAGAAGT  
 AATTCGCTTAAATCAGAGCCAGAAAATTGAAGACAGAGAATTTTCGATGGTGACATGGCATCCAGCAGAAATACG  
 AGATACAGAACGCCGTAGGGATAGCGACGCAAGTAACCAGATACGAGATGAAGTTTGGGTTGATAGTCCTGGGAA  
 ATTGCTGGAACCTCAAAAATAACTGGAGTAATAGTACCTGGAACAAGCGAAAATCGTTAGCGCAAGTGAAGCATTTTA  
 CCGTGGTCTACTAAGAGTAGTATACTGGGATTATGAAAAACTTGGACCTAGACAATCTTCAGAAAAATCAACAGT  
 TTCCATACCCTCGCAGATGCAGTGAATTTCTAAGGCAGTTCGGTTAGCTAGTATAGATAAATATCGACAGAAACGCA  
 GCCATCATTGGATGCCAAAATAGTTTGGAGGACACCAGAGATACAACGAAGTAGGTATCTAGTACATTTCAATTTAG  
 ACCTGATGCAGGTCAAAAACAAGCATAACCCAATTAATCTGGACGTTGCATCTGCAATACGAGCTGGTCTAATTTGA  
 CAAAGAAACCGGTCAAATGTTGTTTACACATTTCTGTTTACGAGTCAACATTTAGTACTGATTCACCGATAAAGTA  
 AAAAAGGTGATAGTAGCTCTGACCAAACCTGAACGATTGTCAGTCAAGAGAAGCAATTTGTACGTGGATTTTTAGTTG  
 CGGAATTAATAGAACCAGAATCATCGTATATAACACAGCAAGTTTACCATTTATTGTTCCAAGTACAAGTTATTC  
 AACTCTCCAACCTGATGTTGACATTTGACCTGTTGTTTGTATCATTATTATTATTGAAATCAGCGAATACACA  
 TGAAGCATGTTTTGTGACCTCGAAAAACTGACCCCGTCTGTGTATAAGTATGATTCTCTTCCAAAAGAACATAAA  
 ATTAAGCGTCGCATATTCATTCACACTCTCCGTGACGTTGGTGAGCAATAATTCAGCATCACTACTCTTTTCCGT  
 TTACGTCGCTTTTCCCAT

### Klon 56.15 pGADT7-5' (946 bp)

ATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTTTAATACGACTCACTATAG  
 GGCGAGCGCCGCATGGAGTACCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTTCCA  
 CCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGGATGGGAGTGGATAGTTATGGGAAATTTCTAATTC  
 GTCTAATAATGATCAAAAACAGTTGGATCACGGTTACTCCTAATGACGCTTCTGCGCCTATGTTTGAACCATCACT  
 TCGGTCTGTAGTAGAAAGACGACCTATTTTCCCCTCTAAAAATTCGCTCAATAATGGTCAAGCATCCAATTTCTAT  
 GCTTCCAGCAGCGATAGCACCAGATTCTTCACAAAGCTTTGATCAGATACGCTACCAACCCTGTAATGCTAATTA  
 TGTTCGATGTAGTTCAGCAGATCAAGGGAGCGAAACGGACAAATGATTTTCGTAGGTGTTCCAGTGAATTTGG  
 AGATAAATCGTCTATTGGAAATTCATCATGTCTACCTAACACTCATCAGTCAACGAACCTTCTCACCACCTCAACA  
 GCCTGCTAACTTCCATAACAATTCAGTTGCACATATGCGAAATAATCCATCACATAATTCACCCAGATACCTAC  
 AGAAGGGCAGTTTGTGCTTTACATGATTATGTTAAACGTGTAGATGATGATTTGAATATGACCAAAGGACAAAT  
 ATTCATATACTCGATAATTCACACTGTGATTGGTGGTATGCGGAATGTGTATCTACTGGTAATCGAGGATATGT  
 ACCCAAAAATCATTAGCAGCTGTTACCAGTTTGGAAATCCAATGAATGGTATTTTGGAGAATTGAAACGTATTGA  
 AGCTGAACATTATCTTCAACTCCCGGGAAATGATCATGGCTCTTTT

**Klon 58.3 pGADT7-5' (1039 bp)**

ACAAGGCGGGGATGGAAGTTATGGGAATTCTAATCCGTCTAATAATGATCAAAACAGTTGGATCACGGTTACTC  
 CTAATGACGCTTCTGCGCCTATGTTTGAACCATCACTTCGGTCTGTAGTAGAAAGACGACCTATTTCCCTCTA  
 AAAATTCGCTCAATAATGGTCAAGCATCCAATTCTATGCTTCCAGCAGCGATAGCACCAGATTCTTCACAAAGCT  
 TTGATCAGATACGCTACCAACCCTGTAATGCTAATTATGTTTCCGATGTAGTTCAGCAGATCAAGGGAGCGAAAC  
 GGACAAATGATTTTCGTAGGTGTTCCAGTGACTATTGGAGATAAAATCGTCTATTGGAAATTCATCATGTCTACCTA  
 AACTCATCAGTCAACGAACCTTCTACCAACTCAACAGCCTGCTAACTTCCCTAAACAATTCAGTTGCACATATGC  
 GAAATAATCCATCACATAATTCACCCAGATACCTACAGAAGGGCAGTTTGTGTGCTTACATGATTATGTTAAAC  
 GTGTAGATGATGATTTGAATATGACCAAAGGACAAATATTCAATATACTCGATAATTCACACTGTGATTGGTGGT  
 ATGCGGAATGTGTATCTACTGGTAATCGAGGATATGTACCCAAAAATCATTTAGCAGCTGTTACCAGTTTGGAA  
 CCAATGAATGGTATTTTGGAGAATTGAAACGATTTGAAGCTGAACATTATCTTCAACTCCCGGAAATGATCATG  
 CCTCTTTTTTGGTTTCAATCAGTGAATCTCAATCCAGTGAATATTCTTTATCAGTACGAGAAGAGAACTGTCA  
 AGCATTATCGTATTCGATCAAGATATTCACGAACGATCCTACATTAACGTTTCTACATTCAGACATTGCCCT  
 TTTGTGATATTCAACAGCTAGTCAATCATTATTTAGAGATCATCTGCATTATGTTGTGTCGATGGAAAACGTGCATC  
 GACTCATCAGACTGTGGTCTTTACACAACCTCATGATAATGGAATCAATCTCATTATTTGAG

**Klon 59.1 pGADT7-5' (1075 bp)**

CCATGGCGGGGACGGTAGATACTCAGAGCTTTCAGTTAGTCTTGATCGAAGTATACATACAGCAGAAAAATCACG  
 GCTGGTTGAAGCGAAGACACAGTTTACTTCAACGGGTAACCTTAGTGAGTCAAATCAGAAATCTTGAGAATATAGG  
 AACACAGACTAGTGATATTCTCCTTATCACTCGACCTCCACACAAAAATAAAAGGATACAACGTGGCCGTAGCTT  
 CATTCTGGAGGAACAAATCAGCCACCACCGACGCGTAGTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGTCGCCGACAACAGA  
 AGAACTGACAAGTCATCATCGTCAACACGGGATAACAAGTATGCAGACACGTAATCCCATCCATTTAATTTGGC  
 CACTACCACATTTACAGAGACTACACAAGAGCAATCGACATTCAGTATTGAACATACAGTCCAGACTTATACATG  
 TCCAACATGTGGGAGTCAAGCTAACATTCAGTGACCGTTCAATTCACAAATACAACCTCAAACACTACCAATAAC  
 GCAATTAAGAGACGCCCAATCACAAACTCGGTTTATGGGGCAGATGACAACCTGATAATAACTGCACATATCTACC  
 AACTTACCTAAGTGATGAAGAAGTAATTCGCATAAAATCAGAGCCAGAAAAATGAAGACAGAGAATTTTCGATGGT  
 GACATGGCATCCAGCAGAAATACGAGATGCAGAACGCCGTAGGGATAGCGACACAAGTAACCAGATACGAGATGA  
 AGTTTGGGTTGATAGTCTGGGAAATTGCTGGAACCTCAAATAACTGGAGTAATAGTACCTGGAACAAGCGAAAT  
 CGTTAGCGCAAGTGAAGCATTTTACCGTGTCTACTAAGAGTAGTATACTGGGATTATGAAAAACTTGGACCTAGA  
 CATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCATACCACCTCGTAGATGCAGTGATTCTAAGGCAGTTCGGTTAGCTAGT  
 GATAGAATATCGACAGAAACGCAGCATCATGATGCCAAATAGTTTGGAGACACCAGAGATACACGAGTAGGTATCT  
 AGTACATTCATTAGACCTGATGCAG

**Klon 63.4 pGADT7-5' (1062 bp)**

CCATGCGGGGATGAGCGAGAACAGTTTACTTCAACGGGTAACCTTAGTGAGTCAAATCAGAAATCTTGAGAATAT  
 AGGAACACAGACTAGTGATATTCTCCTTATCACTCGACCTCCACACAAAAATAAAAGGATACAACGTGGCCGTAG  
 CTTCAATTTCTGGAGGAACAAATCAGCCACCACCGACGCGTAGTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGTCGCCGACAAC  
 AGAAGAAGTCAAGTCATCATCGTCAACACGGGATAACAAGTATGCAGACACGTAATCCCATCCATTTAATTT  
 GGCCACTACCACATTTACAGAGACTACACAAGAGCAATCGGCATTTCAGTATTGAACATACAGTCCAGACTTATAC  
 ATGTCCAACATGTGGGAGTCAAGCTAACATTCCAGTGACCGTTTCATTACAAAATACAACCTCAAACACTACCAAT  
 AACGCAATTAAGAGACGCCCAATCACAAACTCGGTTTATGGGGCAGATGACAACCTGATAATAACTGCACATATCT  
 ACCAACTTACCTAAGTGATGAAGAAGTAATTCGCATAAAATCAGAGCCAGAAAAATGAAGACAGAGAATTTTCGAT  
 GGTGACATGGCATCCAGCAGAAATACGAGATACAGAACGCCGTAGGGATAGCGACACAAGTAACCAGATACGAGA  
 TGAAGTTTGGGTTGATAGTCTGGGAAATTGCTGGAACCTCAAATAACTGGAGTAATAGTACCTGGAACAAGCGA  
 AATCGTTAGCGCAAGTGAAGCATTTTACCGTGGTCTACTAAGAGTAGTATACTGGGATTATGAAAAACTTGGACC  
 TAGACAATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCATACCCTCGCAGATGCAGTGATTCTAAGGCAGTTCGGTTAGC  
 TAGTGATAGAATATCGACAGAACGCAGCCATCATTGGATGCCAAAATAGTTTGGAGGACACCAGAGATACACGAG  
 TAGTATCTAGTACATCATAGACTGATGCAGTCAAACAGCATACCATATCTGGACGTGCATCTGCATACGAGCTGG  
 TCTAATGACAGG

**Klon 66.8 pGADT7-5' (147 bp)**

CTTGTGGGGTATGTTTTAGCAAGAGATGCATTATCAAAGCCAGATTTAGGCTGCTCCCTAGCTAAAGGGCTGTCCG  
 TTCAATGGTGGAGGTTTCCATTGGGGTATTTTTGTTGTCCATTTCCACACTCGGATATGGTGATGGCCTGGTG

## 5.2 Partielle cDNA-Sequenzen der *prey*-Plasmide aus den TK4-*downstream* Yeast Two-Hybrid Screenings

Nachfolgend sind die partiellen cDNA-Sequenzen der *prey*-Plasmide aus den TK4-*downstream* Screenings, sowie in Klammern die Längen der jeweiligen sequenzierten Bereiche angegeben.

### 5.2.1 Screening mit dem *bait*-Konstrukt TK4-*bait1* pBridge

#### Klon 1.1 pGADT7-5' (550 bp)

AAGGTTTTTGCTCCGTCCTTGATGGTGCTTTTTGCTTGCCCTAGACCCGAGTTTCTGCACCAATCCTACAATCTT  
GTGAGGGTGCAGGACTCCTCTCGAAGCATTGATGCTATTTGTTTCGCTCTCCGGACATTTTGTGACCTCGAG  
CTCAAGTATTGCGAAGTTACCTCCCGATAATGTTATCATTTTCGATGAGGTAAGTGTATTCGAGACTCTCCCTCT  
TTGGTCGCTCTCCCTAACACTATTGAAGATATTCCTCTGACATGTCCCTTGCCATATGATGGTGTCTTTTCGAAA  
GACGTTTTTCGAGACGGTTGATCTGATCCAAACATTCTTCTGAACCCGTAAGGGCAGGAGGATGATCAACCGAAC  
CCTTTCTTCTAAATTAACGACGTTTCATGCACCACCGTTTCTAGTTGCTAAAGGCGTTCATGCACTGCCGTGTGTG  
CATGATGATTTCTTGAATCTTCTGTATGACGAAGTCCACATGACCAGTACTTATTCTCAAAACAATGACACT  
CTGCTGAACGACAGATGTTTTTGAC

#### Klon 1.1 pGADT7-3' (417 bp)

ATGGGATTATGTTTTATAATATCCCCTATCTCTCTGGGTTATTTCTGGAATGCTGCACCATTGCTTCTTGAATG  
TTTAGAGAATTATGCAGATCCTCCCGCGACTACATCGCTTAACGATTTGCACTGAAGGACGGATGACAACCGTGC  
CTGCTATCCGTCGTTCCGACATCCCGTCGATGGACTTCATTTTATTAGAGATAATAGGTTGACTCTCAGGCC  
AATTATTGAACTCTGCCTTGGCTTTTCTGTATTTTCCAAGGCATCGCGCCACCATTGATCCATAATCCTTAGACA  
ACCGATACGTACTTCTTCCAATGTATGACTCTATGATGAGGATTACGCTGACGGGCAGAAAGAAAGGAAAACCTT  
GCTCACCCCGATCCTGCTCCCTTCTAATACACTTTTTGT

#### Klon 5.2 pGADT7-3' (1139 bp)

ACATAGGCGGGGAGAGACTGCGACGTTTGAGACGTGGAATGTTGCACTATTACCATTGGATACTTTCTCCCAT  
GGAATTTTGGAAAATCCATTCGCATTAATGCACCAAATGGATCGTCAAATCCAGGATATCCGAGAGAGAAATGGGG  
TCATTGGATGTGCCGTCTACCGTTTCAGTGAACGACTTTCTGAAGGACGCCTACGAAGTAGGTGAGGATGGCAAG  
GTACATTTCAAGGTACGATTCGATGCACAAGGTTTCGCTCCTCAGGACATCAATGTGACGTCGAGTGAGAACCCT  
GTGACGGTACACGCGAAGAAGGAGACGACGACCGATGGTAGGAAGTGTAGTCGGGAGTTCTGTGCTATGGTGCAG  
CTGCCGAAGAGTATTGATGATAGTCAACTGAAATGTCGCATGACAGATGATGGTGTGTTGATGTTAGAGGCTCCA  
GTGAAGTTGATCAGAACCAGTCGTTGACGCTGAACGAGTCTGGTCAGGTGGCTGTTGACCCGAAATCGGACAAT  
CAGATTAAGGCAGTTTCTGCATCACAAGCTCTTGTGCGAAAGGTGTTTCATGGTCTGTGCTATGTTGATGATGGT  
TCAGGTGGGAAGCGACTGCATGTTGAAGTTCAGTGGACCCAGTGTACAAACCTGAAGACTTGTGTTGTAATGTT  
GACTCGAATCGTGTGTTGTTAGTGGACGTCATCATAAGCAGAAGAGTGATCAACATGGAAGGTCGAGCTCATTC  
GCAGAGTTCAGTCAGTCGATGCGATTCCAGAGACAGTTGATCCGTTATCTGTTTCTGCTCACGTAGTTGGCAAT  
ACATTGGGTATTGGAGGCGCCATTGGAGAAGCAACATGCGATTACTCACTAGAAGAGTATATGTTTTACCGAACT  
AATCGTTGCTTAATGTTACAATATTTATGTAATTTTTTCTAATAATATTTTAAATTTTCAAGAAAAAAGAAAA  
AAACATGTCGGCCGCTCGGCCTCTAGAGGGTGGGCATCGATACGGGATCCATCGAGCTCGAGCTGCAGATGATC  
GTAGATACTGAAAACCCCGCAGTCACTTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTCATTTATACAATCGT  
TTGGCCCTCCGTAT

#### Klon 10.1 pGADT7-3' (1149 bp)

CCCTTAAGCCGGGGGTGAGACCGAGCAACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCA  
CGTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCAGAGGAACGACCAG  
TATTCACACTGTCAAGTGTAGGAGTAGATCTTACTGGGAAATTACAGTCCGTATTATACGAGAATGTTCAAGCGA  
CAATCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAA  
CCACGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCAGAGGAACGAC  
CAGTATTCACACTGTCAATGTAGGACTTGTATCATACTGAGAAATCACCTTCATTAGTAGGCAAGAAGCTTCAGG  
CGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAA  
AAACCACATTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCAGAGGAAC  
AACCAGTATTCACACTGTCAATGTAGGACTTGTATCATACTGAGAAATCACCTTCATTAGTAGGCAAGAAGCTTC  
AGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTAC

CAAAAACCACGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGG  
 AACGACCAGTATTCCACACTGTCAGTGTAGGACTTGATCATACTGAGAAATCACCTTCATTAGTAGGCAAGAAGC  
 TTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGT  
 ACTACCAAAAACACATTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAG  
 AGACGACAGTATTTGCACTGTTGATGTAGCGTGATCATGTGATATGCCCTATTGTTCGATCAACAGTGTTCATCGA  
 ACATGCAATACTTCTTTTCATTTCGT

### Klon 14.10 pGADT7-5' (1247 bp)

CCTATGGGCGGGGGGAGCTACGAGTAGGTGAGGATGGCAAGGCACATTTCAAGGTACGATTCGATGCGCAAGGTT  
 TCGCTCCTCAGGACATCAATGTGACGTGAGTGTAGGAAACCGTGTGACGGTACACGCGAAGAAGGAGACGACGACCG  
 ATGGTAGGAAGTGTAGTCGGGAGTTCTGTGCGTATGGTGCAGCTGCCGAAGAGTATTGATGATAGTCAACTGAAAT  
 GTCGCATGACAGATGATGGTGTGTTTGTGTTGGAGGCTCCAGTGAAGGTTGATCAGAACCAGTTCGTTGACGCTGA  
 ACGAGTCTGGTCAGGTGGCTGTTCCGACCGAAATCGGACAATCAGATTAAGGCAGTTCCTGCATCACAAGCTCTTG  
 TTGCGAAAGGTGTTTCATGGTCTGTGCGTATGTGGATGATGGTTCAGGTGGGAAGCGACTGCATGTTGAAGTCCAG  
 TGGACCCAGTGTACAAACCTGAAGACTTGTGTTGTGAATGTTGACTCGAATCGTGTGTGTTAGTGGACGTCATC  
 ATAAGCAGAAGAGTGTCAACATGGAAGGTGAGCTCATTGCGAGAGTTCAGTTCAGTTCGATTCGATTCAGAGAG  
 CAGTTGATCCGTTATCTGTTTCTGCTCAGGTAGTTGGCAATACATTGGTATTGGAGGCGCCATTGGAGAAGCAAC  
 ATGCGATTACTCACTAGAAGAGTATATGTTTTACTGAACTAATCGTTGCTTAAATGTTACAATATTTATGTAATTT  
 TTCCTAATAAATATTTTTAAATTTACAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA  
 ACCATGTCGGCCGCTCTCGGCTCTCTAGAGGGTGGGGCATCGATACGGGATCCATCGAGCTCGAGCTGCAGATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGC  
 AAGTTCACTTCAACTGGGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTTTCAATTTATACATCGTTTTGCCTTCTTTTTATGT  
 AACTATACTTCTCTAAGTTTTCAATCTTGGGCCATGTACCTCTGATCTATAGATTTTTTAAATGACTAGAAATTAAT  
 GCCCATCTTTTTTTGGACTAATTTCTTCATGAAAAAATATACGGAGGGCTTATCAGAGCTTGACTTCTTCGCGA  
 GGTTGGTCAGGTCTCATCAGGGTTGTGCGGCTGCTACTGCCGAATTTACGAAAGAATGAAGTCAATCGTGTATCG  
 TGTGACTTCAATAGCGATTCTTAGATTAGGAATTTTTTATATTAATAA

## 5.2.2 Screening mit dem *bait*-Konstrukt TK4-bait2 pBridge

### Klon 2.15 pGADT7-5' (1230 bp)

GCTTAGGGGGGGGGGCTCACGACATTTTGTTCGTTCAAGTTCGATCATCAGGTAGTATGATTGAGAGGCGTTCCAT  
 TTTGCGTCTTACAGATGTTTCAAGTCTTGTGAACTAGCACACAGAGAATACCAAGCCGGAGATTATGAGCGGGC  
 TGAACAACATTGTATGCAATTATGGCACCAGGACCCAGAGAATACATCCACATTGCTACTGCTCAGTTCATATA  
 CTTCCAGTGTGCGCCGATGGAAAGATCAGCCTACTTCAGCCAGTTAGCTATCAAACAAAACCTTTAATGGCAGA  
 GCGTATTCCAACCTTGGCAATGTTTTCAAAGAGCGAGGGCAGTTGAAGGAAGCAATTGACAACACAGACACGC  
 ATTAAGAATAAAAACCGGATTTTATCGATGGATACATTAATTTGGCTGCTGCTTTAGTTGCTGCAGGCGATATGGA  
 GTCTGCAGTAAATGCTTATGCAACAGCACTGCAGTACAACCCAGATTTATATTGCGTTGCAAGTGTCTGGGAAA  
 CCTACTTAAAGCACTTGGACGATTGGATGAGGCGAAATCATGCTATCTGAAAAGCGATTGAGACCTGTCCAACATT  
 CGCAGTGGCTTGGAGCAACCTGGGATGTGTGTTCAATGCTCAAAAATGAGATATGGTTGGCAATCCATCACTTTGA  
 AAAGGCTGTTACTTTGGATCCTACCTTTCTGGATGCTTACGTCAACCTCGGAAACGTGCTGAAAAGAAGCTCGCAT  
 ATTCGACCGTGCAGTAGCAGCCTACCTTAGGGCTTTGACACTATCTCCAAATAACGCTGTTGTGCATGGGAATTT  
 AGCCTGTGTTTATTATGAGCAAAATCTTATCGATCTTGCATCGATACTTACAAGAGAGCAATTGAGTTGCAGTC  
 CAATTTCCCGATGCTTATTGTAACCTTGGCCCAATGCAGTCAAGGAAAGGAAAGGTTTATGAGCTGAGGAGTATT  
 AACACACAGCCTTGAGATTGTGCCCTACCCATGCAGATTTCTTGACACCTAGCAAACATCAAACGGTGAACAGGAA  
 AGCGGAGGAGCAATACGACTATACGTTTCGAGCACTTGAAATATATCTGATGCTGTACTCATCTAACCTCGCAGG  
 CATGCTCATAAGAATGCAGAGCTTGGCTCATTCCGAGCATTCCCAATCACCAATGCGATGCTACTCATATGGAA  
 CCCTTGAGAATTGCAAGAATGTTTCATGTGCG

### Klon 5.6 pGADT7-5' (1094 bp)

CCAATGGCGGCATCGTGAGACAGTCAACCAAAGTTTTAAAGCAGGTCATTATGTACTCAGCTTTGGAGTGACGTC  
 AATTACGTCTTTTCTTAGGACAAGCTCACTGCAAAATCACAGGTGCGATATTTTAGACTTCAATAACTGTTATGT  
 TTCTGTTTTGCATATTCATTTAATTATGTAGCCAATTTAAATTTTATCCTTCACTTCTCAGAGGTTTTATTTCTGG  
 GATTATATCCAAGTCGTTGATTTCTTTGGTTTTCTTACTTTGTTGTGATTTTTTCGACCAAAAAGTTATTTCAATAAT  
 TCATCTCTTGTGTGAACATTGTTGTCATGTTCTTACTATAGTATCGGTATACGTAAATTACTTTATCCGAGCAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGTCGGCCGCTCGGCCCTCAAAGGGTGGGCATCGATACGGGATCCAT  
 CGAGCTCGAGCTGCAAATGAATCGTAAATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACTTCAACTGTGCATCGTGCACCAT  
 CTCATTTCTTTTCAATTTATACATCGTTTTGCCTTCTTTTATGTAACATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTGGCCA  
 TGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTAAATGACTAGAAATTAATGCCCATCTTTTTTTTTGGACCTAAATTTCTTCA  
 TGAAAATATATTACGAGGGCTTATTTCAGAAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAG

GTTGTCGGCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACGTTGTT  
 GACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTATTAAATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTA  
 TACAAATTTTAAGTGACTCTAGGTTTTAAAACGAAAATTTCTTATTCTTGAGTAACTCTTTCTGTAGGTCAGGTG  
 CTTTTCTCAGGTATAGCATGAGTCGCTCTAATGACCACACCTCTACGGCCGGTCGAAATCCCTACCTATGAACATA  
 TTCCATTTTGTATTTCCGGTCTGTTCTATTATGAATTTCAATTTAT

**Klon 6.20 pGADT7-5' (1224 bp)**

CCAATGGGCGGTAGGATTCTTCGATGAAACTGTCTTCTCTGAATTTCTCTTTATTTTTATTGGGGTTCCCGTGGTC  
 TACTTACAACCTTAGTGATCCAATTTTCATGAAATATACCTCGGCTTGGATTCTTACACACCGCTTCTGATGATCC  
 AAGAAAAATTCCTGTTACTGATTATCGTTGTTATGAGTCGACACGATTGAGGACCATCCTCCGTACTCGATGATT  
 GTTATTATTTAAGCTAATAATCACTGATATATTACCAGATAGACTAGTATTAATCCACATGATCCTGACAACAA  
 TTGAGAAGGTGTAATTTCTTCAAATTTCCATGATATTTTACCCTTACTCCCTCATCTGAAATTTGGATATCACCC  
 TTTTCTAAATGGGACTGAACTTTTTGTGGACTTTTTAATCTACCTGGTTATGATCCATAAATTAAGAAATTT  
 GTGCTTTATCTCAAATTTATGGTTGTGGCTCTGACTGGACCTAAACTTTCTCCTACTAGTCTAAATACAATGTTT  
 CTTTTCTTCAATTGCTTTGTAATTTCTATATCATCTTTTACGAAATATACTCATTCCACTTTTTACCTTAGATGTG  
 ATGATGAACCTTGATTCTGCTGTTTTTCGCAACTGGTATATTGACTGGATTACTCCTATGATGTACCATCATTTGTA  
 TCGACATCAAATTCACCATCTCCATATTCTGATCATTATCATATTATGTAGGATTTATTTCATCAACTACACTTG  
 CCTCGTCATTATCAATCACCAAATATTATTCCCAACATTACTACTTTATACACGAAATGTAGATTTGAAATCACCG  
 AAATCACACATTATGAAAATCTGCAATTTCTGATCGAGATATTCTATGATCAACGACTTATCATAGACATCAT  
 CTGATCTTCTCTAGTCAGCGACATCTAAACCTAGATCTCCCTTACACCTTCCAGATGATTCAAAATATTCACCGGT  
 GAAAAGGCAACTACACGTTAAATGCCTAGCATTCTAACATAACAGCTAGTCATGACACGAGCTCCAAATCGTCCT  
 TCTGGAGGATTTTTCTAACAAACTGACTGACGGCAAACCTGTCATCGCTACGCCTAACGCTCAAGTAGTAATGC  
 AGATAATGAATGCAGAACGACTGTGCAAACAGAAATTCAACTAGTCGAAATCGCGCGGACTAGACAAGGCATACG  
 CAAATTTTCTATGTGGGAGACAAA

**Klon 20.3 pGADT7-5' (1217 bp)**

CCCGTGGCGGGGGAGGAGGACGTGTGTATACTCGTGTTCCTGATGGTTCGTCATGCTTTTTTCCACTCGTATCCAGT  
 TATCAAGTGTGGATCATCCATTCAGATTGCCATTCTTATCAAACCTTCGGATCAGCTGATGGAGATATGCAAAAT  
 TTGTTTTTAATAGAGCTATGTTTGACCAGTTTATCACTGTGTTAATGAATGAGTTACATGTGGGTCCGCCACCCG  
 CCCCAGAATCAGCCATTGCAGACTTACCTACAATTAGTTTACTGAAAGAACAAGCATTAAGTTGGGTATTTGTT  
 CAATATGCTTTGATGATTTCAAAGAATCCGGATCAGTTATCAGACTACCATGTGCTCACACCTACCATCAAACCT  
 GTGTTACAACATGGTTAAAACAGCACGGAACCTGTCCAGTTTGTGCGAAAGGATTTATCCGGACATGATACTTCAC  
 GATATGAGGATCCAGCTCAAACCTAACAGGAAATAGTAATGGTTCAAGCTCTTCCACTTCTTAGTCTTCATTAT  
 TCTTTTCAATTTTCTAAATAAATAAACCCTGTAATTTATATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA  
 TCAGAAACAAGCCAGCTATACAT  
 TATAGTTTTCATATTTTCTTTTTTCTGTCTCCCATTGTGTAGCATATTTTTTCTTGTGTATGATGATGA  
 ACCCAACCAGCCCTGTGTTATTTTTGTGTTTTGATAATTTTTTCCCTGTTTTCTTCCAAAATCAAACCTTTTCTATTAAG  
 ATTTATTTTTTACCAAGATTGTTGCATTATCTTACCCAATTAATTTTACACTGACTATTAATGCATCCATCTTTG  
 TTTTTTCACTATTATTATTGTTCTTTTATTACTAGCTTCGTGATATGACTACTACTTGTCTTCTAAGCCCCAC  
 TCCACCTTTTGGCAGAAAAAAGTAATACTCAGAAGGAGGGTTTTTTCATATTTCTCTACTGTATGTAGTAATGTC  
 ACTTAATATCAATCAATAAATAAATGACGACACAAATAAACAACCTGTGCGCCCTCGGCCCTAAGGTGGCAT  
 CGAACGGGATCAATCGAGCTCGAGCTGCAATGATCGTAATCTGGAAACCTCGCAGTCACTTACGTGGCATCGTG  
 GACCCATCTCTCAGTCT

**Klon 22.10 pGADT7-5' (166 bp)**

AAGGGGGCATAAAAAATGTAATAATGGCAGGGTAGCGTTGCTCTTTAAGTCGCTAGGAACCCCTGCGGCGCGTAT  
 CTTAAAGGAAACCACGAACCTGTTCCAACGCCATTCGGTCTTTCTGGGACTCAAATTTTTTAGGCCCCGGTCTCCT  
 GGGCAAACATGAAAAA

**Klon 23.3 pGADT7-5' (1141 bp)**

CCATGGGCTGGGGTATCATTTCGCATTAATGCACCAAATGGATCGTCAAATCCAGGATATCCGAGAGAGAATGGGG  
 TCATTGGATGTGCCGTCTACCGGTTTCAGTGAACGACTTTCTGAAGGACGCCTACGAAGTAGGTGAGGATGGCAAG  
 GTACATTTTCAAGGTACGATTCGATGCACAAGGTTTTCGCTCCTCAGGACATCAATGTGACGTCGAATGAGAACCGC  
 GTGACGGTACACGCGAAGAAGGAGACGACGACCGATGGTAGGAAGTGTAGTCGGGAGTTCTGTGCTATGGTGACAG  
 CTGCCGAAGAGTATTGATGATAGTCAACTGAAATGTGCGATGACAGATGATGGTGTGTTGATGTTGGAGGCTCCA  
 GTGAAGGTTGATCAGAACCAGTCGTTGACGCTGAACGAGTCTGGTCAGGTGGCTGTTTCGACCGAAAATCGGACAA  
 CAGATTAGGGCAGTTCTTGCATCACAAGCTCTTGTGCGAAAGGTGTTTCATGGTCTGTGCTATGTGGATGATGGT  
 TCAGGTGGGAAGCAGTGCATGTTGAAGTTCAGTGGACCCAGTGTACAAGCCTGAAGACTTGTGTGTGAATGTT  
 GATTCAATCGTGTGTTGTTAGTGGATGTCTAAGCAGAAGTGTATCAACATGGAAGGTCGAGCTCATTTC  
 GCAGAGTTCAGTCACTGATGCGATTCCAGAGACATGATCCGTTATCTGTTTCTGCCAGGTAGTTGGCAAT  
 ACATTGGTATTGGAGGCGCCATTGGAGAAGCAACATGCGATTACTCACTAGAAGAGTATATGTTTTACTGAACATA  
 ATCGTTGCTTAATGTTACAATATTTATGTAATTTTTTCTAATAAATAATTTTTTAAATTTCCCAAAAAGAAAAA

AAAAAAAAATATGTTCGGCCGCTCGGCTTCTAGAGGGTGGGCATCGAATACGGGATCCATCGAGCTCGAGCTGCA  
 GATGAATCGTAAATACTGAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTCATTA  
 TACATCGTTTTGCTTCTTTATGTAACATACTCTCTAGTTCATCTGCATGTACCTCTGATCTTATAGGATTTTTAA  
 TGAACTAGAATATATG

**Klon 24.18 pGADT7-5' (1197 bp)**

ACCATAAGGGGCGATCTGAGGCACCAGTTGAGTTGTGGATCATTCTAATTTGTTTGTGTCACACTCTCCACTGTC  
 CTATTTTTCTACACACCTCTCAATTCACACTCACTGTAATATAGTCGTGTTTGAATTCGAGATGAATAAAACCTAT  
 TCATTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATGTTCGGCCGCTCGGCCTCTAGAGGGTGGGCATCGAT  
 ACGGGATCCATCGAGCTCGAGCTGCAAAATGAATCGTAAATACTGAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCA  
 TCGTGCACCATCTCAATTTCTTTTCAATTTATACATCGTTTTGCCTTCTTTTATGTAACATACTCTCTAAGTTTC  
 AATCTTGGCCATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTAAATGACTAGAATTAATGCCCATCTTTTTTTGGACC  
 TAAATCTTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTTATTCAAAAGCTTTGGACTTCTTCGCCAAAAGTTTGGTCAAGT  
 CTCCAATCAAGGTTGTTCGGCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGTCAAAATCGTTGGTA  
 GATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTATTAATAAGTTATAAAAA  
 AAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTAAGGTTTTAAACGAAAATTTCTTATTCTTGAGTAACTCTTTCC  
 TGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCCGGTTCGAAAT  
 TCCCCTACCCTATGAACATATTCCATTTTGTAAATTTCTGTGCTGTTTCTATTATGAATTTCAATTTATAAAGTTTAT  
 GTACAAATATCATAAAAAAGAGAATCTTTTTAAGCAAGGATTTTCTTACTTCTTCGGCGACAGCATCCACCGAC  
 TTCGGTGGTACTGTTGAACCACCTAAATCACCAGTCTGTATACCTGCATCCAAACCTTTTAACTGCATCTCAAT  
 GCCTACTCTCAGCAGTCATGACATTTCAACATCATGCAGCAGACAGAAATGCGATGGGTGACTATCTGCATCTGG  
 ACGATCTGGCATGTCGTACAACAAATGCGGTGTTCTTTGTCTGCAAAGAAGCTAGGATCGCTGAATGGCTAT

**Klon 29.3 pGADT7-5' (1217 bp)**

CCCAATGGGCGGTAGAATGTATTATTGGGTGGTGGATTATTTATATTAAGCTTGTATTGTGTCAGTTTCGTTTA  
 TTTAAATATATAATTATAGTTGAGAGATTTAAAGTTATCGTGTTATTAGTAAGTTTATTAGATAGAATTAATGGT  
 TGTCGTATGATATTTGTTACGATAATGAGGCTTTTTGTGATAGAAATATCATTAATGTTAATAATTTAGGTTGA  
 GAGATAAAGGAGGGATGTTTTCGGGTTTCTATTGGTTTATAAAGGGTTAATTTACAGGTTACTGTTAGGATTGA  
 TTGTGTGGTGTTCATCAGTATTGTATAGGACTATCCTATTCAAGGATAAAAAATTTGTTTAAATAAATGGTTTATTTA  
 TACGTGATTTGCTGAGGTTTTTAAATGGTATTGTAGTTGTACTATAGTTTGTAGCTTTTGTAGTGTAGGTTTAT  
 CAAGTATGGTGTATATACTTAAGAATGATTAGAGCTATAATAGTATCAGTTGTAATAAAGCTCTGTTGTTTGTAT  
 TTTTTTATGAACTTTCAATTATTAGTGCTTTGTATTTATTAGTTAAGAAAAGATTATATCCTGAGCGTTATGTCG  
 CTAGATGATATATGATTGGATATGTGTTGTTAAGGGGTGTTCCGTTATTGATTTGTATTCTTTTTAGTTAGCTTAA  
 GTGAGGGGGGGTTTTAAATATTATGTTGAGGTAATGATAATAACGAGTTAAGATTACTTTATTTTATAATGGTTA  
 TAATGTTTTGTACAAAGATTCCGTTAGTTCCTTTTACAGATGGCTGCCCATAGTTCATGCTGAAGCTAGTAGAC  
 CAGTCAGAGTGGTATTAAGAGGATATATAATGAAGTTAGGTATAGTAGGTGACTTCGGGTATGTAGTAGACGGT  
 TAGTTAACAATTATGTATCTAGTGTAGTTGCAGTAATTTTTTATGGTTAGTCTAGTATTTATGTGTTGAGCTTAT  
 GCTGAAGTTGATTCTAAGCGTTGATTGGCTGTTTTGAGTTTGTACATATAGTGGTGAAGGTTGTAATATGATTC  
 TTGGTGAGATACAACGGATTTATTACCTTGTATGCATCTTTACGGTATTGGGGGTACGTAACCGAATGTTTTA  
 CACTAAAATGAAGCAGATCGTGCCTGCAACTTGACTCACAGATGGATCAGTTTTCTCTCTTGTATTTTGTATCCAG  
 ATAATTTCTCAGCGCGA

**Klon 37.25 pGADT7-5' (1238 bp)**

ACAATGGCGGGGAGTGCAGTCTACTGTTTCACTGAACAACATTTCTAGAAGGACTGCTCTTAAAGAGGTTATGATG  
 TTTATCCGGATTTTCGGGAACGATCCATCGCTATCGGTGGCCCTGCTCTTTACTTCAATGTGACAACAAGTGAAC  
 GGCCTGTGTTCTTACACCCTAATCCGGATAAAAACCACCTGGAGGGGGATCTGCAGACCGAAGTTCGTGCTAGGA  
 TGCATGAGCAGCTGATAATTGATGAAACTAAACTGGTATGTGCGAGGGCTCAAGATATTGTTTTGATGTTCTGGC  
 GAAATCATGGGTAAATCCAATCCAAACCCTGAAGCTCAAAAAGCCAGGCTGACGGCTGCTCACCCGCAATCGGA  
 CAATCCAAAAGCAGAAAGACCTGCATAACAAGGTCAAGAAGGTCAAAGAGAACCAAGCCCTGTGCTATCCTTCAAA  
 AGGATCAGGTGCCAAGATTACTGAAAAGGCTGCTCCAGTGTAGCCGAGAACGTTAATAAATATGTGACATGCT  
 TAGTTTGCACAAAAATTTTTCTTTGCGTGAACGTCATCAAAAACAAAAAAGTATTGTGCGCCGCTCGGCCCT  
 CATTCCGGTGAATCCGTCACCTCAACGCTATTCTCAAACTGTTGATCAGTCATATATTTCCGCACACCCCGCTG  
 GTTCACTTCTGCTGTGCATCGTGCACCATCTAGATTCCTTTTGTCTAATACTCCGTATAGCATCTATGATGTACT  
 GAACTCCTCTTGCTTAATGCTTGGTATTGTATGTAACATGATCTATAGAATTTATTTTTGATTTTCAATTAATGCC  
 CATCTTTTTTTTTGGACCTAAATCTTTTCTGACGATATATTCTCAGGGCTTATTCCATCGCTTTGGACTTCTAT  
 CGACGCGAGGATCTGGTCATGTCTCGAATCATGGTTATCAGCTCGTCTATTTTAGCTTCGACTGTTACATAGAGC  
 ATCGAACAAGGGTTTTCAATCGTTGATAGATCGGTTGGTTCGACCTTTCAAGATAAGCGAACTCTTCTATGATTCAT  
 GCTGTAATGTAACCTCGAATAAAGAAATATGGAATGACATATAAGGGCTCTATGTTTAGACGAAATCTTATGCAT  
 GAATACTCTAGCGGTAGTCAAGATGCTTTGCTACTGTCTAAGGCAGAGGTCGTTAATGACCCTATGTACGCGGT  
 GCAATCGCTACAATGACAATTCAGTATAGAGAGTCTG

**Klon 40.4 pGADT7-5' (1164 bp)**

CCAAGGCAGGGGGAGAGATGCGACGTTTTGAGACGTGGAATGTTTTGCACTATTACCATTGGATACTTTCACCCACG  
 GGATTCTGGAAAATCCATTTCGCTTTAATGCACCAAATGGATCGTCATATCCAGGATATCCGAGAGAGAATGGGCT  
 CAATGGATGTGCCGTGCACCGGTTTCAGTGAGTGACTTTTTGAAGGACGCTACGAAGTAGGTGAGGATGGCAAGG  
 TACATTTCAAAGTACGATTTCGATGCACAAGGTTTTCGCTCCTCAGGACATCAATGTGACGTCGAGTGAGAACCCTG  
 TGACGGTACACGCGAAGAAGGAGACGACGACCGATGGTGGGAAGTGTAGTCGGGAGTTCTGTGCTATGGTGCAGC  
 TGCCGAAGAGTATTGATGATAGTCAACTGAAATGTGCGATGACAGATGATGGTGTTTTGTGATGTTGGAGGCTCCAG  
 TGAAGGTTGATCAGAACCAGTCGTTGACGCTGAACGAGTCTGGTCAGGTGGCTGTTTCGACCGAAAATCGGACAATC  
 AGATCAAGGCAGTTCCTGCATCACAAGCTCTTGTGCGAAAGGTGTTTCATGGTCTGTGCTATGTGGATGATGGTT  
 CAGGTGGGAAGCGACTGCATGTTGAAGTTCAGTGGACCCAGTGTACAAGCCTGAAGACTTGTGTGTGAATGTCCG  
 ATTCGAATCGTGTGTGGTTAGTGGACGTGATCATAAGCAGAAGAGTGGTCAATATGGAAGACTCAAGTTCATTTG  
 CAGATTCAGTCAGTCGATGCGATTCCAGAGACAGTTGATCCGTTATCTGTTTCTGCTCAGTGGTTCGGCAATA  
 CATTGGTATTGGAGGCGCCATTGGAGAAGCAACATGCAATTATCCACTAGAAGAGAATATGTTTTACTGCACTAA  
 TCGTTGCTTAATGTTACATATTGATGATTTTTTTCGATAAATATTTTTAAATTCGATTCAAAAAAAATAAAAAAAA  
 CATGTCGTCGTTTCGGCTTCTAGAGGTGGCATCGATACGGGATCCATCGAGCTCGAGCTGCAATGATCGTAAATTC  
 TGAAACCCCGCAGTCCCTCCACTGTGCATCTGCACCACCAATCCTCATTAACATCGTTTTGCTTCTTTTATGTAA  
 CATATCCCCAAGTCCACCTGGGCAAGTGTACCACCGACC

**Klon 42.1 pGADT7-5' (1210 bp)**

CCAATGGCCGGGCTCAAACGATTTGCGTGCGTCCCAGGTGGTTTTGGTTTTGCTTATTTATCTCCTTAAAAATCTA  
 CCTGTTGGATATCATCTAAATACTATCTATGGGCGAAATTTACAAGCGCACGTGGAGGCGTTGGGATGGGGATTG  
 TAGGCTTAGCCGTGCCTGTATATGTTTCAGGCTTACCCGCTCATCCAGCAAACGACCTTGGATACACCATGGGA  
 TATTATCTGCTTACAATCATGCTTCTATGCTCTTGCCTTATCACTTTACAAAGAAGTGTGGATGCTTGCCACACC  
 TTGACCCATATTGGCTATCGATATTTTCGTCATACTCCTGACACAGAAGATGAGGCTAAAGCGGATGCAGCTGAA  
 CATATGTATCCTGATGGACCGGATGATAATGGTAATATGTTTGAACGACCTTACCGATTAAGTATATACTTCCC  
 TCTCCTTATCCGAATATGGAAGTTGCGCGAGCGGCTGATAACGGTGCAAAACCCCGGATCTGTGCATATATTGTG  
 AACCCCTTGGAGGCAATGAGGATTATATATTCCATCTCCTTACAGGGTATATGAATCCTCTCCAGGCCGTACC  
 ATGTCAGAGGGACTCTATTATAATCCTTATTTCCCTGGTGGTGAATAGGTATGGCAAGAGTATTTGTATGACGAT  
 TTAATTTGTTTATGCTGATGGCACACCTGCCACAACACTAGTCGAATAGCATAAGATGTAATAACATTTCTTTCTTGC  
 ACTTCTGATCGAAGCCATGACGAACGATGCGTATTCTATTTAAGGCATTACTAATTACGAGCACATTTATTAGTT  
 ATAGGGGCGATATAACCATCGAAACATTGATCCCATAAAAAACTAAGACGCTTAGTTACTACAACCGATGAGTGC  
 CGAAGATGTCTAGAAAGTATCTCATATGCCGTCAATTATAGCGATATCAAGATCTCTCTCCATTGCTGCATGTATC  
 CTCACTACGACTGTCTGAACTTCATCTGTCCACCCTACAATGTAGCGAAGGTCTAACTTTAACCGACGATGACTG  
 ATATATAGTTACTACTGTACCCTGATGAGCGTAATTATCTCACTACGCTGAATCGACTAGACTCTCAGGTAGAGAG  
 CACTCTGCTGAGTGTACGATGAAAAAAGGTCTTTTGACAGTAGCCTATTTCCAGACTAGATGCTAAGCATCGAACT  
 GTCTCCCTGC

**Klon 44.2 pGADT7-5' (768 bp)**

CCTACTACTAGTACGACTTCTACTACTAGTACTCCCATGAATCTTTTCATCTTCGGATCAGGATTGGAAATCAGTT  
 CAAGACATGGAAGAGGAATTAATTAACAATTTGTACAATTATTAATAAATTGGATCAATTCAATGAAAACAAAT  
 CAAAATATATCAATCATAGATAAAGATAAATTAGATCATATTTCTTATGAATCGTATTACACAATTAGAAAGTCAA  
 TTATGTGAAATTACATTACAATATCAATTAGAACATAAACGTCGATTAATAATCAGAAACAAAAGATGACTCTAAA  
 CTTATGGCTCATAGTAGTCAAGCAAGCAATTCAGATGATCCTGATCAATTATCTAATAGTAGTAATGAAAATCTG  
 ATGAAATTTCTGATGCACATAAAGTAATAATGAACGTTTACATACAGCTATTGAAGAATCAATTTATTATGCTTCA  
 AGAGCTAATTTCTTACAAGATGACTCGAATCCCTTATCCCATGGATTATACATTATTATATTTCTATCAAAACAAC  
 ATCTAATATCATATATAACAATCTATGACATTAACACATTAGATTATGAAGCCATACATTAACAATATGAATG  
 GCTAACATATATCATTTACTAATGATACAACACTTCAATTACATTCATATCAACATCTATCATTTAATGATGAC  
 ATCCACGATGGGATCTTTACGATGATATCAGTAAAAATACTTATTTATTATTTGAGAGGATCTGCAATATATTTT  
 TTTTTTTTTCCCCGTCT

**Klon 46.8 pGADT7-5' (1226 bp)**

AAATGCAGGGGGTGTGGTGTGAGTGCAGTTAATAAATTTATAGTTTTGGTGGATAACGTACCTTTTGTATCATGATTC  
 ATTGAGGTATTATAGGTTATTCTATTTCCCAGAAAGGTTCTCGATTTTATATAGTTTCAATCTGTTAATTATAGTTA  
 GTTGGTGTGAGGTTGGATAAGTTACTAAGTAAGTATAAATTAGAGAACTATGTAGGTAGTGATACGTCGCGCTCC  
 ATGAATAAAGATGTGAGTATGTGGTAAAAACAATGTTTACAATGTCAACGATCAAAAAGTGCACAGGCACGTAGCT  
 GCCCCTATTGGCACTTTTCGCTACACCTGATGCTCGCTTCGATCACGTTACATAGACATTTGTAGGACCATTACCA  
 CCATCGCACGGGTATGATCACATACTCACATGCATTGATCGTTTTCTCAAGATGGCCGAAGCTATTCCCATCAGC  
 TCTATTACGGCGGAGACAGTCGCCCCACCGCTTCGTAGAACGATGGATAGCTATGTACGGTTGTCCCACGACTGAC  
 CGAGGACAACAATTTGAGTCTCTATTATTCTCCTCACTAACACGGCTGCTTGGTACGGAACGCATACGCACTACC  
 ACCTACCATCCAGCATCAAACGGTTTTAGTTGAACGGTTTCATCGCCAACCTAAAAGTGCTCTTCGAACACACGAA  
 AACACAATTTGGTCCGAAACCTACCCTCGTCTCCTGGGAATCAGAACGAGTCTAAAGGCAGATATTCATGT  
 TCCGCCGCTGAACTTGTTTACGGCACGACATTGCGTCTGCCTGGGGAATTTTTTACACCACGGAGCAGCACTAAG

TTCGGCGAATCAGACTACGTCCAACGACTGTCTGCATTCATGCGAACACTGACTCCGGTGTCAACTCGTATACAA  
 CATCGACAGGTGCGTCTCCCTCGAGAGTTATCTACTCGTTCACATGTTTTTCATACGAGTAGATTCGGTACGCAAC  
 CTCTACACAGCCTTACGAGGGACCTTTTTACGTGATTTCCCGTCACGAAAAGACCTTCAAGGTGGATCGACGTGC  
 GCATCGAAACAGTCAGCATTGAATCGTCTCAGCCAGCACACGTGATGACTGCTTATACCTGAAAAGCGAACTAG  
 GCTGACCATCAAAGCTCTCTAACGGATCCTCATCTACTTCGATACACGCCTAAATGACCTGGGAACCTCTATTCT  
 CTATGTTCCGATCTACACACAGACAC

### 5.3 cDNA- und Aminosäuresequenzen von Sm $\beta$ -Int1

In den nachfolgenden cDNA- und Aminosäuresequenzen von Sm $\beta$ -Int1 (2.598 bp, 865 AS) sind Start- und Stopcodons durch Fettschreibung markiert. Die konservierten Domänen sind farbig hinterlegt: INB-Domäne (grün), EGF-Domäne (gelb) und Transmembran-Bereich (hellblau).

```

1  M G L V R P I R M I L C F V C F L F L V
1  ATGGGACTTGTTTCGTCCTATTTCGTATGATTCTTTGTTTTGTTTCTTGTCTTCGTCG
21  N S Q N A Q K E P S C G R A K S C S E C
61  AACTCTCAAAAATGCACAGAAAGAACCCAGTTGCGGCCGTGCAAAAAGTTGTAGTGAATGC
41  M G I R P A C S W C S A D E F D D T K E
121 ATGGGGATACGCCCTGCCTGTTTCGTGGTGTAGTGCTGATGAATTTGATGATACGAAAGAA
61  G P G F R C A P S S V L L A R G C P Q S
181 GGTCCAGGGTTTTCGTTGTGCTCCATCTTCAGTCTTATTGGCCCGTGGATGTCCACAAAAGT
81  S I E D V E S V L L D H G V P L D Q A S
241 AGTATCGAGGATGTGGAGTCTGTGTTATTAGATCATGGAGTTCTCTTGATCAAGCCAGT
101 L T E D I Q L T P R S Q S V K V R P G G
301 TTAACGAAGATATAACAACTTACTCCACGATCACAATCAGTAAAGGTCAGACCCGGAGGG
121 T M M V N F T F Q S I S D Y P V D L Y F
361 ACTATGATGGTCAATTTCACATTCCAGTCTATTTCGGATTACCCCGTTGACCTTTATTTTC
141 L T D L S Y T M I D D L E T V S R L T N
421 TTAACAGATCTCAGTTATACAATGATTGATGATTTGGAAACAGTTTCTCGTTTGACTAAC
161 D I V L T M R N V T K K L Q M G F G A F
481 GATATTGTATTAACTATGCGTAATGTAACAAAAAAGTTACAAATGGGATTCGGTGCCTTT
181 V D K P V F P F V V P T P E Y L R N P C
541 GTAGACAAACCAGTTTTTCCCTTTGTTGTGCCAACTCCAGAAATATCTTCGAAATCCATGT
201 L N V G T K N L H C D P P F L Y K H I L
601 TTAAATGTTGGTACTAAAAATCTCCATTGCGATCCTCCATTCTTGACAAAACACATTTTG
221 S L T D N F E E F R E K T K V A R P S G
661 TCACTTACCGATAATTTTTGAGGAGTTCAGAGAAAAAACCAAAGTAGCACGTCCTTCAGGT
241 N L D S P E G G M D A L L Q V A R C S E
721 AATCTAGATAGTCCAGAGGGTGGTATGGACGCATTACTTCAGGTTGCCCGATGCAGTGAA

```

261 A I G W R A G A R K I V L F A S D G G F  
781 GCTATTGGATGGCGTGCTGGTGGCCGTA AAAATCGTACTATTTGCTTCTGACGGTGGATT C

281 H L A G D G R I A G L I L P P P T T C Q  
841 CATTTGGCTGGTGATGGTTCGAATCGCTGGATTAATACTGCCTCCTCCA ACTACTTGTCAA

301 L T Y Q A D R F N S S L K Y L G W H N S  
901 TTAACATATCAAGCTGATCGATTCAATTCTTCACTTAAGTACCTCGGCTGGCATAATTCT

321 D Q T D Y P S V G E I A Q V L T E A D I  
961 GATCAA ACTGATTATCCTAGCGTTGGGGAGATTGCTCAAGTTCTAACTGAAGCTGACATC

341 S V I F A V D S K L H G L Y T K L A E F  
1021 AGCGTAATTTTTGCAGTTGATAGTAAATTACACGGTTTGTATACTAAGTTGGCTGAATTC

361 L P S A A V G I L T D S S T N I V R L L  
1081 TTGCCAAGTGCAGCTGTTGGCATCCTAACTGATAGTTCAACCAACATTGTTTCGCTTATTA

381 R D N Y D K I V N K A E L M A T Y D A D  
1141 CGTGATAACTATGATAAAAATTGTTAACAAAGCTGAGCTAATGGCTACTTATGATGCAGAT

401 Y L E V Q V F S K C N D E N E F S K K T  
1201 TATCTCGAAGTTCAAGTATTTTTCCAAGTGAATGATGAAAATGAATTCTCAAAGAAAACA

421 V C N D H P V G G K I G Y Q I S I K A K  
1261 GTATGTAATGATCATCCAGTTGGTGGTAAAATAGGTTATCAAATATCTATCAAAGCTAAA

441 R C F E G V K K V T L K M V A L E D Q A  
1321 CGATGTTTTGAAGGTGTTAAAAAGTCACTTTAAAAATGGTAGCATTAGAAGATCAAGCT

461 V L G V Q T A C S C P S C E K M P M P S  
1381 GTACTAGGTGTTTCAGACAGCTTGTCTTGTCTTAGCTGCGAGAAAATGCCAATGCCTAGT

481 S L T P F S A R C Q L R G H L H C G E C  
1441 TCTTTAACTCCTTTCTCTGCAAGATGTCAATTACGTGGACATTTACATTGTGGTGAATGT

501 K C Q S G Y S G D F C E C S S E A S A E  
1501 AAATGTCAGTCTGGATACTCTGGTGATTTTTTGTGAATGTTCTCTGAGGCTAGTGCTGAA

521 G D A A M L A Q C T E Y G V K E P C S G  
1561 GGGGATGCTGCTATGCTAGCGCAATGTACTGAATATGGAGTTAAAGAGCCTTGTTCAGGT

541 R G R C V C G K C K C N L A R Y E G T F  
1621 CGTGGTCGTTGTGTATGTGGAAAGTGTAATGTAATCTAGCACGTTATGAAGGCACTTTT

561 C E C D R H G C K R A S D D N Q V C G G  
1681 TGTGAATGTGACCGACATGGATGTAAACGTGCTTCAGATGATAATCAAGTTTGTGGAGGA

581 P Q R G T C Q C N G T C E C K P G Y T G  
1741 CCACAACGTGGA ACTTGTCAATGTAATGGTACCTGTGAATGCAAGCCAGGTTATACTGGA

601 D R C D C M E S E K Q C I D P N N P S G  
1801 GATCGCTGTGATTGTATGGAAAGCGAGAAACAATGTATTGATCCAAACAATCCATCGGGC

621 P K C S G R G V C D C G Q C F C N S G Y  
1861 CCTAAGTGTCTGGTTCGTTGGTGTGTGACTGTGGTCAATGCTTCTGTAAACAGTGGTTAT

641 T G H L C N E I Q G G E S A L C T D R D  
1921 ACTGGTCATTTATGTAATGAAATTC AAGGTGGTGAATCTGCTTTATGCACAGATCGTGAT

661 V E K C V L C L R D S L V K S F D L D E  
1981 GTAGAAAAGTGTGTTCTATGCTTACGTGATTCAATTGGTAAAAGTTTTGATCTGGATGAA

```

681   K L K N D E M T K T D S E S E D E S L K
2041  AAGTTGAAAAATGATGAGATGACGAAAACAGACAGTGAATCAGAGGATGAATCATTAAAA

701   F N Q R Q P I S M I Y S S K E Y A L A A
2101  TTCAATCAAAGACAACCTATTTCAATGATTTATTCATCAAAAAGAGTATGCATTAGCTGCT

721   T Q C E S S C N G T V V D T S R V K L V
2161  ACACAATGCGAATCTTCATGTAATGGAAC TGGTGTAGATACTAGTCGAGTAAAACTAGTT

741   E A S E Q K D D S N L C I I Y T E D N C
2221  GAAGCTAGTGAACAAAAAGATGACTCAAATCTTTGCATTATTTACACAGAAGATAATTGT

761   R V F F T Y R Y S D A I Y V N R K V D L
2281  CGAGTATTTTTTACCTATCGTTATTCTGATGCAATATATGTTAATCGTAAAGTTGATTTA

781   N I I R K S E C T K T I N I L Y I V L G
2341  AATATTATCCGAAAAAGTGAATGTACAAAAACAATCAATATTCTTTACATTGTTCTCGGT

801   V I A A I V L G G L I L L L I Y K L V I
2401  GTCATTGCAGCCATTGTACTTGGTGGATTAATACTTTTATTAATTTATAAACTAGTCATT

821   T I D D R R E L A N F K Q Q G E N M R W
2461  ACAATTGATGATCGTCGTGAATTAGCCAATTTTAAACAACAAGGTGAAAATATGCGTTGG

841   E M A E N P I F E S P T T N V L N P T F
2521  GAAATGGCTGAAAATCCTATTTTTGAATCACCAACAATAATGTTCTAAATCCAAC TTTT

861   E E N G Y -
2581  GAAGAAAACGGATATTGA

```

## 5.4 cDNA- und Aminosäuresequenzen von Sm $\alpha$ -Int1

In den nachfolgenden cDNA- und Aminosäuresequenzen von Sm $\alpha$ -Int1 (3.657 bp, 1.219 AS) sind Start- und Stopcodons durch Fettschreibung markiert. Die konservierten Domänen sind farbig hinterlegt:  $\alpha$ -Integrin-Domänen (rosa) und Transmembran-Bereich (hellblau).

```

1   M A A Q F F K A F I G D L A S I D S W I
1   ATGGGCTGCTCAGTTCTTCAAGGCTTTTCATCGGTGATCTAGCTTCGATCGACTCGTGGATT

21  Q L L S H W L G G T V A A A N N A V D G
61  CAACTGCTATCTCATTGGTTAGGTGGGACTGTGGCAGCTGCGAACAACGCTGTTGATGGA

41  I Q L G C D F R Y L L N S D L M N E I P
121 ATACAACCTGGTTGTGATTTTTCGTTATTTATTGAATTCTGACTTAATGAACGAAATTCCT

61  N D L T V N S V N Q Y K S S V K S K S S
181 AATGATTTAACAGTTAATTCGGTTAATCAATACAAATCATCAGTTAAATCGAAAAGTTTCG

81  L G I G N C A L Y T G T S M Q Y V S V D
241 CTTGGGATCGGAAATTGTGCTTTATATACAGGAACATCTATGCAATATGTTTCTGTAGAT

101 P C N S Q E E G A C L A G F S A D V Q A
301 CCTTGTAATAGTCAAGAAGAAGGTGCATGTCTTGCTGGATTCAAGTGCAGATGTACAAGCA

```

121 G N Q S G E A L V A L G M P G S Y L T E  
361 GGTAACCAATCCGGTGAAGCATTAGTTGCTTTAGGAATGCCTGGAAGTTATTTAACTGAG

141 G N I F L G R Y R G R E L I N A I R L K  
421 GGAAATATCTTTCTAGGCCGTTATCGTGGTCGTGAATTAATCAATGCAATCCGATTGAAA

161 S S S H D L K H K G F G L G Y A I A L A  
481 AGTTCATCACATGATTTGAAGCATAAGGGTTTCGGTTTAGGATATGCTATTGCTTTAGCC

181 K L N N N D N K L G E Q H K H L Q S D D  
541 AAATTAATAATAATGATAATAAACTGGGTGAACAACATAAACATTTACAATCAGATGAT

201 R Q H F Q S N I N V I T S S P M W I D N  
601 CGACAGCATTTTCAGTCAAACATCAACGTCATTACATCAAGTCCAATGTGGATTGATAAT

221 D Y R G I I M I L N Q A M D L G G I E N  
661 GACTATCGTGAATTATTATGATATTGAATCAAGCTATGGATTTAGCGGAATTGAAAAC

241 L T E M Y G E V V I R N T N R T N K V K  
721 TTGACTGAAATGTATGGTGAAGTTGTTATTAGGAATACAAATCGAACAAAATAAAGTAAAA

261 H Q G R E L F L A V A D L D G N G L V D  
781 CATCAAGGAAGGGAAGTGTTCCTGCTGTTGCAGATCTTGATGGAATGGTCTAGTTGAT

281 I I V G A P Y F T R R Q N Q E G L Q D T  
841 ATTATTGTTGGTGCACCATATTTTACTCGACGCCAGAATCAAGAAGGATTACAAGATACA

301 I N S K Q F N H N E G S Q W S N L L P D  
901 ATAAATTCGAAACAATTTAATCATAATGAAGGTAGTCAATGGTCAAATCTTTTACCGGAT

321 I G R V Y I F Y G N H L N L S N L L S D  
961 ATTGGAAGAGTTTATATCTTTTACGGAAATCATTTAAATTTATCTAATTTACTTAGTGAC

341 S K Q R P E I P D Y F T Q D P V I L Q G  
1021 TCTAAGCAAAGACCAGAAATACCAGATTATTTCACTCAAGATCCAGTGATTTTACAAGGA

361 P K S P K G R F G H A L T N I G D I D G  
1081 CCAAATCCCCTAAAGGTCGATTTGGTCATGCCCTAACAAACATTGGTGATATCGATGGT

381 D G T E D L A V S C P Y C T D P D G R T  
1141 GATGGAACCGAAGATTTAGCTGTGAGTTGTCCTTATTGTACTGATCCTGATGGACGAACA

401 H K G A V F I Y L G K K D S I L D T E P  
1201 CATAAGGGAGCTGTTTTTCATTTATTTAGGCAAGAAAGACTCCATACTGGATACAGAACCT

421 F Q T I W P S D L P K Q S P V T I C G S  
1261 TTTCACTATATGGCCATCTGATTTACCTAAACAATCTCCTGTAACAATATGTGGCAGT

441 T D F T N D Y A S D V P R L F K A F G W  
1321 ACTGATTTCACTAATGATTATGCATCAGACGTTCCACGTTTATTCAAAGCATTGGTTGG

461 S L S G S Y D L D G N H A P D L V V G D  
1381 AGTTTATCTGGTTCATATGATTTAGACGGAAATCATGCTCCTGATCTTGTAGTCGGAGAT

481 Y E S D Q V V M L R G R N T L W F D L P  
1441 TATGAAAGTGATCAAGTTGTAATGCTTCGTGGACGTAACACTTTATGGTTTGATTTACCA

501 N W E L P T Q P T L S W R Y K D T L T C  
1501 AATTGGGAAGTCCCAACACAACCAACCCTATCATGGAGATATAAAGATACTTTAACTTGT

521 D E Q C Y F P I Q L S A R I N G K Q H L  
1561 GATGAACAGTGCTATTTTCCAATTCAATTATCTGCTCGAATTAATGGTAAACAACATTTA

541 L K Q I K D W K L R L S I D L D S D V E  
1621 CTAAACAAATTAAGATTGGAACTTCGACTATCGATCGATTTGGATTGAGATGTTGAA

561 Q P E N K R L T I Q A T R K Q T I Y Q S  
1681 CAGCCTGAAAATAACGTCTCACTATAACAAGCAACACGGAAACAAACGATTTACCAGTCA

581 T D K G I I D M L V E L K T D E L M E E  
1741 ACGGATAAAGGAATTATTGATATGCTTGTGGAATTGAAAACCGATGAATTGATGGAAGAA

601 N S S R I T L F D F I V K P L I S K I S  
1801 AACTCTAGTCGGATAACTTTATTTGATTTTATTGTTAAACCTTTAATCTCGAAAATTAGC

621 T L L W K P V R I N V T L N P V H E P M  
1861 AACTTTTTATGGAAACCTGTACGTATTAATGTAACACTAAACCCTGTACATGAGCCAATG

641 S F V E H K S I S S W I L H P F L G N R  
1921 TCTTTTGTGGAACACAAATCAATATCATCATGGATATTGCATCCATTCTTGGGCAATCGA

661 T F I S R S M Q F A N P A C G V D N I C  
1981 ACCTTTATTAGTCGTTCAATGCAATTTGCCAATCCAGCCTGTGGTGTGATAATATATGT

681 R P D L Q V Q M I D I S E G P T D K S I  
2041 CGACCTGATTTACAAGTTCAAATGATCGATATCTCTGAAGGTCCAACAGATAAATCAATT

701 I Y F R E R V S Q R N I T V H I G N L G  
2101 ATTTATTTTAGAGAACGTGTTAGTCAAAGAAATATTACTGTTTATGTTGGAATTTAGGT

721 E N A Y S T Q L H M I F P D Q L S F S I  
2161 GAAAATGCTTATTCTACTCAATTACACATGATATTTCTGATCAATTGAGTTTTAGTATA

741 P E G L L C Q T V T L S D M K Q T Q L I  
2221 CCAGAAGGTTTATTATGTCAAACCTGTGACATTGAGTGATATGAAACAAACACAACCTGATT

761 C N L D D P L S Y T G N D H L Y S F T F  
2281 TGTAATTTAGATGATCCATTAAGTTATACAGGAAATGATCATCTTTATTCATTCACCTTTT

781 Q I N T A G A F R Q L D E P V N D Q P E  
2341 CAAATAAATACAGCTGGAGCATTTCGACAATTAGATGAACCAGTAAATGATCAACCAGAA

801 N I S D H D H S H N Y N D D K K K I D Y  
2401 AATATTTGAGATCATGATCATTACATAATTATAATGATGATAAGAAAAAATGATTAT

821 S L S R T I N K P K H E D D N E M K T D  
2461 TCATTATCAAGAACGATCAATAAACCAAAACATGAAGATGATAATGAAATGAAAACCTGAT

841 F Y R H S S S V K R D N N N D Y E E S Y  
2521 TTTTACAGACATTCATCTTCTGTAAAGAGGGATAATAATAATGATTATGAGGAATCATAAC

861 V K P I Y H S Y Q L K R N K R D T L S I  
2581 GTTAAACCTATTTATCATTATCAACTTAAACGGAATAAACGTTGATACTTTATCAATT

881 P K D L T I T A K V I S G N T D D N I N  
2641 CCTAAAGATTTAACAATAACAGCTAAAGTGATAAGTGGAATAACAGATGATAATATAAAT

901 N N E A S I T Y Q L K L A A K V E L S S  
2701 AATAATGAAGCAAGTATTACTTATCAATTTAAATTTGGCTGCTAAAGTTGAACTTTTCATCA

921 S A L D R T I I D F R N F S V Q P Y E M  
2761 TCTGCATTGGATCGTACAATTATTGATTTTCGGAATTTTCTGTACAACCATATGAAATG

941 Q R I H P E T I G P E L K H I Y L V T N  
2821 CAAAGAATTCATCCCGAAACAATTGGTCCAGAATTTAAACATATTTATCTTGTACAAAT

961 A G P S P L E N V W V V S A E G H V R G  
2881 GCTGGTCCATCACCATTGGAAAATGTTTGGGTTGTTAGCGCAGAAGGTCATGTACGTGGA

981 L C I T P E W A L N P L R L N A V H R N  
2941 TTATGTATAACACCTGAATGGGCATTAATCCTTTACGTTTAAATGCAGTTCATCGTAAT

1001 R V E E S S K S R S L S R S F R S Q L S  
3001 CGTGTAGAAGAATCCTCTAAATCACGATCATTAAAGTCGAAGTTTTTCGATCACAACCTCTCC

1021 M T R Y R R S V N R K I K N R E L S Y L  
3061 ATGACAAGATATCGACGTTTCAGTAAATAGGAAAATAAAAAATAGGGAATTATCTTATCTA

1041 N D K H N F I D D N Q P I N S K D T I R  
3121 AATGACAAACACAATTTTCATTGACGATAATCAACCAATTAATTCAAAAGATACAATTAGA

1061 N A R S I L H G V R K R Q Q E I I K C G  
3181 AATGCTAGGTCAATTTTACATGGTGTAAAGAAAACGTCAACAAGAAATTATCAAATGTGGT

1081 E K V S D L G Y P V C A V I S C R V N G  
3241 GAAAAAGTTTTCTGATTTGGGATATCCAGTTTGTGCAGTCATATCGTGTCTGTGAATGGA

1101 L S R G D A V R I V L R G W I W A D T F  
3301 TTATCACGTGGTGTATGCTGTACGTATTGTTTTACGTGGTTGGATCTGGGCTGATACATTT

1121 F R H K I S D F A I V S E A N A K L E E  
3361 TTTCGTCATAAAATATCTGACTTTGCAATTGTCAGTGAAGCAAATGCTAAACTTGAAGAA

1141 T A F G I K I D S N L T I Q P L A I S Q  
3421 ACTGCTTTTCGGTATTAAAATTGACAGTAATTTAACTATAACAACCATTAGCTATATCACAA

1161 N F V F E G I N V S L F R E I P L W P F  
3481 AATTTTGTATTTGAAGGTATTAATGTATCATTATTTTCGTGAAATTCCATTATGGCCATTT

1181 I L G S V L G L A L L A L L I F T M W R  
3541 ATACTTGGCAGTGTATTAGGTTTAGCATTATTAGCATTATTAATATTTACAATGTGGAGA

1201 C G F F H R K Q I Y D N H F Q Q Y P H D  
3601 TGTGGTTTTCTTTTCATAGAAAACAAATCTATGATAATCATTTTTCAACAATATCCGCATGAT

1221 N N N N G N S I N P L F I E P R K N -  
3661 AATAATAATAATGGAAACAGTATTAATCCATTATTTATTGAACCGAGAAAAAAT**TAA**

## 5.5 *In silico* - Analyse der 5'-Region des SmTK4-Gens

Das Ergebnis der *in silico* - Analyse der 5'-Region des SmTK4-Gens ist im Folgenden dargestellt. Identifizierte, putativ regulatorische Elemente sind grau markiert.

GTTTCGAGTCCCAGAGTGAACAACAACCTCTGAGATGCAGGTACATCCAGCT <b>TGACGAGTCCC</b>	60
<b>CREB (- 2548)</b>	
AAATAGGACGAAACGCGCTCGCTGGATTCCACTGCTAGCCACTATCCAAAATATTTGATT	120
GTTAATGGCTTAAATATTCATCAAAGATAGATAGGGAAATTATCATTGGGAAAAGATGG	180
CTCAGCATGATAACGTGTTGAAAATTGAGATTAATGTAATCAGGAGGATCATAGAAACAG	240
AAATAAACCGATTGAGGGTAGAAGGCCTAAGGAGAAGATGGAAGGGGAAGCAGATGGCTA	300
TGGAGGGAGAAGGGTAAAAATAAAAAAATTATTATAAGACATTAAGACCATGGTAGAA	360
GAAGAGGTTATATCAATCTCTTTTGGACACATAATTATGGTTTTCCAGATGTATGATTA	420
CTGCTCCGGCAATGCTAAGAAGATGCGATCTAATTGTTTTGGGAAGACTTCTACTTATCT	480
TGTAGATGACTTTGAACGCGAAGTCCGTCTTGATCGGGTGACCTGTGTTCAAGGTGTT	540
CGATTATTGAACTAATCCCTTCTCCTCTTCTAGAATAGTTGAAGTTTATTTCTGACGTGT	600
GATTTGTGATCAGTTTTCTTATATCGTTTTAAAAAAGAGTAAAGACCAAAGCAATTCTCA	660
TTATTTAAACAATTT <b>ACTT</b> TTAAAATTAATTTATTCTAACTAGTTGTTTGACTCTTTTCG	720
<b>SWI/SNF (- 1956)</b>	
AGTGGGACTCCTCAGCAGTGCGCATCCACGATCCCACCTCGAGAGATTCAAACCCAGGAC	780
CTGTCAGTCTCTCACGCGAGCGCTTAACATCAAACCACTGAGCCGGTGTCCAACGGTGT	840
TAATGTCTAACTTTAACTGATCCACGAAATATAGCGACATATCCACCATTGTCTTCAGTG	900
GGTTATTATCTCACAACAGACCTAGTTGAACTCCACAGGTCCTACTTCTACTAGAACT	960
CCAAGAAATACCTTTCGAAGCTAGTCACTAGTGAGTATATGTTGACTAATATCAGAAGGG	1020
GATTTGTGGATATTATAG <b>TAAT</b> TGTAATAGTTGAGATCATGAGTTCATTGAAGCTAGAC	1080
<b>S8 (- 1593)</b>	
CACCATGGAAAACCTAAAAAAGACAATTTTACCAGTTATATATAATTTAATGTTAGAAA	1140
TGTTTTGTAATGTATGTACTAATAAGAGAAAAAAGTAGTTGGTAGAGGGTAACAATTT	1200
TGGCATTATTTCAATATATTGATCGATTGATTGATTAAT <b>TAAT</b> TGATTGAATGAGTGAG	1260
<b>S8 (- 1392)</b>	
TGATATATTACTGTTATTATTACTGCTGTGTTATAAA <b>TAAT</b> TAATCATGTT <b>ACTT</b> TTTGT	1320
<b>S8 (- 1335)</b> <b>SWI/SNF (- 1320)</b>	
ATTCTGGTTTTTATTAATAATCTACTTCAATATAAATTCATATTAGGTGAATACTTTAGT	1380
GTATATTTTTTGTATTGTTAATGTAACAAAACATAG <b>CCAAT</b> AGAAGTGGATGGTACTAAATT	1440
<b>CAAT (- 1219)</b>	

TCTTGGATTGGTTGTTGTTAAACATTAATACTGTTGGATGATGTCTCAGTGGTCTAG <b>AGG</b>	1500
<b>RXR (- 1141)</b>	
<b>TTAAGCGTTCATGCGCAGGATTGATAAATTCTGGATTTCGAATCCCGCCAGGCGGGATAGT</b>	1560
AGATGCGTACTGTTAAGGAGTCTCACACTATGACGAAACGGTGGTAGTCTAGCTTCAATC	1620
GATTCGTGATCTCAACTATCAAATTTAATCATTGTTTTTTTT <b>ACTTTT</b> CAATAATCA	1680
<b>SWI/SNF (- 966)</b>	
TGACCGACTTCTTTTTATTGAAACAAGGTATTTGACTCTATTTACAC <b>ACTTTT</b> CCGTTT	1740
<b>SWI/SNF (- 903)</b>	
ATTGGTTGAATAAATATATATATCAGTATGGGTTTGGGCACAACCTTTGAAATTTTCATTAA	1800
AATCATGAATCGATCTAAGTTGGAAAATCATAAAAAAACCGGAGATCCTAAGTTTCATTA	1860
CCGCTTGCCTGTCGTAGATGGACACCACTGAGGACTTCCATGTTGGGACGAAACGGCCG	1920
TCTACTGTTTCTAGTTTTTCAATAGTGGTCTAACAGTGATCTTTTCACCATCTCAATATA	1980
TATATATATATATATATCGTTTATCATAAGCTTTCATTTGACCTATTAGCTAATATTATTCA	2040
ACTTACTGCTCTTGATTTTTATT <b>CCAAT</b> CATTTAGTTACAGTCTCCTATACATCCACTTT	2100
<b>CAAT (- 568)</b>	
TGTCTTGGTCCTGTAT <b>TAAT</b> TGTGATTTTTTCATTTT <b>GGTGTGTGT</b> ATCCTGGTCTGCTT	2160
<b>S8 (- 517)</b>	
<b>TIEG (- 493)</b>	
GTATATAAACTACATATGTCTGAAATATATTGTTTCATACAGTGGATGCGGATATTGTGTT	2220
TTAAACTCAACGAATAGGGCTAAGCGAGAAGCTACTAAATCGAGGACTAATAAGGATCCA	2280
GAGTTGACCCAAGGCTGGTAGTGCTTGTTAACATTTTCAT <b>TGAAGT</b> CATGGAAGTTGGCAT	2340
<b>CREB (- 308)</b>	
TCTGTTGCGCGATTTTGTCAAGTGATATTTGACATGGCAAAAGTCATAACATCTCACTAA	2400
CAGAGTTCTTCAAATCTAAGTCCTGATGAATCTATCAATCTATAACCAAACCTTGCTCAA	2460
ACTAAATTAATCTTTCCAAATCACCCGCTAGAGAGATC <b>ATAAAA</b> CTATTTATCTTGTTTT	2520
<b>TATA (- 129)</b>	
CTTTTTGTTTT <b>CCATTCCC</b> TTTTAGTTCACATTTATGCAGACTCATTTCCAAGTAAATGTT	2580
<b>Inr (- 92)</b>	
CCACCAGTTTGTACATTAGTAAATAAACAACCAAGACAGTTGATTTTCATG	2630



Contig CTTTCCCCAAATAACTTTAATCAAGGTACACTAACACAGCAGTTTTGTATGTGGCCAGCT 660  
 Pearce CTTTCCCCAAATAACTTTAATCAAGGTACACTAACACAGCAGTTTTGTATGTGGCCAGCT 658  
 Grevelding CTTTCCCCAAATAACTTTAATCAAGGTACACTAACACAGCAGTTTTGTATGTGGCCAGCT 660  
 \*\*\*\*\*

Contig TAATGTAGAGTAAGTCCAGATATTGGATAAAAAAAGTTACGAAATGAAATTTGTCTTTT 720  
 Pearce TAATGTAGAGTAAGTCCAGATATTGGATAAAAAAAGTTACGAAATGAAATTTGTCTTTT 718  
 Grevelding TAATGTAGAGTAAGTCCAGATATTGGATAAAAAAAGTTACGAAATGAAATTTGTCTTTT 720  
 \*\*\*\*\*

**GATA (- 825)**

Contig ACAATGACGGACCAGTCCGATAATTCTGACTTAGATACTTTCACTAAGTAGTAGCAGGTT 780  
 Pearce ACAATGACGGACCAGTCCGATAATTCTGACTTAGATACTTTCACTAAGTAGTAGCAGGTT 778  
 Grevelding ACCATGACGGACCAGACCGATAATTCTGACTTACATACTTTCCCTAAGTAGTAGCAGGTT 780  
 \*\* \*\*\*\*\*

**CEBP (- 812)**

Contig TTTCAGACAATGACATTATGTAGAGTAGTGGACTCCTCTCTTAATTTGTAAGCAAAAAGT 840  
 Pearce TTTCAGACAATGACATTATGTAGAGTAGTGGACTCCTCTCTTAATTTGTAAGCAAAAAGT 838  
 Grevelding TTTCAGACAATGACATTATGTAGTAGGGACTCCTCTCTTAATTTGGAAGCAGAAAAGT 840  
 \*\*\*\*\*

Contig TGTGGATTTTACCAGTTTTGTAAACAATTAACCTGTGCTTCATCATCCAACCTTTTATTTC 900  
 Pearce TGTGGATTTTACCAGTTTTGTAAACAATTAACCTGTGCTTCATCATCCAACCTTTTATTTC 898  
 Grevelding TGTGGATTTTACCAGTTTTGTAAACAATTAACCTGTGCTTCATCATCCAACCTTTTATTTC 900  
 \*\*\*\*\*

Contig GCACATATTTATAAGTCTTTGCAATATATGTTAGGTGATATGATCTAATTCTTGATGTCT 960  
 Pearce GCACATATTTATAAGTCTTTGCAATATATGTTAGGTGATATGATCTAATTCTTGATGTCT 958  
 Grevelding ACACATATTTATAAGTCTTTGCAATAGATGTTAGGTGATAGGATCTAATTCTTGATGTCT 960  
 \*\*\*\*\*

Contig GTTTCCCAACAACAATTAATACGAATGTGTCAAACCTCCAAATAGTTCCACACCAACA 1020  
 Pearce GTTTCCCAACAACAATTAATACGAATGTGTCAAACCTCCAAATAGTTCCACACCAACA 1018  
 Grevelding GGTTCACCAACAACAATTAATACGAATGTGTCAAACCTCCAAATAGTCCACACCAACA 1020  
 \* \*\*\*\*\*

Contig CAC-AACCATACGCTACCGAGTAAACCAACAACCTCAACAACCAGCCGACACTCAAATA 1079  
 Pearce CAC-AACCATACGCTACCGAGTAAACCAACAACCTCAACAACCAGCCGACACTCAAATA 1077  
 Grevelding CACTGACCATACGCTACCGAGTAAACCAACAACCTCAACAACCAGCCGACACTCAAATA 1080  
 \*\*\* \*\*\*\*\*

Contig TGTATGCACCAAACACGTATTTAAAAGTTCATTACAGCTTAGACACCTAATCATCTA 1139  
 Pearce TGTATGCACCAAACACGTATTTAAAAGTTCATTACAGCTTAGACACCTAATCATCTA 1137  
 Grevelding TGTATGCACCAAGACACGTATTTAAAAGTTCATTACTAGCTTAGACGCCTAATCATCTA 1140  
 \*\*\*\*\*

Contig GACAGACAGAGTTGTATCAATAATTAACCAATCATAAATCGTATATGTCAGGCTGATTGA 1199  
 Pearce GACAGACAGAGTTGTATCAATAATTAACCAATCATAAATCGTATATGTCAGGCTGATTGA 1197  
 Grevelding TACAGAGAGAGTTGTATCAATAATTAACCAATCATAAATCGTATATGTCAGGCTGATTGA 1200  
 \*\*\*\*\*

**S8 (- 351)**

Contig TATCTCTTGGTCTCAAGTCTCAAGTATTTTTATTTGCTGAAAAAGTAAGGTATCTTTTT 1259  
 Pearce TATCTCTTGGTCTCAAGTCTCAAGTATTTTTATTTGCTGAAAAAGTAAGGTATCTTTTT 1257  
 Grevelding TA-CGCTTGGACTCAAGTCTCAAGCATTTTTTATTTGCTGAAAAAGTAAGGTATCTTTTT 1259  
 \*\* \* \*\*\*\*\*

Contig TTACTGGAGTAGGCAGACCGAAACTCAGGCCACATAAGGAACGTTAGAAAATTGATTAA 1319  
 Pearce TTACTGGAGTAGGCAGACCGAAACTCAGGCCACATAAGGAACGTTAGAAAATTGATTAA 1317  
 Grevelding TTACTGGAGTAGGCAGACCGAAACTCAGGCCACATAAGGAACGTTAGAAAATTGATTAA 1319  
 \*\*\*\*\*

Contig CAATGCGGACAACCAATAAATGATCTGGGCAAGACGCAATAAATAGCATTTGGTAATTG 1379  
 Pearce CAATGCGGACAACCAATAAATGATCTGGGCAAGACGCAATAAATAGCATTTGGTAATTG 1377  
 Grevelding CAATGCGGACAACCAATAAATGATCTGGGCAAGACGCAATAAATAGCATTTGGTAATTG 1379  
 \*\*\*\*\*

**CAAT (- 178)**

**CAAT (- 154)**

Contig	CTACATTATTGATTGAGCAAGGTGTTTACTGATTGGT <b>CAATTTC</b> CATAAAATGTAGAGTTAG	1439	
Pearce	CTAGATTATTGATTGAGCAAGGTGTTTACTGATTGGT- <b>AAAGTC</b> CATAAAATGTAGAGTTAG	1436	
Grevelding	CTACATTATTGATTGAGCAAGGTGTTTACTGATTGGT <b>CAATTTC</b> CATAAAATGTAGAGTTAG	1439	
	*** ***** ** *****		
	<b>CEBP (- 118)</b>	<b>CAAT (- 83)</b>	
Contig	CCATTTATGG <b>TC</b> ATTTCATCAA <b>AC</b> GTATTTAGTAAAGTGAAT <b>CA</b> AGTGTCTCATCATCTA	1499	
Pearce	CCATTTATGG-CATTTTCATCAA-CGTATTTAGTAAAGTGAAT <b>CA</b> AGTGTCTCATCATCTA	1494	
Grevelding	CCATTTATGG <b>TC</b> ATTTCATCAA <b>AC</b> GTATTTAGTAAAGTGAAT <b>CT</b> AGTGTCTCATCATCTA	1499	
	***** ***** ***** ***** *****		
	<b>CarG (- 70)</b>	<b>TATA (- 35)</b>	<b>E Box (- 23)</b>
Contig	GTAAAATG	1507	
Pearce	GTAAAATG	1502	
Grevelding	GTAAAATG	1507	
	*****		

## 5.7 cDNA- und Aminosäuresequenzen des Mucin-Homologs aus *S. mansoni*

Nachfolgend sind die cDNA- und Aminosäuresequenzen des Mucin-Homologs aus *S. mansoni* (9.261 bp, 3.086 AS) angegeben, das als Interaktionspartner der Src-Kinase SmTK6 im Yeast Two-Hybrid System identifiziert wurde (vollständige Sequenz aus den *S. mansoni* - Datenbanken, CDS 29294.m000039). Start- und Stopcodons sind durch Fettdruck markiert. Die als potentielle Bindestellen für die SH2-Domänen einer Src-Kinase bzw. Abl-Kinase dienenden Sequenzmotive sind rot (Src) bzw. orange (Abl) und die vorhergesagte Transmembran-Helix blau gekennzeichnet. Das potentielle ITAM (*immunreceptor tyrosine-based activation motif*), das von Syk-Kinasen gebunden und phosphoryliert werden kann, ist grün markiert.

```

1  M R Q S V E N T S T Q T D P M A Q V P T
1  ATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACT

21  V L P K T T F D V V T Q S G T V H C A Q
61  GTACTACCAAAAACCACGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAG

41  S V Q T I P E E R P V F H T V N V G L D
121 TCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAACGACCAGTATTCCACACTGTCAATGTAGGACTTGAT

61  H T E K S P S L V G K K L Q A T M R Q S
181 CATACTGAGAAATCACCCCTCATTAGTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCA

81  V E N T S T Q T D P M A Q V P T V L P K
241 GTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAA

101 T T F D V V T Q S G T V H C A Q S V Q T
301 ACCACATTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACT

121 I P E E R P V F H T V N V G L D H T E K
361 ATTCCAGAGGAACGACCAGTATTCCACACTGTCAATGTAGGACTTGATCATACTGAGAAA

141 S P S L V G K K L Q A T M R Q S V E N T
421 TCACCTTCATTAGTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACG

```

161 S T Q T D P M A Q V P T V L P K T T F D  
481 AGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCACGTTTCGAT

181 V V T Q S G T V H C A Q S V Q T I P E E  
541 GTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAA

201 R P V F H T V S V G L D H T E K S P S L  
601 CGGCCAGTATTCCACACTGTCAGTGTAGGACTTGATCATACTGAGAAATCACCTTCATTA

221 V G K K L Q A T M R Q S V E N T S T Q T  
661 GTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACT

241 D P M A Q V P T V L P K T T F D V V T Q  
721 GATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCACATTCGATGTTGTGACTCAA

261 S G T V H C A Q S V Q T I P E E R P V F  
781 TCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAACGACCAGTATTC

281 H T V N V G V D L T G K L Q S V L Y E N  
841 CACACTGTCAATGTAGGAGTAGATCTTACTGGGAAATTACAGTCCGTATTATACGAGAAT

301 V Q A T M R Q S V E N T S T Q T D P M A  
901 GTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCT

321 Q V P T V L P K T T F D V V T Q S G T V  
961 CAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCACGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTC

341 H C A Q S V Q T I P E E Q P V F H T V S  
1021 CACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAACAACCAGTATTCCACACTGTCAGT

361 V G L D H T E K S P S L V G K K L Q A T  
1081 GTAGGACTTGATCATACTGAGAAATCACCTTCATTAGTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACA

381 M R Q S V E N T S T Q T D P M A Q V P T  
1141 ATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACT

401 V L P K T T F D V V T Q S G T V H C A Q  
1201 GTACTACCAAAAACCACATTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAG

421 S V Q T I P E E R P V F H T V N V G V D  
1261 TCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAACGACCAGTATTCCACACTGTCAATGTAGGAGTAGAT

441 L T G K L Q S V L Y E N V Q A T M R Q S  
1321 CTTACTGGGAAATTACAGTCCGTATTATACGAGAATGTTTCAGGCGACAATGCGTCAATCA

461 V E N T S T Q T D P M A Q V P T V L P K  
1381 GTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAA

481 T T F D V V T Q S G T V H C A Q S V Q T  
1441 ACCACGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACT

501 I P E E R P V F H T V S V G L D H T E K  
1501 ATTCCAGAGGAACGGCCAGTATTCCACACTGTCAGTGTAGGACTTGATCATACTGAGAAA

521 S P S L V G K K L Q A T M R Q S V E N T  
1561 TCACCTTCATTAGTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACG

541 S T Q T D P M A Q V P T V L P K T T F D  
1621 AGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCACGTTTCGAT

561 V V T Q S G T V H C A Q S V Q T I P E E  
1681 GTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAA

581 Q P V F H T V N V G L D H T E K S P S L  
1741 CAACCAGTATTCCACACTGTCAATGTAGGACTTGATCATACTGAGAAATCACCTTCATTA

601 V G K K L Q A T M R Q S V E N T S T Q T  
1801 GTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACT

621 D P M A Q V P T V L P K T T F D V V T Q  
1861 GATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCACGTTTCGATGTTGTGACTCAA

641 S G T L S L N V G C Q A V L I S E D L L  
1921 TCTGGTACTCTATCTCTTAATGTTGGTTGTCAAGCTGTTCTTATTTTCGGAAGATTTATTA

661 M N D V A V D H V G S I N P C F S Q G V  
1981 ATGAACGATGTTGCTGTTGATCATGTTGGGTCAATAAATCCCTGTTTCTCTCAAGGTGTT

681 Q A G T Q V E C R N V E I Q C V I K D K  
2041 CAAGCTGGTACACAAGTTGAATGTAGAAATGTTGAAATACAATGTGTGATAAAAGATAAA

701 H V V N I R D A D A Q F D V L C R Q Q E  
2101 CATGTAGTGAATATTCGGGATGCAGACGCGCAATTCGACGTATTATGCCGTCAGCAAGAA

721 T Q T F S L P S T T T K E G S V Q H T P  
2161 ACTCAAACCTTTTAGTTTACCTTCAACGACAACGAAAGAAGGAAGCGTTCAGCACACACCA

741 T T T Q L I N K K L Q V T V S Q S I R E  
2221 ACGACTACACAATTAATAAATAAAAAGTTACAAGTAACTGTTTCCCAGTCGATTCGAGAG

761 A A A Q T Y E S I P V V T V P T M Q T I  
2281 GCAGCCGCGCAAACATACGAATCAATACCAGTTGTAACAGTACCCACGATGCAAACAATT

781 Y H S S Q T H E I S S Q T E S L G L F D  
2341 TATCACTCATCACAGACACATGAAATATCATCACAGACTGAGAGTCTGGGATTATTTGAC

801 H Q T Y A H I K S K T I D V E T Q S G I  
2401 CATCAGACCTACGCGCATATCAAATCTAAAACAATTGATGTAGAAACGCAATCAGGAATC

821 I C K S Q G L Q T K L D H K P F G M T K  
2461 ATTTGCAAATCACAGGGATTGCAGACAAAATTAGACCATAAAACCGTTTCGGAATGACAAAA

841 E N S T Q Y E A V Q R R M I N I D I Q A  
2521 GAAAATAGTACACAGTATGAGGCAGTTCAAAGAAGAATGATAAATATAGATATTCAGCA

861 D A R H A V A Y R Y V Q T D E S Q L I H  
2581 GATGCTCGACATGCAGTGGCTTATCGTTATGTCCAAACAGATGAAAGTCAACTGATACAT

881 I K Q K H Q M N V Q T Q S G I I Q K E Q  
2641 ATCAAGCAGAAACACCAGATGAATGTACAGACACAATCAGGAATAATTCAAAAAGAACAA

901 G I Q T R E E V Q T T V N V T D V T V T  
2701 GGAATACAAACACGTGAAGAGGTTCAAACCACAGTGAACGTAACCGACGTTACTGTAACT

921 H E F K T R Q I N K K L Q A T I M P Q I  
2761 CATGAATTTAAAACCTCGACAAATAAACAAGAAATTGCAAGCAACCATAATGCCACAAATA

941 K D T I I Q T E L E G T S V F P T A T K  
2821 AAAGACACCATAATACAAACAGAACTAGAAGGAACCTCTGTTTTTCCAACGGCAACAAAA

961 P T F D V Q T Q S G S V T I N S E T Q T  
2881 CCTACATTTGATGTGCAAACACAGTCAGGATCAGTCACGATAAATTCAGAAACACAAACT

981 P H E P K I I P A I K D A S V I H E P H  
2941 CCACACGAACCGAAAATAATCCCAGCTATAAAGGATGCGAGTGTGATTTCATGAACCACAT

1001 H V H T V N K K L Q A V V Y H P S D D V  
3001 CACGTACACACAGTCAACAAGAACTTCAAGCTGTGGTATATCATCCATCTGACGATGTT

1021 C L Q T D E V T V Q P V K P V P Q A F S  
3061 TGTTTGCAAACCGATGAAGTAACAGTACAACCTGTCAAACCCGTTCCCTCAGGCGTTCTCT

1041 R A P Q V E H K Q T Q A E W L K T K T K  
3121 CGAGCTCCGCAAGTCGAACATAAGCAAACACAAGCAGAATGGCTAAAGACTAAGACAAAA

1061 T F D I Q A Q S G I V V K T Q S T Q T I  
3181 ACATTTGATATACAAGCACAAATCAGGTATAGTAGTCAAGACACAGTCCACACAAACTATT

1081 L E E R P M F H T A D V S V I H S E K S  
3241 CTAGAAGAACGACCAATGTTCCATACTGCAGACGTCAGTGTGATTACAGTGAAAAATCA

1101 P L L V N K K L Q V T I G Q S V E N T S  
3301 CCTTTGCTGGTGAATAAGAACTTCAAGTAACCATAGGTCAATCAGTTGAGAACACGAGC

1121 T Q T D P M A Q V P T V L P K T T F D V  
3361 ACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCACGTTTCGATGTT

1141 V T Q S G T V H C A Q S V Q T I P E E Q  
3421 GTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAACAA

1161 P V F H T V N V G L D H T E K S P S L V  
3481 CCAGTATTCCACACTGTCAATGTAGGACTTGATCATACTGAGAAATCACCTTCATTAGTA

1181 G K K L Q A T M R Q S V E N T S T Q T D  
3541 GGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGAT

1201 P M A Q V P T V L P K T T F D V V T Q S  
3601 CCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCACATTTCGATGTTGTGACTCAATCT

1221 G T V H C A Q S V Q T I P E E Q P V F H  
3661 GGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAACAACCAGTATTCCAC

1241 T V N V G L D H T E K S P S L V G K K L  
3721 ACTGTCAATGTAGGACTTGATCATACTGAGAAATCACCTTCATTAGTAGGCAAGAAGCTT

1261 Q A T M R Q S V E N T S T Q T D P M A Q  
3781 CAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAA

1281 V P T V L P K T T F D V V T Q S G T V H  
3841 GTCCTACTGTACTACCAAAAACCACGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCAC

1301 C A Q S V Q T I P E E R P V F H T V S V  
3901 TGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAACGACCAGTATTCCACACTGTCAGTGTA

1321 G V D L T G K L Q S V L Y E N V Q A T M  
3961 GGAGTAGATCTTACTGGGAAATTACAGTCCGTATTATACGAGAATGTTGAGGCGACAATG

1341 R Q S V E N T S T Q T D P M A Q V P T V  
4021 CGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTA

1361 L P K T T F D V V T Q S G T V H C A Q S  
4081 CTACCAAAAACCACGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCA

1381 V Q T I P E E R P V F H T V N V G L D H  
4141 GTTCAGACTATTCCAGAGGAACGACCAGTATTCCACACTGTCAATGTAGGACTTGATCAT

1401 T E K S P S L V G K K L Q A T M R Q S V  
4201 ACTGAGAAATCACCTTCATTAGTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTT

1421 E N T S T Q T D P M A Q V P T V L P K T  
4261 GAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACC

1441 T F D V V T Q S G T V H C A Q S V Q T I  
4321 ACATTGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATT

1461 P E E Q P V F H T V N V G L D H T E K S  
4381 CCAGAGGAACAACCAGTATTCCACACTGTCAATGTAGGACTTGATCATACTGAGAAATCA

1481 P S L V G K K L Q A T M R Q S V E N T S  
4441 CCTTCATTAGTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGC

1501 T Q T D P M A Q V P T V L P K T T F D V  
4501 ACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCACGTTTCGATGTT

1521 V T Q S G T V H C A Q S V Q T I P E E R  
4561 GTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAACGA

1541 P V F H T V S V G L D H T E K S P S L V  
4621 CCAGTATTCCACACTGTCAGTGTAGGACTTGATCATACTGAGAAATCACCTTCATTAGTA

1561 G K K L Q A T M R Q S V E N T S T Q T D  
4681 GGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGAT

1581 P M A Q V P T V L P K T T F D V V T Q S  
4741 CCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTACTACCAAAAACCACATTTCGATGTTGTGACTCAATCT

1601 G T V H C A Q S V Q T I P E E R P V F C  
4801 GGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTCAGACTATTCCAGAGGAACGACCAGTATTTTGC

1621 T V D V S V D H V D N A P I V R S T V S  
4861 ACTGTTGATGTAAGCGTTGATCATGTTGATAATGCCCTATTGTTTCGATCAACAGTGTC

1641 S T M H T L P N T S Q S T Q T I P T K L  
4921 TCGACAATGCATACTCTTCCAAATACATCACAATCAACACAAACCATTCCCACTAAACTG

1661 A D T F C Q T T L S S I T Y D V Q I Q S  
4981 GCTGATACATTCTGTCAAACAACGTTATCTTCTATCACATACGATGTCCAAATTCAGTCT

1681 G V I H S V D G T Q T V D L T P P I A M  
5041 GGAGTAATACATTAGTAGATGGAACACAAACTGTTCGATTTAACTCCACCTATTGCGATG

1701 K E M S V V H E K E P T I L K G K K L Q  
5101 AAAGAAATGAGTGTGTCGATGAAAAGGAACCAACTATTTTGAAGGGGAAGAACTTCAG

1721 V R C D S T D L G I Q T D Q I T P I V Q  
5161 GTTCGTTGTGATTCCACTGATTTGGGAATCCAAACAGATCAAATTACTCCAATTGTTTCAG

1741 P T I S S T M H T L P N T S Q S T Q T I  
5221 CCAACAATCTCATCGACAATGCATACTCTTCCAAATACATCACAATCAACACAAACCATT

1761 P T K L A D T F C Q T T L S S I T Y D V  
5281 CCCACTAAACTGGCTGATACATTCTGTCAAACAACGTTATCTTCTATCACATACGATGTC

1781 Q I Q S G V I H S V D G T Q T V D L T P  
5341 CAAATTCAGTCTGGAGTAATACATTAGTAGATGGAACACAAACTGTTCGATTTAACTCCA

1801 P I A M K E M S V V H E K E P T I L K G  
5401 CCTATTGCGATGAAAGAAATGAGTGTGTCGATGAAAAGGAACCAACTATTTTGAAGGGG

1821 K K L Q V R C D S T D L G I Q T D Q I T  
5461 AAGAACTTCAGGTTTCGTTGTGATTCCACTGATTTGGGAATCCAAACAGATCAAATTACT

1841 P I V Q P T I S S T M H T L P N T S Q S  
5521 CCAATTGTTTCAGCCAACAATCTCATCGACAATGCATACTCTTCCAAATACATCACAATCA

1861 T Q T I P T K L A D T F C Q T T L S S I  
5581 ACACAAACCATTCCCACTAAACTGGCTGATACATTCTGTCAAACAACGTTATCTTCTATC

1881 T Y D V Q I Q S G V I H S V D G T Q T V  
5641 ACATACGATGTCCAAATTCAGTCTGGAGTAATACATTTCAGTAGATGGAACACAAACTGTC

1901 D L T P P I A M K E M S V V H E K E P T  
5701 GATTTAACTCCACCTATTGCGATGAAAGAAATGAGTGTCTGACATGAAAAGGAACCAACT

1921 I L K G K K L Q V R C D S T D L G V Q T  
5761 ATTTTGAAGGGGAAGAAACTTCAGGTTGTTGTGATTCCACTGATTTGGGAGTCCAAAACA

1941 D H T M S T V H L D S K L T Q T A L V H  
5821 GATCACACTATGTCTACTGTTCACTTGGACAGTAAATTAACTCAAACCTGCTTTAGTTCAT

1961 Y T D V S C Q Y T E L T K P S S T S H V  
5881 TATACGGATGTATCATGTTCAGTATACTGAACTCACGAAGCCTTCATCAACTAGTCATGTA

1981 V T S R V V S I Q T D V P F S T N I R V  
5941 GTAACGTCCAGAGTTGTTAGCATTCAAACAGATGTGCCTTTTTTCAACAAAACATACGTGTG

2001 D Q R N K K F Q V N L I S P S S P K T P  
6001 GATCAACGAAACAAGAAATTTCAAGTAAATCTAATATCTCCTTCATCACCGAAGACTCCA

2021 T N V A S I G T Q T S D Y R Y Q D I S I  
6061 ACAAATGTAGCTTCTATAGGAACACAAACCTCAGATTATAGATATCAGGATATAAGTATT

2041 E Q V D K T T V S S V D A Y M V H D S V  
6121 GAACAGGTTGATAAAAACAACAGTTTCATCAGTGGATGCATATATGGTTCATGATTCAGTG

2061 S N V T S T S Q A I P K I K I D Q E C Q  
6181 TCTAACGTGACAAGCACTTCACAAGCAATACCAAAAATAAAAATAGATCAAGAGTGCCAA

2081 V K I T P Q Q Y Q K K L Q C G P S F S T  
6241 GTAAAATAAECTCCTCAACAATATCAAAAAGAACTTCAGTGTGGTCCCTCATTTTTCTACA

2101 L K N T S S Q T I Q D S C L R D H Q R T  
6301 TTAAAAATACATCTTCTCAAACCTATACAGGATAGTTGTCTACGTGACCATCAGAGAACT

2121 S L S S S I G V Q V S N V R P V V T V D  
6361 TCTTTGTCGTCAAGTATTGGAGTTCAGGTGAGTAATGTACGACCAGTAGTTACAGTAGAT

2141 T G T Q E T R P S E T S P S P L Q V K N  
6421 ACAGGGACTCAAGAAACAAGACCAAGTGAGACTTCTCCATCACCTTTACAAGTTAAGAAC

2161 K K L Q V Y P S K L G E Q V E E E F I H  
6481 AAAAACTACAGGTCTACCCATCTAAACTTGGTGAACAAGTAGAAGAAGAATTTATACAT

2181 P Q E T I C K G M S T S L T E I T Q T D  
6541 CCTCAAGAGACAATCTGCAAAGGAATGTCCACCTCATTAACTGAGATAACACAGACAGAT

2201 E C L L K N T E C F K C I S R G G D K K  
6601 GAGTGTTTATTAATAAATACTGAATGTTTCAAGTGTATATCACGGGGAGGTGATAAGAAA

2221 T I D K D V Q S E E K S I R T K Q T A S  
6661 ACGATTGATAAAGACGTGCAATCGGAAGAAAATCAATAAGAACAAAACAAACAGCGTCC

2241 S T V K S N Y F T R I L Q M E T I P D K  
6721 AGTACAGTGAAATCAAACCTACTTTACACGTATTCTCCAAATGGAAACTATTCTTGACAAG

2261 P K A P D T S D V L K L Y R E S G Y R A  
6781 CCAAAGCACCAGACACATCCGATGTGCTGAAACTATACAGAGAGTCCGGTTACAGAGCT

2281 K G E S R D V Q T D A F L L G S I Q L P  
6841 AAGGGTGAATCAAGGGATGTTCAAACCTGATGCGTTTTTGTGGGAAGTATTCAATTACCT

2301 E S K E V D G V G K I S K K T T I V Q L  
6901 GAAAGTAAGGAAGTTGATGGCGTGGGAAAAATTTGAAAAAAACCACAATTGTTCAATTG

2321 E K L T T D K C V D T M P F E K G L I E  
6961 GAAAAGTTAACTACGGATAAGTGTGTAGATACTATGCCCTTTGAAAAAGGACTTATAGAA

2341 S Q T S Y H D I Q T S E R R N V R L P K  
7021 TCTCAAACATCCTATCATGATATCCAGACATCTGAAAGGAGAAATGTAAGGTTACCAAAA

2361 E T P W P E A Q A T N V L Q D I Q F E I  
7081 GAAACACCATGGCCAGAAGCACAAGCAACAAATGTTCTACAAGATATTCAGTTTGAAATA

2381 R H P Q M I D S S G S Y S P Q Q N S V S  
7141 AGACATCCTCAAATGATAGATTCAAGTGGGAGTTACTCACCTCAACAAAATTCAGTTTCA

2401 V S A R P T T H M L T H A E S T S R N G  
7201 GTTAGTGCACGACCAACTACTCATATGCTTACTCATGCAGAATCAACAAGCAGAAAATGGA

2421 N G K V K T P Y Q Y L K P **D V V S W G V**  
7261 AATGGAAAGGTCAAGACACCGTATCAATATTTAAAACCA**GATGTTGTAAGTTGGGGAGTA**

2441 **Q F A P V T L T G V T Q T T E S S K H K**  
7321 **CAATTTGCACCAGTAACACTTACTGGAGTAACGCAAACCACTGAATCTTTCGAAGCATAAG**

2461 L A I D S S V N I S V Q T D A V E D D Y  
7381 TTAGCTATCGATTTCATCAGTAAACATAAGTGTACAAACTGATGCAGTTGAAGATGACTAT

2481 Y I K R V V T T I A R K G L S S Y C R R  
7441 TATATAAAAAGAGTTGTGACGACAATAGCTAGGAAAGGTCTGTATCTTATTGTGTCGTCGA

2501 G P V A K K I V E H T D L L T S S L P S  
7501 GGTCCAGTAGCCAAAAAATTTGTCGAACACACCGATCTATTGACATCAAGTTTACCTAGT

2521 N L D E E F D E E T T I G P R T T K V T  
7561 AACCTAGATGAAGAGTTTGTGATGAAGAAACAACAATTGGACCAAGAACAACGAAGGTCACA

2541 T M Q K R G D R R V V H E E L L T E D Y  
7621 ACTATGCAAAAACGTGGAGATCGTCGAGTAGTACATGAAGAATTACTTACAGAGACTAT

2561 R E R G S S L D S R V A H G Q F P R E T  
7681 AGGGAAAGAGGAAGTTCACCTTGACTCTCGTGTGGCCACGGACAGTTTCCAAGAGAAAACA

2581 H P Q D I D L H E M H E H E T D I Y T D  
7741 CACCCACAGGATATAGATTTGCATGAAATGCATGAACATGAGACAGACATATATACTGAT

2601 A E I C L Q N L L K V W G E Q **Y L L S R**  
7801 GCTGAGATTTGTTTGCAGAATTTACTGAAAGTATGGGGAGAGCAAT**ACTTGCTTCTAGA**

2621 **L R T I G R Y S E L** S V S L D R S I H T  
7861 **TTACGAACGATCGGTAGATACTCAGAGCTTT**CAGTTAGTCTTGATCGAAGTATACATACA

2641 A E K S R L V E A K T Q F T S T G N L V  
7921 GCAGAAAAATCACGGCTGGTTGAAGCGAAGACACAGTTTACTTCAACGGGTAACCTTAGTG

2661 S Q I R N L E N I G T Q T S D I L L I T  
7981 AGTCAAATCAGAAATCTTGAGAATATAGGAACACAGACTAGTGATATTCTCCTTATCACT

2681 R P P H K N K R I Q R G R S F I S G G T  
8041 CGACCTCCACACAAAAATAAAAGGATACAACGTGGCCGTAGCTTCATTTCTGGAGGAACA

2701 N Q P P P T R S G S V V S P L S P T T E  
8101 AATCAGCCACCACCGACGCGTAGTGGCTCGGTAGTAAGTCCACTGTGCGCCGACAACAGAA

2721 E L T S H H R Q H G I T S M Q T R T S H  
8161 GAACTGACAAGTCATCATCGTCAACACGGGATAACAAGTATGCAGACACGTACTTCCCAT

2741 P F N L A T T T F T E T T Q E Q S T F S  
8221 CCATTTAATTTGGCCACTACCACATTTACAGAGACTACACAAGAGCAATCGACATTCAGT

2761 I E H T V Q T Y T C P T C G S Q A N I P  
8281 ATTGAACATACAGTCCAGACTTATACATGTCCAACATGTGGGAGTCAAGCTAACATTCCA

2781 V T V H S Q I Q P Q T L P I T Q L K D A  
8341 GTGACCGTTTCATTCACAAATACAACCTCAAACACTACCAATAACGCAATTAAGACGCC

2801 Q S Q T R F M G Q M T T D N N C T Y L P  
8401 CAATCACAAACTCGGTTTATGGGGCAGATGACAACCTGATAATAACTGCACATATCTACCA

2821 T Y L S D E E V I R I N Q S Q K I E D R  
8461 ACTTACCTAAGTGATGAAGAAGTAATTCGCATAAATCAGAGCCAGAAAATGAAGACAGA

2841 E F S M V T W H P A E I R D T E R R R D  
8521 GAATTTTCGATGGTGACATGGCATCCAGCAGAAATACGAGATACAGAACGCCGTAGGGAT

2861 S D T S N Q I R D E V W V D S P G K L L  
8581 AGCGACACAAGTAACCAGATACGAGATGAAGTTTGGGTTGATAGTCTTGGGAAATTGCTG

2881 E L K I T G V I V P G T S E I V S A S E  
8641 GAACTCAAATAACTGGAGTAATAGTACCTGGAACAAGCGAAATCGTTAGCGCAAGTGAA

2901 A F Y R G L L R V V Y W D **Y E K L** G P R  
8701 GCATTTTACCGTGGTCTACTAAGAGTAGTATACTGGGAT**TATGAAAACTT**GGACCTAGA

2921 Q S S V D S T V S I P L A D A V I S K A  
8761 CAATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCATACCCTCGCAGATGCAGTGATTTCTAAGGCA

2941 V R L A S D R I S T E T Q P S L D A K I  
8821 GTTCGGTTAGCTAGTGATAGAATATCGACAGAAACGCAGCCATCATTGGATGCCAAAATA

2961 V W R T P E I Q R S R Y L V H S I R P D  
8881 GTTTGGAGGACACCAGAGATACAACGAAGTAGGTATCTAGTACATTCAATTAGACCTGAT

2981 A G Q N K H N P I N L D V A S A I R A G  
8941 GCAGGTCAAACAAGCATAACCCAATTAATCTGGACGTTGCATCTGCAATACGAGCTGGT

3001 L I D K E T G Q M L F T H S V **Y E S P** F  
9001 CTAATTGACAAAGAAACCGGTCAAATGTTGTTTACACATTCTGTT**TACGAGTCACCA**TTT

3021 S T D S P I S K K G D S S S D Q T E R L  
9061 AGTACTGATTACCCGATAAGTAAAAAAGGTGATAGTAGCTCTGACCAAACCTGAACGATTG

3041 S V R E A I V R G F L V A E L I E P E S  
9121 TCAGTCAGAGAAGCAATTGTACGTGGATTTTTAGTTGCGGAATTAATAGAACCAGAATCA

3061 S Y I T K Q S L P F I V P S T S Y S H S  
9181 TCGTATATAACAAAGCAAAGTTTACCATTTATTGTTCCAAGTACAAGTTATTACACTCT

3081 P T D V D I -  
9241 CCAACTGATGTTGACATTT**TGA**

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Der humanpathogene Parasit *Schistosoma mansoni* zeigt ein im Tierreich nahezu einmaliges biologisches Phänomen - die vom Männchen induzierte und aufrechterhaltene sexuelle Maturation des Weibchens. Während der Paarung werden vom Männchen Signalkaskaden im Weibchen initiiert, welche Proliferations- und Differenzierungsprozesse in den Reproduktionsorganen Ovar und Vitellarium steuern.

Um die zugrunde liegenden molekularen Prozesse besser zu verstehen, wurden in unserer Arbeitsgruppe Gene kloniert und charakterisiert, die für Signaltransduktionsmoleküle kodieren. Darunter befand sich die zelluläre Syk-Tyrosinkinase SmTK4, die Yeast Three-Hybrid Analysen zur Folge über ihre Tandem-SH2-Domäne in Phosphorylierungs-abhängiger Weise an die neu entdeckte Src-Kinase SmTK6, sowie schwächer auch an die bereits bekannte Src-Kinase SmTK3 binden kann. Da darüber hinaus die Transkripte der drei Kinasegene im Ovar und den Testes co-lokalisieren, wurden Interaktionen ihrer Translationsprodukte in diesen Geweben angenommen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die vermutete Interaktion von SmTK4 und SmTK6 über Co-Immunopräzipitationsexperimente bestätigt werden. Über Yeast Two/Three-Hybrid Analysen wurde für SmTK6 ebenfalls eine Interaktion mit der Src-Kinase SmTK3 nachgewiesen. Daher wurde postuliert, dass die drei cytoplasmatischen Tyrosinkinasen SmTK3, SmTK4 und SmTK6 möglicherweise an der Innenseite der Cytoplasmamembran in Form eines Kinasekomplexes vorliegen. Weiterhin wurde über Yeast Two-Hybrid Analysen ein neues, transmembranes Mucin identifiziert, dessen C-Terminus mit der SH2-Domäne der Src-Kinase SmTK6 interagiert.

Als potentielle *upstream* - Interaktionspartner des postulierten Kinasekomplexes wurden der in dieser Arbeit entdeckte Integrinrezeptor Sm $\beta$ -Int1 sowie die Rezeptor-tyrosinkinase SmRTK1 gefunden, die von Dr. Colette Dissous (Institute Pasteur, Lille) zuvor bereits kloniert und zur Verfügung gestellt worden war. Quantitativen Yeast Two-Hybrid Analysen zur Folge konnten die drei Tyrosinkinasen SmTK3, SmTK4 und SmTK6 über ihre Protein-Interaktionsdomänen in unterschiedlicher Stärke an die jeweiligen intrazellulären C-Termini dieser Rezeptoren binden, wobei SmTK3 die stärkste Bindung an Sm $\beta$ -Int1 und SmTK6 die stärkste Bindung an SmRTK1 aufwies.

Aufgrund der identifizierten Interaktionen von Sm $\beta$ -Int1 und SmRTK1 mit SmTK3, SmTK4 bzw. SmTK6 und der Co-Lokalisation ihrer Gentranskripte im Ovar und den Testes adulter *S. mansoni*, ist in der vorliegenden Arbeit eine multifaktorielle Signalkaskade in diesen Geweben postuliert worden. Die Kooperation von Sm $\beta$ -Int1 mit SmRTK1 und/oder

dem transmembranen Mucin führt zur Aktivierung von SmTK6, an deren Regulation vermutlich auch SmTK3 beteiligt ist. Durch die aktive SmTK6 wird SmTK4 rekrutiert und aktiviert, die ihrerseits bislang noch unbekannte *downstream*-Effektormoleküle phosphoryliert. Als ein potentieller *downstream*-Bindungspartner konnte bereits das Hitzeschockprotein-Homolog Smp40 identifiziert werden, dessen Rolle vermutlich die stabilisierende Bindung der inaktiven cytoplasmatischen SmTK4 ist.

Um Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der Signalwege zu erhalten, in die SmTK4 involviert ist, wurden Inhibitor- und RNAi-Experimente durchgeführt. Mit Hilfe einer für diesen Zweck optimierten *whole mount*-Färbetechnik in Verbindung mit konfokaler Mikroskopie gelang der Nachweis phänotypischer Veränderungen in den Reproduktionsorganen Ovar und Testes adulter Schistosomen, die entweder mit dem Syk-Kinase-spezifischen Inhibitor Piceatannol oder mit SmTK4-spezifischen dsRNA-Molekülen behandelt worden waren. Mit beiden Ansätzen wurden übereinstimmende Effekte auf die Spermatogenese (Ausbleiben reifer, elongierter Spermien) und die Oogenese (erhöhte Anzahl maturer Oocyten bei gleichzeitiger Verringerung immaturer Oogonien) festgestellt.

In parallel durchgeführten Experimenten zur Charakterisierung eines Promotors von *S. mansoni*, der möglicherweise konstitutiv aktiv ist, wurden über 3 kb der 5'-Region des Kandidatengens Aktin (SmAct1) *in silico* identifiziert. Bis zu 1,5 kb große Varianten der 5'-Region wurden für die Konstruktion von GFP-Reportergenvektoren verwendet und in Particle Bombardment-Experimenten zur Erzeugung transient transgener Schistosomen eingesetzt. Konfokal-mikroskopische Untersuchungen sowie molekulare Analysen über RT-PCRs haben gezeigt, dass ein 445 bp-Fragment der SmAct1-5'-Region für eine Transkriptionsinitiation in Adulten wie auch in Larven von *S. mansoni* ausreicht. In der 5'-Region des SmAct1-Gens wurde eine für Promotoren von Aktin-Genen charakteristische Anordnung aus TATA-, CArG- und CAAT-Boxen identifiziert, welche zwischen Invertebraten und Vertebraten funktionell konserviert zu sein scheint. Das begrenzte gewebespezifische Auftreten von GFP-Signalen in Tegument, Parenchym und Muskeln von Adulten sowie in verschiedenen, aber nicht allen Geweben von Sporocysten deutet darauf hin, dass es sich bei SmAct1 entgegen der vorausgehenden Annahme nicht um ein konstitutiv exprimiertes Gen handelt.

## ABSTRACT

The human parasite *Schistosoma mansoni* shows a nearly unique biological phenomenon - the male induces and maintains the sexual maturation of the female. During pairing, the male activates signal transduction pathways in the female, which govern proliferation and differentiation in the reproductive organs ovary and vitellarium.

To better understand the underlying molecular processes, several genes encoding signal transduction molecules were identified and characterized in our work group. Among these the Syk-family kinase SmTK4 was found, which interacts in a phosphorylation-dependent manner with the newly identified Src-kinase SmTK6 and also but weaker with the known Src-kinase SmTK3, as indicated by yeast three-hybrid analyses. Since the transcripts of the three kinase genes co-localize in the ovary and testes, interactions of the translation products were assumed in these tissues.

In this thesis, the postulated interaction of SmTK4 and SmTK6 could be confirmed by co-immunoprecipitation experiments. By yeast two/three-hybrid analyses, an interaction of SmTK6 with SmTK3 could be shown as well. Thus, it was postulated that the three cytoplasmatic tyrosine kinases SmTK3, SmTK4 and SmTK6 probably form a kinase complex located at the cytoplasmatic site of the cell membrane. Furthermore, by the yeast two-hybrid analyses a new transmembrane mucin-like protein was identified, whose C-terminal part interacts with the SH2-domain of the Src-kinase SmTK6.

Putative upstream interaction partners of the postulated kinase complex are the integrine receptor Sm $\beta$ -Int1, which was detected in this thesis, and the receptor tyrosine kinase SmRTK1, which was cloned and provided by Dr. Colette Dissous (Institute Pasteur, Lille). According to quantitative yeast two-hybrid analyses all three tyrosine kinases SmTK3, SmTK4 and SmTK6 were able to bind with different affinities to the respective intracellular parts of both receptors by their protein-interaction domains. SmTK3 revealed strongest binding to Sm $\beta$ -Int1, whereas SmTK6 was the strongest binding partner of SmRTK1.

Due to the identified interactions of Sm $\beta$ -Int1 and SmRTK1 with SmTK3, SmTK4 or SmTK6, and on the basis of the co-localization of their gene transcripts in the ovary and the testes of adult *S. mansoni*, a multifactorial signaling cascade was postulated in these tissues. The interplay of Sm $\beta$ -Int1 with SmRTK1 and/or the transmembrane mucin leads to the activation of SmTK6, a process in which SmTK3 is probably also involved. Activated SmTK6 recruits and activates SmTK4, which phosphorylates so far unknown downstream effector molecules. As one potential downstream binding partner, the heat shock protein

homologue Smp40 was identified, which probably stabilizes the inactive cytoplasmatic SmTK4.

To elucidate the function of signaling pathways SmTK4 is involved in, inhibitor studies and RNAi experiments were performed. Using an optimized whole-mount staining technique in combination with confocal microscopy, phenotypical changes were detected in the reproductive organs ovary and testes of adult schistosomes, which were treated with Piceatannol (Syk-kinase specific inhibitor) or dsRNA (SmTK4-specific). With both approaches corresponding effects on spermatogenesis (absence of mature, elongated sperms) and oogenesis (increased number of mature oocytes and simultaneous decrease in immature oogonia) were discovered.

In parallel experiments aiming to characterize a promoter of *S. mansoni*, which may be constitutively active, about 3 kb of the 5' region of the candidate gene actin (SmAct1) were identified *in silico*. Fragments up to 1.5 kb of this 5' region were used for the construction of GFP reporter-gene vectors and employed in particle bombardment experiments to generate transiently transgenic schistosomes. A 445 bp fragment was found to be sufficient for transcription initiation in adults or larvae from *S. mansoni* as confirmed by confocal microscopy and RT-PCR experiments. An actin-gene characteristic assembly of TATA, CArG, and CAAT boxes was identified, which seems to be functionally conserved between vertebrates and invertebrates. The tissue-specific appearance of GFP signals in the tegument, parenchyma and muscles of adults as well as in several, but not all tissues of sporocysts, indicated that contrary to first assumptions the SmAct1 gene is not constitutively expressed.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, M.K., Cain, G.D. (1989)** Analysis of isoforms of actin from *Schistosoma mansoni* by two-dimensional gel electrophoresis. *Parasitol. Res.* 76(2): 178 - 180
- Abelson, J. (1992)** Recognition of tRNA precursors: a role for the intron. *Science* 255(5050): 1390
- Al Masri, A., Gendler, S.J. (2005)** Mucl affects c-Src signaling in PyV MT-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene* 24(38): 5799 - 5808
- Alger, H.M., Sayed, A.A., Stadecker, M.J., Williams, D.L. (2002)** Molecular and enzymatic characterisation of *Schistosoma mansoni* thioredoxin. *Int J. Parasitol.* 32(10): 1285 - 1292
- Arderiu, G., Diaz-Ricart, M., Buckley, B., Escolar, G., Ordinas, A. (2002)** Primary arrest of circulating platelets on collagen involves phosphorylation of Syk, cortactin and focal adhesion kinase: studies under flow conditions. *Biochem. J.* 364(Pt 1): 65 - 71
- Arias-Salgado, E.G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J.S., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J. (2003)** Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100(23): 13298 - 13302
- Arias-Salgado, E.G., Lizano, S., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H. (2005)** Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin beta cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 280(33): 29699 - 29707
- Armstrong, J.C. (1965)** Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *J. Parasitol.* 51: 605 - 616
- Arnaut, M.A., Goodman, S.L., Xiong, J.P. (2007)** Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19(5): 495 - 507
- Ashton, P.D., Curwen, R.S., Wilson, R.A. (2001)** Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. *Trends Parasitol.* 17(4): 198 - 202
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2006)** *Current Protocols in Molecular Biology*. Volume 1-5, John Wiley & Sons, Inc.
- Bahia, D., Andrade, L.F., Ludolf, F., Mortara, R.A., Oliveira, G. (2006)** Protein tyrosine kinases in *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 Suppl 1: 137 - 143
- Baranyovits, F.L.C. (1978)** Cochineal carmine: an ancient dye with a modern role. *Endeavour* 2: 85 - 92
- Bartis, D., Boldizar, F., Kvell, K., Szabo, M., Palinkas, L., Nemeth, P., Monostori, E., Berki, T. (2007)** Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354(1): 253 - 258

- Beall, M.J., McGonigle, S., Pearce, E.J. (2000)** Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF-beta signaling. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111(1): 131 - 142
- Beckmann, S. (2005)** Analyse von Promotoren mit Reportergenkonstrukten und Suche nach Interaktionspartnern von Tyrosinkinase in *Schistosoma mansoni*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Beckmann, S., Wippersteg, V., El-Bahay, A., Hirzmann, J., Oliveira, G., Grevelding, C.G. (2007)** *Schistosoma mansoni*: Germ-line transformation approaches and actin-promoter analysis. *Exp. Parasitol.* 117(3): 292 - 303
- Belaguli, N.S., Sepulveda, J.L., Nigam, V., Charron, F., Nemer, M., Schwartz, R.J. (2000)** Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators. *Mol. Cell Biol.* 20(20): 7550 - 7558
- Bellier, S., Dubois, M.F., Nishida, E., Almouzni, G., Bensaude, O. (1997)** Phosphorylation of the RNA polymerase II largest subunit during *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Mol. Cell Biol.* 17(3): 1434 - 1440
- Bennett, J.L., Day, T., Liang, F.T., Ismail, M., Farghaly, A. (1997)** The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. *Exp. Parasitol.* 87(3): 260 - 267
- Bergquist, R., Al-Sherbiny, M., Barakat, R., Olds, R. (2002)** Blueprint for schistosomiasis vaccine development. *Acta Trop.* 82(2): 183 - 192
- Berton, G., Mocsai, A., Lowell, C.A. (2005)** Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends Immunol.* 26(4): 208 - 214
- Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S. (1999)** Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294(5): 1351 - 1362
- Boggon, T.J., Eck, M.J. (2004)** Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23(48): 7918 - 7927
- Boyle, J.P., Wu, X.J., Shoemaker, C.B., Yoshino, T.P. (2003)** Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128(2): 205 - 215
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 - 254
- Braschi, S., Curwen, R.S., Ashton, P.D., Verjovski-Almeida, S., Wilson, A. (2006)** The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics.* 6(5): 1471 - 1482
- Braschi, S., Wilson, R.A. (2006)** Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Mol. Cell Proteomics.* 5(2): 347 - 356

- Brasher, B.B., Roumiantsev, S., Van Etten, R.A. (2001)** Mutational analysis of the regulatory function of the c-Abl Src homology 3 domain. *Oncogene* 20(53): 7744 - 7752
- Braydich-Stolle, L., Kostereva, N., Dym, M., Hofmann, M.C. (2007)** Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev. Biol.* 304(1): 34 - 45
- Breeden, L., Nasmyth, K. (1985)** Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50: 643 - 650
- Brinkmann, U., Mattes, R.E., Buckel, P. (1989)** High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* 85(1): 109 - 114
- Bromann, P.A., Korkaya, H., Courtneidge, S.A. (2004)** The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23(48): 7957 - 7968
- Brown, M.T., Cooper, J.A. (1996)** Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1287(2-3): 121 - 149
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987)** XL1-Blue: A high efficiency transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -Galactosidase selection. *Biotechniques*: 376 - 380
- Burglin, T.R., Barnes, T.M. (1992)** Introns in sequence tags. *Nature* 357(6377): 367 - 368
- Busek, S.U., Fantappie, M., Malaquias, L.C., Wilson, R.A., Correa-Oliveira, R., Oliveira, G.C. (2002)** Cis-acting elements, CARG-, E-, CCAAT- and TATA-boxes may be involved in sexually regulated gene expression in *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97 Suppl 1: 85 - 90
- Calderwood, S.K., Mambula, S.S., Gray, P.J., Jr., Theriault, J.R. (2007)** Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett.* 581(19): 3689 - 3694
- Castro, J.E., Prada, C.E., Loria, O., Kamal, A., Chen, L., Burrows, F.J., Kipps, T.J. (2005)** ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106(7): 2506 - 2512
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994)** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148): 802 - 805
- Chan, B., Lanyi, A., Song, H.K., Griesbach, J., Simarro-Grande, M., Poy, F., Howie, D., Sumegi, J., Terhorst, C., Eck, M.J. (2003)** SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat. Cell Biol.* 5(2): 155 - 160
- Chen, L.L., Rekosh, D.M., LoVerde, P.T. (1992)** *Schistosoma mansoni* p48 eggshell protein gene: characterization, developmentally regulated expression and comparison to the p14 eggshell protein gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52(1): 39 - 52
- Cheng, G.F., Lin, J.J., Feng, X.G., Fu, Z.Q., Jin, Y.M., Yuan, C.X., Zhou, Y.C., Cai, Y.M. (2005)** Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. *Proteomics*. 5(2): 511 - 521

- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., Fields, S. (1991)** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 88(21): 9578 - 9582
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L. (2000)** The global status of schistosomiasis and its control. Acta Trop. 77(1): 41 - 51
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L. (2003)** Praziquantel. Parasitol. Res. 90 Supp 1: S3 - S9
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., Archer, S. (1993)** Drug resistance in schistosomes. Parasitol. Today 9(5): 162 - 166
- Clough, E.R. (1981)** Morphology and reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. J. Parasitol. 67(4): 535 - 539
- Cole, P.A., Shen, K., Qiao, Y., Wang, D. (2003)** Protein tyrosine kinases Src and Csk: a tail's tale. Curr. Opin. Chem. Biol. 7(5): 580 - 585
- Cook, T., Urrutia, R. (2000)** TIEG proteins join the Smads as TGF-beta-regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol 278(4): G513 - G521
- Cooper, J.A., Howell, B. (1993)** The when and how of Src regulation. Cell 73(6): 1051 - 1054
- Correnti, J.M., Brindley, P.J., Pearce, E.J. (2005)** Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth. Mol. Biochem. Parasitol. 143(2): 209 - 215
- Correnti, J.M., Jung, E., Freitas, T.C., Pearce, E.J. (2007)** Transfection of *Schistosoma mansoni* by electroporation and the description of a new promoter sequence for transgene expression. Int. J. Parasitol. 37(10): 1107 - 1115
- Correnti, J.M., Pearce, E.J. (2004)** Transgene expression in *Schistosoma mansoni*: introduction of RNA into schistosomula by electroporation. Mol. Biochem. Parasitol. 137(1): 75 - 79
- Curwen, R.S., Ashton, P.D., Johnston, D.A., Wilson, R.A. (2004)** The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. Mol. Biochem. Parasitol. 138(1): 57 - 66
- Daly, R.J. (2004)** Cortactin signalling and dynamic actin networks. Biochem. J. 382(Pt 1): 13 - 25
- Dapson, R.W. (2007)** The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. Biotech. Histochem. 82(4): 173 - 187
- Davies, S.J., Shoemaker, C.B., Pearce, E.J. (1998)** A divergent member of the transforming growth factor beta receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. J. Biol. Chem. 273(18): 11234 - 11240
- Davis, A.H., Blanton, R., Klich, P. (1985)** Stage and sex specific differences in actin gene expression in *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 17(3): 289 - 298

- Davis, R.E., Parra, A., LoVerde, P.T., Ribeiro, E., Glorioso, G., Hodgson, S. (1999)** Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96(15): 8687 - 8692
- Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C.R., Lim, K.C., Dvorak, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C., McKerrow, J.H. (2006)** A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J. Biol. Chem.* 281(51): 39316 - 39329
- Dettman, C.D., Higgins-Opitz, S.B., Saikoolal, A. (1989)** Enhanced efficacy of the paddling method for schistosome infection of rodents by a four-step pre-soaking procedure. *Parasitol. Res.* 76(2): 183 - 184
- Dissous, C., Ahier, A., Khayath, N. (2007)** Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *Bioessays* 29(12): 1281 - 1288
- Dissous, C., Khayath, N., Vicogne, J., Capron, M. (2006)** Growth factor receptors in helminth parasites: signalling and host-parasite relationships. *FEBS Lett.* 580(12): 2968 - 2975
- Doenhoff, M.J., Kusel, J.R., Coles, G.C., Cioli, D. (2002)** Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96(5): 465 - 469
- Drickamer, K., Taylor, M.E. (2002)** Glycan arrays for functional glycomics. *Genome Biol.* 3(12): Reviews1034
- Druker, B.J., Lydon, N.B. (2000)** Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest* 105(1): 3 - 7
- Eberl, M., Langermans, J.A., Vervenne, R.A., Nyame, A.K., Cummings, R.D., Thomas, A.W., Coulson, P.S., Wilson, R.A. (2001)** Antibodies to glycans dominate the host response to schistosome larvae and eggs: is their role protective or subversive? *J. Infect. Dis.* 183(8): 1238 - 1247
- El Bahay, A. (2003)** Identifizierung und Charakterisierung von Promotoren aus *Schistosoma mansoni* und Experimente zur Etablierung einer Zellkultur. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Engels, D., Chitsulo, L., Montresor, A., Savioli, L. (2002)** The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.* 82(2): 139 - 146
- Erasmus, D.A. (1973)** A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 67(2): 165 - 183
- Fantappie, M.R., Freebern, W.J., Osman, A., LaDuca, J., Niles, E.G., LoVerde, P.T. (2001)** Evaluation of *Schistosoma mansoni* retinoid X receptor (SmRXR1 and SmRXR2) activity and tissue distribution. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115(1): 87 - 99
- Ferrante, A.W., Reinke, R., Stanley, E.R. (1995)** Shark, a Src homology 2, ankyrin repeat, tyrosine kinase, is expressed on the apical surfaces of ectodermal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92(6): 1911 - 1915

- Fields, S., Sternglanz, R. (1994)** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10(8): 286 - 292
- Finken, M., Sobek, A., Symmons, P., Kunz, W. (1994)** Characterization of the complete protein disulfide isomerase gene of *Schistosoma mansoni* and identification of the tissues of its expression. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64(1): 135 - 144
- Fitzpatrick, J.M., Hoffmann, K.F. (2006)** Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing. *Int. J. Parasitol.* 36(10-11): 1081 - 1089
- Fitzpatrick, J.M., Johnston, D.A., Williams, G.W., Williams, D.J., Freeman, T.C., Dunne, D.W., Hoffmann, K.F. (2005)** An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. *Mol. Biochem. Parasitol.* 141(1): 1 - 13
- Forrester, S.G., Warfel, P.W., Pearce, E.J. (2004)** Tegumental expression of a novel type II receptor serine/threonine kinase (SmRK2) in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 136(2): 149 - 156
- Frech, K., Quandt, K., Werner, T. (1998)** Muscle actin genes: a first step towards computational classification of tissue specific promoters. *In Silico. Biol.* 1(1): 29 - 38
- Frederickson, R.M., Micheau, M.R., Iwamoto, A., Miyamoto, N.G. (1989)** 5' flanking and first intron sequences of the human beta-actin gene required for efficient promoter activity. *Nucleic Acids Res.* 17(1): 253 - 270
- Freebern, W.J., Niles, E.G., LoVerde, P.T. (1999a)** RXR-2, a member of the retinoid x receptor family in *Schistosoma mansoni*. *Gene* 233(1-2): 33 - 38
- Freebern, W.J., Osman, A., Niles, E.G., Christen, L., LoVerde, P.T. (1999b)** Identification of a cDNA encoding a retinoid X receptor homologue from *Schistosoma mansoni*. Evidence for a role in female-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 274(8): 4577 - 4585
- Furlong, M.T., Mahrenholz, A.M., Kim, K.H., Ashendel, C.L., Harrison, M.L., Geahlen, R.L. (1997)** Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochim. Biophys. Acta* 1355(2): 177 - 190
- Gallet, C., Rosa, J.P., Habib, A., Leuret, M., Levy-Toledano, S., Maclouf, J. (1999)** Tyrosine phosphorylation of cortactin associated with Syk accompanies thromboxane analogue-induced platelet shape change. *J. Biol. Chem.* 274(33): 23610 - 23616
- Geahlen, R.L. (2007)** Syk. UCSD-Nature Molecule Pages (doi:10.1038/mp.a000040.01)
- Geahlen, R.L., Burg, D.L. (1994)** The role of Syk in cell signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 365: 103 - 109
- Geahlen, R.L., McLaughlin, J.L. (1989)** Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165(1): 241 - 245

- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M. (2001)** Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2(11): 793 - 805
- Geldhof, P., Visser, A., Clark, D., Saunders, G., Britton, C., Gilleard, J., Berriman, M., Knox, D. (2007)** RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. *Parasitology* 134(Pt 5): 609 - 619
- Gilbert, W. (1978)** Why genes in pieces? *Nature* 271(5645): 501
- Gillespie, M.A., Rudnicki, M.A. (2004)** Something to SNF about. *Nat. Genet.* 36(7): 676 - 677
- Gönnert, R. (1955)** Schistosomiasis studies. I. Contributions to the anatomy and histology of *Schistosoma mansoni*. *Z. Tropenmed. Parasitol.* 6(1): 18 - 33
- Gould, R.J., Polokoff, M.A., Friedman, P.A., Huang, T.F., Holt, J.C., Cook, J.J., Niewiarowski, S. (1990)** Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195(2): 168 - 171
- Grevelding, C.G. (1995)** The female-specific W1 sequence of the Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* occurs in both genders of a Liberian strain. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71(2): 269 - 272
- Grevelding, C.G., Sommer, G., Kunz, W. (1997)** Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. *Parasitology* 115 ( Pt 6) 635 - 640
- Grichnik, J.M., Bergsma, D.J., Schwartz, R.J. (1986)** Tissue restricted and stage specific transcription is maintained within 411 nucleotides flanking the 5' end of the chicken alpha-skeletal actin gene. *Nucleic Acids Res.* 14(4): 1683 - 1701
- Guo, W., Giacotti, F.G. (2004)** Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(10): 816 - 826
- Gutch, M.J., Flint, A.J., Keller, J., Tonks, N.K., Hengartner, M.O. (1998)** The *Caenorhabditis elegans* SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase PTP-2 participates in signal transduction during oogenesis and vulval development. *Genes Dev.* 12(4): 571 - 585
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4): 557 - 580
- Hancock, K., Tsang, V.C. (1983)** India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* 133(1): 157 - 162
- Harrison, S.C. (2003)** Variation on an Src-like theme. *Cell* 112(6): 737 - 740
- Heinemeyer, T., Chen, X., Karas, H., Kel, A.E., Kel, O.V., Liebich, I., Meinhardt, T., Reuter, I., Schacherer, F., Wingender, E. (1999)** Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 27(1): 318 - 322
- Hoffmann, K.F., Johnston, D.A., Dunne, D.W. (2002)** Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling. *Genome Biol.* 3(8): Research0041

- Hofmann, K., Stoffel, W. (1993)** TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 166
- Hokke, C.H., Deelder, A.M., Hoffmann, K.F., Wuhrer, M. (2007)** Glycomics-driven discoveries in schistosoma research. Exp. Parasitol. 117(3): 275 - 283
- Hollingsworth, M.A., Swanson, B.J. (2004)** Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. Nat. Rev. Cancer 4(1): 45 - 60
- Hombria, J.C., Sotillos, S. (2006)** JAK/STAT signalling: STAT cannot play with Ken and Barbie. Curr. Biol. 16(3): R98 - 100
- Hou, S.X., Zheng, Z., Chen, X., Perrimon, N. (2002)** The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. Dev. Cell 3(6): 765 - 778
- Hsia, D.A., Lim, S.T., Bernard-Trifilo, J.A., Mitra, S.K., Tanaka, S., den, H.J., Streblov, D.N., Ilic, D., Ginsberg, M.H., Schlaepfer, D.D. (2005)** Integrin alpha4beta1 promotes focal adhesion kinase-independent cell motility via alpha4 cytoplasmic domain-specific activation of c-Src. Mol. Cell Biol. 25(21): 9700 - 9712
- Hsiao, C.D., Hsieh, F.J., Tsai, H.J. (2001)** Enhanced expression and stable transmission of transgenes flanked by inverted terminal repeats from adeno-associated virus in zebrafish. Dev. Dyn. 220(4): 323 - 336
- Hu, B., Wu, Z., Jin, H., Hashimoto, N., Liu, T., Phan, S.H. (2004)** CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms and the regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression by IL-1 beta. J. Immunol. 173(7): 4661 - 4668
- Hubbard, S.R., Till, J.H. (2000)** Protein tyrosine kinase structure and function. Annu. Rev. Biochem. 69: 373 - 398
- Hynes, R.O. (1987)** Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 48(4): 549 - 554
- Ivics, Z., Hackett, P.B., Plasterk, R.H., Izsvak, Z. (1997)** Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. Cell 91(4): 501 - 510
- Jacobson, G., Karsnas, P. (1990)** Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer. Electrophoresis 11(1): 46 - 52
- James, P., Halladay, J., Craig, E.A. (1996)** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. Genetics 144(4): 1425 - 1436
- Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D.L., Corliss, B.C., Vivier, E., Hong-Geller, E., Wei, S., Djeu, J.Y. (2002)** Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. J. Immunol. 168(7): 3155 - 3164
- Kampkötter, A., Ridgers, I., Johnston, D.A., Rollinson, D., Kunz, W., Grevelding, C.G. (1999)** *Schistosoma mansoni*: cloning and characterization of the Ras homologue. Exp. Parasitol. 91(3): 280 - 283

- Kapp, K., Knobloch, J., Schüssler, P., Sroka, S., Lammers, R., Kunz, W., Grevelding, C.G. (2004)** The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138(2): 171 - 182
- Kapp, K., Schüssler, P., Kunz, W., Grevelding, C.G. (2001)** Identification, isolation and characterization of a Fyn-like tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 122(Pt 3): 317 - 327
- Keshvara, L.M., Isaacson, C.C., Yankee, T.M., Sarac, R., Harrison, M.L., Geahlen, R.L. (1998)** Syk- and Lyn-dependent phosphorylation of Syk on multiple tyrosines following B cell activation includes a site that negatively regulates signaling. *J. Immunol.* 161(10): 5276 - 5283
- Kierszenbaum, A.L. (2006)** Tyrosine protein kinases and spermatogenesis: truncation matters. *Mol. Reprod. Dev.* 73(4): 399 - 403
- Kines, K.J., Mann, V.H., Morales, M.E., Shelby, B.D., Kalinna, B.H., Gobert, G.N., Chirgwin, S.R., Brindley, P.J. (2006)** Transduction of *Schistosoma mansoni* by vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped Moloney murine leukemia retrovirus. *Exp. Parasitol.* 112(4): 209 - 220
- Kinoshita, M., Yamauchi, M., Sasanuma, M., Ishikawa, Y., Osada, T., Inoue, K., Wakamatsu, Y., Ozato, K. (2003)** A transgene and its expression profile are stably transmitted to offspring in transgenic medaka generated by the particle gun method. *Zoolog. Sci.* 20(7): 869 - 875
- Kitajima, E.W., Paraense, W.L., Correa, L.R. (1976)** The fine structure of *Schistosoma mansoni* sperm (Trematoda: Digenea). *J. Parasitol.* 62(2): 215 - 221
- Klingenhoff, A., Frech, K., Werner, T. (2002)** Regulatory modules shared within gene classes as well as across gene classes can be detected by the same *in silico* approach. *In Silico. Biol.* 2(1): S17 - S26
- Knippers, R. (2001)** Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 8. neu bearbeitete Auflage
- Knobloch, J. (2002)** Lokalisations- und Inhibierungsstudien dreier Protein-Tyrosinkinase und die Isolierung eines Interaktionspartners der Src-Tyrosinkinase SmTK3 bei *Schistosoma mansoni*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Knobloch, J., Beckmann, S., Burmeister, C., Quack, T., Grevelding, C.G. (2007)** Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 117(3): 318 - 336
- Knobloch, J., Kunz, W., Grevelding, C.G. (2006)** Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 36(12): 1261 - 1272
- Knobloch, J., Kunz, W., Grevelding, C.G. (2002a)** Quantification of DNA synthesis in multicellular organisms by a combined DAPI and BrdU technique. *Dev. Growth Differ.* 44(6): 559 - 563
- Knobloch, J., Rossi, A., Osman, A., LoVerde, P.T., Klinkert, M.Q., Grevelding, C.G. (2004)** Cytological and biochemical evidence for a gonad-preferential interplay of SmFKBP12 and SmTbetaR-I in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138(2): 227 - 236

- Knobloch, J., Winnen, R., Quack, M., Kunz, W., Greveling, C.G. (2002b)** A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene* 294(1-2): 87 - 97
- Köster, B., Dargatz, H., Schroder, J., Hirzmann, J., Haarmann, C., Symmons, P., Kunz, W. (1988)** Identification and localisation of the products of a putative eggshell precursor gene in the vitellarium of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31(2): 183 - 198
- Krauss, G. (1997)** Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. VCH Verlagsgesellschaft mbH
- Krautz-Peterson, G., Radwanska, M., Ndegwa, D., Shoemaker, C.B., Skelly, P.J. (2007)** Optimizing gene suppression in schistosomes using RNA interference. *Mol. Biochem. Parasitol.* 153(2): 194 - 202
- Kunz, W. (2001)** Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. *Trends Parasitol.* 17(5): 227 - 231
- Kurosaki, T., Takata, M., Yamanashi, Y., Inazu, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T., Yamamura, H. (1994)** Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* 179(5): 1725 - 1729
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680 - 685
- Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H., Vilaire, G., Litvinov, R., Nagasami, C., Weisel, J.W., Lear, J.D., DeGrado, W.F., Bennett, J.S. (2003)** Activation of integrin  $\alpha 5\beta 3$  by modulation of transmembrane helix associations. *Science* 300(5620): 795 - 798
- Li, Y., Kuwahara, H., Ren, J., Wen, G., Kufe, D. (2001)** The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 beta and beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 276(9): 6061 - 6064
- Linfor, J., Berger, T. (2000)** Potential role of  $\alpha 5\beta 1$  and  $\beta 1$  integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 120(1): 65 - 72
- Liu, X., Brodeur, S.R., Gish, G., Songyang, Z., Cantley, L.C., Laudano, A.P., Pawson, T. (1993)** Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene* 8(5): 1119 - 1126
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. (2001)** Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akad. Vlg. Hdg. 4. Auflage
- Lottspeich, F., Zorbach, H.H. (1998)** Bioanalytik. Spektrum Akad. Vlg.
- LoVerde, P.T. (2002)** Presidential address. Sex and schistosomes: an interesting biological interplay with control implications. *J. Parasitol.* 88(1): 3 - 13
- LoVerde, P.T., Niles, E.G., Osman, A., Wu, W. (2004)** *Schistosoma mansoni* male-female interactions. (82): 357 - 374

- LoVerde, P.T., Osman, A., Hinck, A. (2007)** *Schistosoma mansoni*: TGF-beta signaling pathways. *Exp. Parasitol.* 117(3): 304 - 317
- Luo, B.H., Carman, C.V., Springer, T.A. (2007)** Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25 619 - 647
- MacGregor, A.N., Shore, S.J. (1990)** Immunocytochemistry of cytoskeletal proteins in adult *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 20(3): 279 - 284
- Machado-Silva, J.R., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H.L., Gomes, D.C. (1998)** Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93 Suppl 1: 303 - 307
- MacKenzie, D.R., Anderson, P.M., Wernham, C.C. (1966)** A mobile air blast inoculator for plot experiments with maize dwarf mosaic virus. *Plant Dis. Rep.* 50 363 - 367
- Mann, V.H., Morales, M.E., Kines, K.J., Brindley, P.J. (2007)** Transgenesis of schistosomes: approaches employing mobile genetic elements. *Parasitology*: 1 - 13
- Mansir, A., Justine, J.L. (1998)** The microtubular system and posttranslationally modified tubulin during spermatogenesis in a parasitic nematode with amoeboid and aflagellate spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 49(2): 150 - 167
- Marshak, D.R., Kadonaga, J.T., Burgess, R.R., Knuth, M.W., Brennan, W.A., Lin, S.H. (1995)** Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U. S.
- Marston, D.J., Goldstein, B. (2006)** Actin-based forces driving embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16(4): 392 - 398
- Maruyama, S., Kurosaki, T., Sada, K., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., Yamamura, H. (1996)** Physical and functional association of cortactin with Syk in human leukemic cell line K562. *J. Biol. Chem.* 271(12): 6631 - 6635
- Matchmaker Library Construction & Screening Kit User Manual (2001)** Clontech Laboratories, Inc., [www.clontech.com](http://www.clontech.com)
- Mayer, D.A., Fried, B. (2002)** Aspects of human parasites in which surgical intervention may be important. *Adv. Parasitol.* 51: 1 - 94
- McKnight, S.L. (2001)** McBindall - a better name for CCAAT/enhancer binding proteins? *Cell* 107(3): 259 - 261
- Mehlhorn, H., Piekarski, G. (1998)** Grundriß der Parasitenkunde. 5. , überarb. und erw. Aufl. - Gustav Fischer Verlag
- Menrath, M., Michel, A., Kunz, W. (1995)** A female-specific cDNA sequence of *Schistosoma mansoni* encoding a mucin-like protein that is expressed in the epithelial cells of the reproductive duct. *Parasitology* 111 (Pt 4): 477 - 483

- Merrick, J.M., Osman, A., Tsai, J., Quackenbush, J., LoVerde, P.T., Lee, N.H. (2003)** The *Schistosoma mansoni* gene index: gene discovery and biology by reconstruction and analysis of expressed gene sequences. *J. Parasitol.* 89(2): 261 - 269
- Michel, A., Knobloch, J., Kunz, W. (2003)** P19: a female and tissue specifically expressed gene in *Schistosoma mansoni*, regulated by pairing with the male. *Parasitology* 127(Pt 6): 519 - 524
- Miller, J.H. (1972)** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Miller, J.H. (1992)** In A Short Course in Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Miller, L.A., Hong, J.J., Kinch, M.S., Harrison, M.L., Geahlen, R.L. (1999)** The engagement of beta1 integrins on promonocytic cells promotes phosphorylation of Syk and formation of a protein complex containing Lyn and beta1 integrin. *Eur. J. Immunol.* 29(5): 1426 - 1434
- Miralles, F., Visa, N. (2006)** Actin in transcription and transcription regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18(3): 261 - 266
- Mitra, S.K., Schlaepfer, D.D. (2006)** Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18(5): 516 - 523
- Moon, K.D., Post, C.B., Durden, D.L., Zhou, Q., De, P., Harrison, M.L., Geahlen, R.L. (2005)** Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 280(2): 1543 - 1551
- Morales, M.E., Mann, V.H., Kines, K.J., Gobert, G.N., Fraser, M.J., Jr., Kalinna, B.H., Correnti, J.M., Pearce, E.J., Brindley, P.J. (2007a)** piggyBac transposon mediated transgenesis of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *FASEB J.* 21(13): 3479 - 3489
- Morales, M.E., Rinaldi, G., Gobert, G.N., Kines, K.J., Tort, J.F., Brindley, P.J. (2007b)** RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157(2): 160 - 169
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1: 263 - 273
- Mutapi, F., Burchmore, R., Mduluz, T., Foucher, A., Harcus, Y., Nicoll, G., Midzi, N., Turner, C.M., Maizels, R.M. (2005)** Praziquantel treatment of individuals exposed to *Schistosoma haematobium* enhances serological recognition of defined parasite antigens. *J. Infect. Dis.* 192(6): 1108 - 1118
- Ndegwa, D., Krautz-Peterson, G., Skelly, P.J. (2007)** Protocols for gene silencing in schistosomes. *Exp. Parasitol.* 117(3): 284 - 291
- Nene, V., Dunne, D.W., Johnson, K.S., Taylor, D.W., Cordingley, J.S. (1986)** Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21(2): 179 - 188

- Nepveu, A. (2001)** Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* 270(1-2): 1 - 15
- Neves, R.H., de Lamare, B.C., Machado-Silva, J.R., Carvalho, J.J., Branquinho, T.B., Lenzi, H.L., Hulstijn, M., Gomes, D.C. (2005)** A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitol. Res.* 95(1): 43 - 49
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., Sugino, Y. (1990)** A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* 18(20): 6169
- Norris, R.A., Kern, M.J. (2001)** Identification of domains mediating transcription activation, repression, and inhibition in the paired-related homeobox protein, Prx2 (S8). *DNA Cell Biol.* 20(2): 89 - 99
- Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S.L., Brugge, J.S., Lowell, C.A., Shattil, S.J. (2002)** Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 157(2): 265 - 275
- Oliveira, G.C., Kemp, W.M. (1995)** Cloning of two actin genes from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75(1): 119 - 122
- Oliver, J.M., Burg, D.L., Wilson, B.S., McLaughlin, J.L., Geahlen, R.L. (1994)** Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J. Biol. Chem.* 269(47): 29697 - 29703
- Osborne, M.A., Dalton, S., Kochan, J.P. (1995)** The yeast tribrid system - genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions. *Biotechnology (N. Y.)* 13(13): 1474 - 1478
- Osman, A., Niles, E.G., LoVerde, P.T. (2004)** Expression of functional *Schistosoma mansoni* Smad4: role in Erk-mediated transforming growth factor beta (TGF-beta) down-regulation. *J. Biol. Chem.* 279(8): 6474 - 6486
- Osman, A., Niles, E.G., LoVerde, P.T. (2001)** Identification and characterization of a Smad2 homologue from *Schistosoma mansoni*, a transforming growth factor-beta signal transducer. *J. Biol. Chem.* 276(13): 10072 - 10082
- Osman, A., Niles, E.G., LoVerde, P.T. (1999)** Characterization of the Ras homologue of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100(1): 27 - 41
- Osman, A., Niles, E.G., Verjovski-Almeida, S., LoVerde, P.T. (2006)** *Schistosoma mansoni* TGF-beta receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS. Pathog.* 2(6): e54
- Ottinger, E.A., Botfield, M.C., Shoelson, S.E. (1998)** Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 273(2): 729 - 735
- Pawson, T. (1992)** Cell signalling. Conviction by genetics. *Nature* 356(6367): 285 - 286

- Pemrick, S.M., Lucas, D.A., Grippo, J.F. (1994)** The retinoid receptors. *Leukemia* 8(11): 1797 - 1806
- Perez-Sanchez, R., Ramajo-Hernandez, A., Ramajo-Martin, V., Oleaga, A. (2006)** Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics*. 6 Suppl 1: 226 - 236
- Peters, J.D., Furlong, M.T., Asai, D.J., Harrison, M.L., Geahlen, R.L. (1996)** Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates alpha-tubulin on tyrosine. *J. Biol. Chem.* 271(9): 4755 - 4762
- Philipp, C. (2004)** Suche nach Interaktionspartnern der Tyrosinkinase TK3 aus *Schistosoma mansoni* und Experimente zur funktionellen Inhibierung verschiedener Gene. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Pica-Mattoccia, L., Novi, A., Cioli, D. (1997)** Enzymatic basis for the lack of oxamniquine activity in *Schistosoma haematobium* infections. *Parasitol. Res.* 83(7): 687 - 689
- Playford, M.P., Schaller, M.D. (2004)** The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23(48): 7928 - 7946
- Popiel, I., Cioli, D., Erasmus, D.A. (1984)** The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *Int. J. Parasitol.* 14(2): 183 - 190
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitzkreutz, A., Sopko, R., McCartney, R.R., Schmidt, M.C., Rachidi, N., Lee, S.J., Mah, A.S., Meng, L., Stark, M.J., Stern, D.F., De, V.C., Tyers, M., Andrews, B., Gerstein, M., Schweitzer, B., Predki, P.F., Snyder, M. (2005)** Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438(7068): 679 - 684
- QIAexpressionist (2006)** [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)
- QIAGEN PCR Cloning Handbook (2001)** [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)
- Quack, T., Beckmann, S., Grevelding, C.G. (2006)** Schistosomiasis and the molecular biology of the male-female interaction of *S. mansoni*. *Berl Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 119(9-10): 365 - 372
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T. (1995)** MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23(23): 4878 - 4884
- Raina, D., Ahmad, R., Kumar, S., Ren, J., Yoshida, K., Kharbanda, S., Kufe, D. (2006)** MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *EMBO J.* 25(16): 3774 - 3783
- Ramachandran, H., Skelly, P.J., Shoemaker, C.B. (1996)** The *Schistosoma mansoni* epidermal growth factor receptor homologue, SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83(1): 1 - 10

- Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B., Maas, C. (1996)** Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93(12): 5888 - 5893
- Resh, M.D. (1994)** Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. Cell 76(3): 411 - 413
- Reth, M., Brummer, T. (2004)** Feedback regulation of lymphocyte signalling. Nat. Rev. Immunol. 4(4): 269 - 277
- Robzyk, K., Kassir, Y. (1992)** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. Nucleic Acids Res. 20(14): 3790
- Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C., Pierce, R.J., Galinier, R., Mitta, G. (2007)** Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (SmPoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 157(2): 217 - 227
- Roskoski, R.Jr. (2004)** Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 324(4): 1155 - 1164
- Ross, A.G., Bartley, P.B., Sleigh, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G.M., McManus, D.P. (2002)** Schistosomiasis. N. Engl. J. Med. 346(16): 1212 - 1220
- Rossi, A., Pica-Mattoccia, L., Cioli, D., Klinkert, M.Q. (2002)** Rapamycin insensitivity in *Schistosoma mansoni* is not due to FKBP12 functionality. Mol. Biochem. Parasitol. 125(1-2): 1 - 9
- Rossi, A., Wippersteg, V., Klinkert, M.Q., Grevelding, C.G. (2003)** Cloning of 5' and 3' flanking regions of the *Schistosoma mansoni* calcineurin A gene and their characterization in transiently transformed parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 130(2): 133 - 138
- Sabe, H., Hata, A., Okada, M., Nakagawa, H., Hanafusa, H. (1994)** Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91(9): 3984 - 3988
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sanford, J.C., Smith, F.D., Russell, J.A. (1993)** Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods Enzymol. 217: 483 - 509
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 74(12): 5463 - 5467
- Savioli, L., Renganathan, E., Montresor, A., Davis, A., Behbehani, K. (1997)** Control of schistosomiasis-a global picture. Parasitol. Today 13(11): 444 - 448
- Schedl, T. (1997)** Developmental genetics of the germ line. In *C. elegans* II (ed. D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer and J.R. Priess). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. : 241 - 270

- Schlaepfer, D.D., Hunter, T. (1998)** Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.* 8(4): 151 - 157
- Schüssler, P., Greveling, C.G., Kunz, W. (1997)** Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction. *Parasitology* 115 ( Pt 6): 629 - 634
- Schüssler, P., Potters, E., Winnen, R., Bottke, W., Kunz, W. (1995)** An isoform of ferritin as a component of protein yolk platelets in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Reprod. Dev.* 41(3): 325 - 330
- Shaw, J.R., Erasmus, D.A. (1981)** *Schistosoma mansoni*: an examination of the reproductive status of females from single sex infections. *Parasitology* 82(1): 121 - 124
- Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E. (1999)** CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 821 - 861
- Shinohara, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. (1999)** beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96(10): 5504 - 5509
- Simone, C. (2006)** SWI/SNF: the crossroads where extracellular signaling pathways meet chromatin. *J. Cell Physiol* 207(2): 309 - 314
- Singh, P.K., Hollingsworth, M.A. (2006)** Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol.* 16(9): 467 - 476
- Skelly, P.J., Da'dara, A., Harn, D.A. (2003)** Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. *Int. J. Parasitol.* 33(4): 363 - 369
- Skelly, P.J., Stein, L.D., Shoemaker, C.B. (1993)** Expression of *Schistosoma mansoni* genes involved in anaerobic and oxidative glucose metabolism during the cercaria to adult transformation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60(1): 93 - 104
- Smith, K.M., Yacobi, R., Van Etten, R.A. (2003)** Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Mol. Cell* 12(1): 27 - 37
- Somogyi, K., Rorth, P. (2004)** Cortactin modulates cell migration and ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Mech. Dev.* 121(1): 57 - 64
- Stricker, S.A., Smythe, T.L. (2006)** Differing mechanisms of cAMP- versus seawater-induced oocyte maturation in marine nemertean worms II. The roles of tyrosine kinases and phosphatases. *Mol. Reprod. Dev.* 73(12): 1564 - 1577
- Su, J., Muranjan, M., Sap, J. (1999)** Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts. *Curr. Biol.* 9(10): 505 - 511
- Suen, P.W., Ilic, D., Cavegion, E., Berton, G., Damsky, C.H., Lowell, C.A. (1999)** Impaired integrin-mediated signal transduction, altered cytoskeletal structure and reduced motility in Hck/Fgr deficient macrophages. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 22) 4067 - 4078

- Sun, Q.Y., Schatten, H. (2006)** Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*. 131(2): 193 - 205
- Svoboda, P. (2007)** Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9(3): 248 - 257
- Tatosyan, A.G., Mizenina, O.A. (2000)** Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc.)* 65(1): 49 - 58
- Taylor, M.V. (1991)** A family of muscle gene promoter element (CArG) binding activities in *Xenopus* embryos: CArG/SRE discrimination and distribution during myogenesis. *Nucleic Acids Res.* 19(10): 2669 - 2675
- Thomas, S.M., Brugge, J.S. (1997)** Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 513 - 609
- Tirode, F., Malaguti, C., Romero, F., Attar, R., Camonis, J., Egly, J.M. (1997)** A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *J. Biol. Chem.* 272(37): 22995 - 22999
- Tran, D.H., Berg, C.A. (2003)** *bullwinkle* and *shark* regulate dorsal-appendage morphogenesis in *Drosophila* oogenesis. *Development* 130(25): 6273 - 6282
- Ukai, H., Ukai-Tadenuma, M., Ogiu, T., Tsuji, H. (2002)** A new technique to prevent self-ligation of DNA. *J. Biotechnol.* 97(3): 233 - 242
- USCD - Nature Signaling Gateway [www.signaling-gateway.org](http://www.signaling-gateway.org)
- van Balkom, B.W., van Gestel, R.A., Brouwers, J.F., Krijgsveld, J., Tielens, A.G., Heck, A.J., van Hellemond, J.J. (2005)** Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. *J. Proteome. Res.* 4(3): 958 - 966
- van Crielinge, W., Beyaert, R. (1999)** Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol. Proced. Online*. 2: 1 - 38
- van der Flier, A., Sonnenberg, A. (2001)** Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305(3): 285 - 298
- van Hellemond, J.J., Retra, K., Brouwers, J.F., van Balkom, B.W., Yazdanbakhsh, M., Shoemaker, C.B., Tielens, A.G. (2006)** Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *Int J. Parasitol.* 36(6): 691 - 699
- van Hellemond, J.J., van Balkom, B.W., Tielens, A.G. (2007)** Schistosome biology and proteomics: progress and challenges. *Exp. Parasitol.* 117(3): 267 - 274
- Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E.A., Guimaraes, P.E., Ojopi, E.P., Paquola, A.C., Piazza, J.P., Nishiyama, M.Y., Jr., Kitajima, J.P., Adamson, R.E., Ashton, P.D., Bonaldo, M.F., Coulson, P.S., Dillon, G.P., Farias, L.P., Gregorio, S.P., Ho, P.L., Leite, R.A., Malaquias, L.C., Marques, R.C., Miyasato, P.A., Nascimento, A.L., Ohlweiler, F.P., Reis, E.M., Ribeiro, M.A., Sa, R.G., Stukart, G.C., Soares, M.B., Gargioni, C., Kawano, T.,**

- Rodrigues, V., Madeira, A.M., Wilson, R.A., Menck, C.F., Setubal, J.C., Leite, L.C., as-Neto, E. (2003)** Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. Nat. Genet. 35(2): 148 - 157
- Verjovski-Almeida, S., Venancio, T.M., Oliveira, K.C., Almeida, G.T., DeMarco, R. (2007)** Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms. Exp. Parasitol. 117(3): 236 - 245
- Vermeire, J.J., Humphries, J.E., Yoshino, T.P. (2005)** Signal transduction in larval trematodes: putative systems associated with regulating larval motility and behaviour. Parasitology 131 Suppl: S57 - S70
- Vicogne, J., Cailliau, K., Tulasne, D., Browaeys, E., Yan, Y.T., Fafeur, V., Vilain, J.P., Legrand, D., Trolet, J., Dissous, C. (2004)** Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. J. Biol. Chem. 279(36): 37407 - 37414
- Vicogne, J., Pin, J.P., Lardans, V., Capron, M., Noel, C., Dissous, C. (2003)** An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module. Mol. Biochem. Parasitol. 126(1): 51 - 62
- Vielreicher, M., Harms, G., Butt, E., Walter, U., Obergfell, A. (2007)** Dynamic interaction between Src and C-terminal Src kinase in integrin alphaIIb beta3-mediated signaling to the cytoskeleton. J. Biol. Chem. 282(46): 33623 - 33631
- Wang, B., Lemay, S., Tsai, S., Veillette, A. (2001)** SH2 domain-mediated interaction of inhibitory protein tyrosine kinase Csk with protein tyrosine phosphatase-HSCF. Mol. Cell Biol. 21(4): 1077 - 1088
- Webster, P.J., Mansour, T.E. (1992)** Conserved classes of homeodomains in *Schistosoma mansoni*, an early bilateral metazoan. Mech. Dev. 38(1): 25 - 32
- White, T.J., Arnheim, N., Erlich, H.A. (1989)** The polymerase chain reaction. Trends Genet. 5(6): 185 - 189
- WHO/TDR (2004)** World Health Organization (Research and Training in Tropical Diseases). [www.who.int/tdr/diseases/schisto](http://www.who.int/tdr/diseases/schisto)
- Willeke, T., Schymeinsky, J., Prange, P., Zahler, S., Walzog, B. (2003)** A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the beta2 integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils. J. Leukoc. Biol. 74(2): 260 - 269
- Wilson, R.A., Ashton, P.D., Braschi, S., Dillon, G.P., Berriman, M., Ivens, A. (2007)** Oming in on schistosomes: prospects and limitations for post-genomics. Trends Parasitol. 23(1): 14 - 20
- Wippersteg, V. (2002)** Etablierung eines Gentransfersystems für *Schistosoma mansoni* und Ansätze zur Immortalisierung von Schistosoma-Zellen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Wippersteg, V., Kapp, K., Kunz, W., Grevelding, C.G. (2002a)** Characterisation of the cysteine protease ER60 in transgenic *Schistosoma mansoni* larvae. Int. J. Parasitol. 32(10): 1219 - 1224

- Wippersteg, V., Kapp, K., Kunz, W., Jackstadt, W.P., Zahner, H., Grevelding, C.G. (2002b)** HSP70-controlled GFP expression in transiently transformed schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120(1): 141 - 150
- Wippersteg, V., Ribeiro, F., Liedtke, S., Kusel, J.R., Grevelding, C.G. (2003)** The uptake of Texas Red-BSA in the excretory system of schistosomes and its colocalisation with ER60 promoter-induced GFP in transiently transformed adult males. *Int. J. Parasitol.* 33(11): 1139 - 1143
- Wippersteg, V., Sajid, M., Walshe, D., Khiem, D., Salter, J.P., McKerrow, J.H., Grevelding, C.G., Caffrey, C.R. (2005)** Biolistic transformation of *Schistosoma mansoni* with 5' flanking regions of two peptidase genes promotes tissue-specific expression. *Int. J. Parasitol.* 35(6): 583 - 589
- Woodside, D.G., Oberfell, A., Leng, L., Wilsbacher, J.L., Miranti, C.K., Brugge, J.S., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H. (2001)** Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr. Biol.* 11(22): 1799 - 1804
- Woodside, D.G., Oberfell, A., Talapatra, A., Calderwood, D.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H. (2002)** The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 277(42): 39401 - 39408
- Xiao, X., Yang, W.X. (2007)** Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J. Zhejiang Univ Sci. B* 8(7): 498 - 506
- Yamada, K., Miyamoto, K. (2005)** Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. *Front Biosci.* 10: 3151 - 3171
- Yamamoto, N., Takeshita, K., Shichijo, M., Kokubo, T., Sato, M., Nakashima, K., Ishimori, M., Nagai, H., Li, Y.F., Yura, T., Bacon, K.B. (2003)** The orally available spleen tyrosine kinase inhibitor 2-[7-(3,4-dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2-c]pyrimidin-5-ylamino]nicotinamide dihydrochloride (BAY 61-3606) blocks antigen-induced airway inflammation in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306(3): 1174 - 1181
- Yan, S.R., Huang, M., Berton, G. (1997)** Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J. Immunol.* 158(4): 1902 - 1910
- Yeast Protocols Handbook (2001)** Clontech Laboratoris, Inc., [www.clontech.com](http://www.clontech.com)
- Yin, F., Herring, B.P. (2005)** GATA-6 can act as a positive or negative regulator of smooth muscle-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 280(6): 4745 - 4752
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B. (2007)** Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* 9(8): 858 - 867
- Zhang, J., Billingsley, M.L., Kincaid, R.L., Siraganian, R.P. (2000)** Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An *in vivo* study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J. Biol. Chem.* 275(45): 35442 - 35447

- Zhang, J., Lautar, S. (1996)** A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components. *Anal. Biochem.* 242(1): 68 - 72
- Zhang, W., McElroy, D., Wu, R. (1991)** Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3(11): 1155 - 1165
- Zheng, K.G., Meng, X.Q., Yang, Y., Yu, Y.S., Liu, D.C., Li, Y.L. (2007)** Requirements of Src family kinase during meiotic maturation in mouse oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 74(1): 125 - 130
- Zoller, K.E., MacNeil, I.A., Brugge, J.S. (1997)** Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction. *J. Immunol.* 158(4): 1650 - 1659
- Zon, L.I., Dorfman, D.M., Orkin, S.H. (1989)** The polymerase chain reaction colony miniprep. *Biotechniques* 7(7): 696 - 698

## 8. ABKÜRZUNGEN & EINHEITEN

### 8.1 Allgemeine Abkürzungen

<b>A</b>	Adenin	<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>ABAM</b>	Antibiotikum/Antimycotikum	<b>GST</b>	Glutathione-S-Transferase
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>AD</b>	Aktivierungs-Domäne	<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
<b>Amp</b>	Ampicillin	<b>i.d.R.</b>	in der Regel
<b>APS</b>	Ammoniumperoxydisulfat	<b>insb.</b>	insbesondere
<b>AS (aa)</b>	Aminosäuren ( <i>amino acid</i> )	<b>insg.</b>	insgesamt
<b>BD</b>	Binde-Domäne	<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumine</i>	<b>ITAM</b>	<i>immunreceptor tyrosine-based activation motif</i>
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>KLSM</b>	konfokales <i>laser scanning</i> Mikroskop
<b>c</b>	Konzentration	<b>konz.</b>	konzentriert
<b>C</b>	Cytosin	<b>LacZ</b>	$\beta$ -Galaktosidase-Strukturgen
<b>cfu</b>	<i>colony forming unit</i>	<b>LB</b>	Luria Broth
<b>d</b>	Schichtdicke	<b>MCS</b>	<i>multiple cloning site</i>
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat	<b>MOPS</b>	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
<b>d.h.</b>	das heißt	<b>NCBI</b>	National Centre for Biotechnology Information
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	deionisiertes Wasser	<b>NCS</b>	<i>newborn calf serum</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>ONPG</b>	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i>
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA	<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease	<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotid-triphosphat	<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>E</b>	Extinktion	<b>PMSF</b>	Phenyl-Methylsulfonyl-Fluoride
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat	<b>mRNA</b>	<i>messenger</i> RNA
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i>	<b>dsRNA</b>	doppelsträngige RNA
<b>et al.</b>	et alii		
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid		
<b>EtOH</b>	Ethanol		
<b>G</b>	Guanin		
<b>GFP</b>	<i>green fluorescent protein</i>		

<b>ssRNA</b>	einzelsträngige RNA	<b>TK</b>	Tyrosinkinase
<b>siRNA</b>	<i>small interfering</i> RNA	<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)amino- methan
<b>RNAi</b>	RNA-Interferenz	<b>TWEEN</b>	Poloxyethylenglykolsorbitol- monooleat
<b>RNase</b>	Ribonuklease	<b>U</b>	Uracil
<b>RT</b>	Raumtemperatur	<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase	<b>UAS</b>	<i>upstream activating sequence</i>
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkriptions-PCR	<b>UTR</b>	<i>untranslated region</i>
<b>s.</b>	siehe	<b>UV</b>	ultraviolett
<b>SD</b>	<i>synthetic dropout</i>	<b>üN</b>	über Nacht
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfate	<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>SH</b>	Src homology domain	<b>WHO</b>	<i>world health organisation</i>
<b><i>S. mansoni</i></b>	<i>Schistosoma mansoni</i>	<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β-D-galacto-pyranosid
<b>s.o.</b>	siehe oben	<b>YTH</b>	Yeast Two-Hybrid
<b>sog.</b>	so genannt	<b>z. Bsp.</b>	zum Beispiel
<b>s.u.</b>	siehe unten	<b>ε</b>	spezifischer Extinktionskoeffizient
<b>T</b>	Thymidin	<b>λ</b>	Wellenlänge
<b>Tab.</b>	Tabelle		
<b><i>Taq</i></b>	<i>Thermophilus aquatus</i>		
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethyl- Ethylendiamin		

## 8.2 Einheiten

<b>AS</b>	Aminosäuren	<b>min</b>	Minuten	<b>U</b>	Unit
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>ml</b>	Milliliter	<b>V</b>	Volt
<b>c</b>	Konzentration	<b>mM</b>	Millimolar	<b>(v/v)</b>	<i>volume per volume</i>
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>nm</b>	Nanometer	<b>W</b>	Watt
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>OD</b>	Optische Dichte	<b>(w/v)</b>	<i>weight per volume</i>
<b>d</b>	Tage	<b>pH</b>	H <sup>+</sup> -Konzentration	<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>Da</b>	Dalton	<b>psi</b>	<i>pounds per square inch</i>	<b>µl</b>	Mikroliter
<b>g</b>	Gramm	<b>rpm</b>	<i>rotations per minute</i>	<b>µmol</b>	Mikromol
<b>g</b>	Erdbeschleunigung	<b>sec</b>	Sekunden	<b>µM</b>	Mikromolar
<b>h</b>	Stunden	<b>t</b>	Zeit		
<b>Hz</b>	Herz	<b>T<sub>m</sub></b>	<i>temperature melting point</i>		
<b>kb</b>	Kilobasenpaare				

### 8.3 Aminosäuren

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

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Adulte <i>S. mansoni</i> _____	1
Abbildung 1.2: Struktur der Tyrosinkinase SmTK3 _____	9
Abbildung 1.3: Struktur der Tyrosinkinase SmTK4 _____	11
Abbildung 1.4: Struktur der Tyrosinkinase SmTK6 _____	13
Abbildung 2.1: Prinzip des auf Gal4 basierenden Yeast Two-Hybrid Systems (Clontech, Matchmarker II) _____	48
Abbildung 2.2: Prinzip der Co-Immunopräzipitation _____	53
Abbildung 2.3: Aufbau eines Western-Blots ( <i>semi-dry</i> Blot) _____	60
Abbildung 2.4: Aufbau eines Southern-Blots _____	76
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Particle Bombardments mit der PDS1000/He <sup>®</sup> (BioRad) _____	84
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des Konstruktes TK4-SH2SH2 + TK6-Voll.-pESC-HIS _____	87
Abbildung 3.2: Nachweis der Expression von TK4-SH2SH2-FLAG und TK6-Volllänge-c-Myc _____	89
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Co-Immunopräzipitation von SmTK4 und SmTK6 _____	89
Abbildung 3.4: Co-Immunopräzipitation von TK4-SH2SH2-FLAG und TK6-Volllänge-c-Myc _____	90
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des <i>bait</i> -Konstruktes TK6-SH2 + TK3-TK pBridge _____	92
Abbildung 3.6: Nachweis der Expression der <i>bait</i> -Konstrukte auf transkriptioneller Ebene _____	94
Abbildung 3.7 : $\beta$ -Galaktosidase-Filterassays mit den Klonen aus den TK6-SH2 + TK3-TK Screenings _____	96
Abbildung 3.8: $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Protein-Protein- Interaktionsstärken _____	99
Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der <i>bait</i> -Konstrukte TK4-bait1 bzw. TK4-bait2 pBridge _____	101
Abbildung 3.10: Nachweis der Expression der <i>bait</i> -Konstrukte auf transkriptioneller Ebene _____	102
Abbildung 3.11: $\beta$ -Galaktosidase-Filterassays mit den Klonen aus den TK4-bait1/-bait2-Screenings _____	104
Abbildung 3.12: $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Protein-Protein- Interaktionsstärken _____	107
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Rezeptor-Tyrosinkinase SmRTK1 _____	109

Abbildung 3.14: Yeast Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen SmTK4 und SmRTK1 _____	111
Abbildung 3.15: Yeast Two-Hybrid Analysen zur Interaktion von SmTK4, SmTK6 bzw. SmTK3 mit SmRTK1 _____	112
Abbildung 3.16: $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Interaktionsstärken von SmTK4, SmTK6 und SmTK3 mit SmRTK1 _____	113
Abbildung 3.17: RT-PCR zur Amplifizierung des fehlendes Bereichs von Sm $\beta$ -Int1 _____	115
Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Sm $\beta$ -Int1 _____	115
Abbildung 3.19: RT-PCR zur Amplifizierung der Vollängen-cDNA-Sequenz von Sm $\beta$ -Int1 _____	116
Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des Sm $\beta$ -Int1-Gens	116
Abbildung 3.21: Positionen der Restriktionsschnittstellen und der Sonde für den Southern-Blot zur Untersuchung der genomischen Kopienzahl des Sm $\beta$ -Int1-Gens	118
Abbildung 3.22: Ergebnis des Southern-Blots zur Untersuchung der genomischen Kopienzahl des Sm $\beta$ -Int1-Gens _____	118
Abbildung 3.23: Nachweis der stadien- und geschlechtsspezifischen Transkription von Sm $\beta$ -Int1 über RT-PCR _____	119
Abbildung 3.24: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis von Sm $\beta$ -Int1- bzw. SmPDI-Transkripten in verschiedenen Stadien und Geschlechtern von <i>S. mansoni</i> _____	120
Abbildung 3.25: Semiquantitative Analyse der Transkriptmengen von Sm $\beta$ -Int1 im Vergleich zu SmPDI _____	120
Abbildung 3.26: <i>In situ</i> - Lokalisierung von Sm $\beta$ -Int1 in adulten <i>S. mansoni</i> _____	122
Abbildung 3.27: <i>In situ</i> - Lokalisierung von Sm $\beta$ -Int1 in paarungsunerfahrenen Männchen von <i>S. mansoni</i> _____	123
Abbildung 3.28: Yeast Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen dem Sm $\beta$ -Int1-C-Terminus und SmTK4 _____	124
Abbildung 3.29: $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Interaktionsstärken zwischen den SmTK4-SH2-Domänen und dem Sm $\beta$ -Int1-C-Terminus _	125
Abbildung 3.30: Yeast Two-Hybrid Analysen zur Interaktion zwischen dem C-Terminus von Sm $\beta$ -Int1 und den SH4SH3- und SH3-Domänen von SmTK6 bzw. SmTK3 _____	126
Abbildung 3.31: $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassay zur Quantifizierung der Interaktionsstärken von SmTK4, SmTK6 und SmTK3 mit Sm $\beta$ -Int1 _____	127
Abbildung 3.32: Schematische Darstellung der hypothetischen $\alpha$ -Integrin-1-Rezeptoren _	128
Abbildung 3.33: RT-PCR zur Amplifizierung der cDNA-Sequenz von Sm $\alpha$ -Int1 _____	129
Abbildung 3.34: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des Sm $\alpha$ -Int1-Gens	130

Abbildung 3.35: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis von Sm $\alpha$ -Int1- bzw. SmPDI-Transkripten in verschiedenen Stadien und Geschlechtern von <i>S. mansoni</i>	131
Abbildung 3.36: Semiquantitative Analyse der Transkriptmengen von Sm $\alpha$ -Int1 im Vergleich zu SmPDI	132
Abbildung 3.37: <i>In situ</i> - Lokalisierung von Sm $\alpha$ -Int1 in adulten <i>S. mansoni</i>	133
Abbildung 3.38: Vergleichende $\beta$ -Galaktosidase-Flüssigassays zur Quantifizierung der Interaktionsstärken	136
Abbildung 3.39: Kontrolle der rekombinanten Expression des SmTK4-Subfragments 2	138
Abbildung 3.40: Elutions-Fraktionen des exprimierten SmTK4-Subfragments 2	139
Abbildung 3.41: Überprüfung der Aufreinigung des SmTK4-Subfragments 2	140
Abbildung 3.42: Western-Blot mit dem anti-SmTK4 - Antiserum (3. Blutung - affinitätsgerinigt)	141
Abbildung 3.43: Vergleichende Analyse der <i>codon usages</i> von <i>S. mansoni</i> und <i>E. coli</i>	143
Abbildung 3.44: Analyse der kodierenden Sequenz für das SmTK4-Subfragment 1 unter Berücksichtigung der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	144
Abbildung 3.45: Kontrolle der rekombinanten Expression der SmTK6- <i>unique site</i>	146
Abbildung 3.46: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des SmTK4-Gens	147
Abbildung 3.47: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des SmTK6-Gens	150
Abbildung 3.48: Morphologie der Gonaden von Schistosomen-Pärchen	153
Abbildung 3.49: Ovar und Ootyp paarungsunerfahrener Schistosomen-Weibchen	154
Abbildung 3.50: Testes paarungsunerfahrener Schistosomen-Männchen	155
Abbildung 3.51: Einfluss von Piceatannol auf gepaarte Schistosomen-Männchen	157
Abbildung 3.52: Einfluss von Piceatannol auf entpaarte Schistosomen-Männchen	159
Abbildung 3.53: Einfluss von Piceatannol auf gepaarte Schistosomen-Weibchen	161
Abbildung 3.54: Einfluss von Piceatannol auf entpaarte Schistosomen-Weibchen	163
Abbildung 3.55: Semiquantitative RT-PCR-Analysen TK4-SH2SH2-dsRNA-behandelter Pärchen	165
Abbildung 3.56: <i>S. mansoni</i> - Pärchen nach Behandlung mit TK4-SH2SH2-dsRNA	166
Abbildung 3.57: Ergebnisse der konfokalen Lasermikroskopie und Lichtmikroskopie adulter <i>S. mansoni</i> -Männchen, die mit Aktin-GFP-Konstrukten transformiert waren	173
Abbildung 3.58: Ergebnisse der konfokalen Lasermikroskopie und Lichtmikroskopie von Muttersporocysten, die mit Aktin-GFP-Konstrukten transformiert waren	174
Abbildung 4.1: Modell zur Interaktion zwischen SmTK6 und dem transmembranen Mucin	182

Abbildung 4.2: Modell zur möglichen Interaktion zwischen SmTK4, SmTK6 und SmTK3 _____	184
Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau von Integrin-Rezeptoren _____	193
Abbildung 4.4: Modell zur Interaktion mit Sm $\beta$ -Int1 _____	201
Abbildung 4.5: Modell zur SmTK4-Signalkaskade _____	202
Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der 5'-Region des SmTK4-Gens _____	208
Abbildung 4.7: Die SmTK4-Signalkaskade hat einen Einfluss auf die Proliferation und/oder Differenzierung von Zellen in Ovar und Testes von <i>S. mansoni</i> _____	220
Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der 5'-Region des SmAct1-Gens _____	225

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1: Übersicht über die Klone aus dem sukzessiven Screening mit TK6-SH2 + TK3-TK _____	97
Tabelle 3.2: Ergebnisse der Identifizierung der putativen Bindungspartner von SmTK6 (1. Screening) _____	98
Tabelle 3.3: Ergebnisse der Identifizierung der putativen Bindungspartner von SmTK6 (2. Screening) _____	98
Tabelle 3.4: Übersicht über die Klone aus dem sukzessiven Screening mit TK4-bait 1 / TK4-bait 2 _____	105
Tabelle 3.5: Ergebnisse der Identifizierung der putativen Bindungspartner von SmTK4 ( <i>downstream</i> ) TK4-bait1: „linker“-Region und TK-Domäne von SmTK4 _____	105
Tabelle 3.6: Ergebnisse der Identifizierung der putativen Bindungspartner von SmTK4 ( <i>downstream</i> ) TK4-bait2: „linker“-Region von SmTK4 _____	106
Tabelle 3.7: Exon- und Introngrößen des Sm $\beta$ -Int1-Gens _____	117
Tabelle 3.8: Exon- und Introngrößen des Sm $\alpha$ -Int1-Gens _____	130
Tabelle 3.9: Exon- und Introngrößen des SmTK4-Gens _____	148
Tabelle 3.10: Spezifizierung und Position der Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die in der 2627 bp langen 5'-Region des SmTK4-Gens identifiziert wurden_	149
Tabelle 3.11: Exon- und Introngrößen des SmTK6-Gens _____	150
Tabelle 3.12: Spezifizierungen und Positionen der Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die in der 3002 bp langen 5'-Region des SmAct1-Gens identifiziert wurden	170
Tabelle 3.13: Zusammenfassung der Reporter-gen-Analyse der 5'-Region des SmAct1-Gens _____	175

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, Svenja Beckmann, geboren am 06.03.1981 in Hilden, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 20. März 2008

---

Svenja Beckmann

## VERÖFFENTLICHUNGEN & STIPENDIEN

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

T. Quack, **S. Beckmann**, C.G. Grevelding (2006): Schistosomiasis and the molecular biology of the male-female interaction of *S. mansoni*. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 119, 365-372.

J. Knobloch, **S. Beckmann**, C. Burmeister, T. Quack, C.G. Grevelding (2007): Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. Experimental Parasitology 117, 318-336.

**S. Beckmann**, V. Wippersteg, A. El-Bahay, J. Hirzmann, G. Oliveira, C.G. Grevelding (2007): *Schistosoma mansoni*: Germ-line transformation approaches and actin-promoter analysis. Experimental Parasitology 117, 292-303.

### Tagungsbeiträge

C.G. Grevelding, J. Knobloch, K. Kapp, **S. Beckmann**, V. Wippersteg, S. Sroka, R. Lammers, T. Quack, W. Kunz (2005): "The role of protein tyrosine kinases in female schistosome development." Vortrag, "Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites", Hydra (Griechenland), 6.-11. September 2005.

**S. Beckmann**, J. Knobloch, C.G. Grevelding (2006): "Identification of interaction partners of the Syk-kinase TK4 from *Schistosoma mansoni*." Vortrag, "2<sup>nd</sup> Short Course for Young Parasitologists" der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP), Wien (Österreich), 20.-22. Februar 2006.

**S. Beckmann**, J. Knobloch, C.G. Grevelding (2006): "Identification of interaction partners of the Syk-kinase TK4 from *Schistosoma mansoni*." Poster, „22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP)“, Wien (Österreich), 22.-25. Februar 2006.

T. Quack, **S. Beckmann**, V. Wippersteg, J.J. van Hellemond, A.G.M. Tielens, C.G. Grevelding. (2006): "Germ-line transformation approaches and gene silencing experiments in *Schistosoma mansoni*." Poster, „22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP)“, Wien (Österreich), 22.-25. Februar 2006.

C.G. Grevelding, J. Knobloch, W. Kunz, **S. Beckmann**, T. Quack (2006): "Herbimycin A influences mitogenic activity, egg production and egg-shell gene expression in paired female schistosomes." Vortrag, „22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP)“, Wien (Österreich), 22.-25. Februar 2006.

**S. Beckmann**, J. Knobloch, C.G. Grevelding (2006): „Screening for interaction partners of tyrosine kinases in *Schistosoma mansoni*.“ Poster, "XI International Congress of Parasitology", Glasgow (Schottland), 6.-11. August 2006.

C.G. Grevelding, T. Quack, **S. Beckmann**, V. Wippersteg (2006): “Somatic and germ-line transformation approaches in *Schistosoma mansoni*.” Vortrag, “XI International Congress of Parasitology”, Glasgow (Schottland), 6.-11. August 2006.

**S. Beckmann**, J. Hirzmann, C.G. Grevelding (2008): “TK4 is a member of an integrin-receptor kinase complex involved in spermatogenesis and oogenesis of *Schistosoma mansoni*.” Vortrag, „23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP)“, Hamburg, 5.-7. März 2008.

T. Quack, **S. Beckmann**, M. Münnich, J. Knobloch, C.G. Grevelding (2008): „SmDRF is a member of a Rho/DRF/Src signalling complex probably involved in gonad differentiation of *Schistosoma mansoni*.” Poster, „23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP)“, Hamburg, 5.-7. März 2008.

## Stipendien

Diese Promotionsarbeit wurde für 3 Jahre (April 2005 - März 2008) durch die Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG) im Rahmen des Graduiertenkollegs 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ der Justus-Liebig-Universität Gießen unterstützt.

## DANKSAGUNG

Die letzte Seite dieser Dissertation möchte ich den Menschen widmen, die mich in den letzten drei Jahren der Promotion begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. C.G. Grevelding danke ich für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe, für seine vielfältige Unterstützung und besonders für seinen unablässigen Glauben an mich und meine Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Dorresteijn möchte ich mich herzlich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie bedanken.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. E. Petzinger und Herrn Prof. Dr. R. Bauerfeind stellvertretend für die Unterstützung durch das Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“.

Großer Dank geht an Christina Scheld, Christine Henrich, Gabriele Lang und Stefan Sroka für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor. Auch möchte ich die weiteren Mitarbeiter des Instituts für Parasitologie nicht vergessen, die auf die eine oder andere Weise beigetragen haben. Es waren nicht immer einfache Jahre mit ein paar Widrigkeiten, aber auch vielen schönen Zeiten.

Bei Kathleen Lutz und Mirjam Lang möchte ich mich für drei tolle Jahre im „Mädels-Zimmer“ bedanken. Ohne euch wären die letzten Jahre nicht die gewesen, die sie waren!

Ebenso möchte ich Dr. Thomas Quack danken, dass ich wissenschaftlich und menschlich noch dazu lernen konnte. Nicht unerwähnt bleiben sollen auch Dr. Jan Behrend, Denis Wolf, Silke Leutner und Christin Buro. Ich danke euch für viele lustige Abende, die mir den manchmal doch frustrierenden Laboralltag immens aufgeheitert haben.

Der letzte und wichtigste Dank geht an die Menschen in meinem privaten Bereich, die mich durch das Studium bis hierher begleitet haben. Ich danke euch für eure bedingungslose Unterstützung, die ihr mir immer als selbstverständlich habt erscheinen lassen. Danke für eure Geduld, eure Toleranz und euer Verständnis... Ich danke euch für alles!