

**Entwicklung einer einfachen, empfindlichen und schnellen  
Methode zur Immundiagnose der Bilharziose  
(Schistosomiase)**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

-Dr. rer.nat.-

des Fachbereichs Biologie, FB 08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Binta Sané

**Gießen 2001**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie des Fachbereichs Medizin (FB 11) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit vom Juli 1997 bis August 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ewald Beck angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Ewald Beck  
Biochemisches Institut, am Klinikum  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Fachbereich Medizin  
Friedrichstraße 24  
35392 Gießen

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Gerd Hobom  
Institut für Mikro- und Molekularbiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Fachbereich Biologie  
Heinrich-Buff-Ring 26-32  
35392 Gießen

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ewald Beck, für sein persönliches Engagement, die vielen Anregungen und die immer kompetente Hilfe bei der Lösung wissenschaftlicher Problemstellungen.

Mein sehr herzlicher Dank an Frau Charlotte Beck für ihre moralische Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Gerd Hobom bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates im Fachbereich Biologie

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Hier möchte ich insbesondere Barbara Preiss für ihre wertvolle Hilfe erwähnen.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), insbesondere Frau Christiane Heinemann, danke ich sehr herzlich für die vielseitige Unterstützung.

Ich danke meinen Eltern.

Es ist wirklich ein Segen, eine Familie zu haben, die so großzügig reagierte, mir alles gab, was ich brauchte, ob es nun die Antwort auf eine Frage war oder uneingeschränkte moralische Unterstützung, Ich möchte mich bei euch sehr herzlich bedanken. Eure Anmut wird mein Heim erleuchten und die dunklen Winkel mit Licht erfüllen.

Mama, in memoriam, ich habe dich im Gedächtnis bewahrt, du bist in mir wie ein Schutzfisch mitten im Dorf. Die Liebe, die du mir geschenkt hast, ist rein und stark. Ich erachte es als große Ehre und als höchstes Glück, dich als Mutter gehabt zu haben.

Dank meiner Großmutter, Mame Ciré Badji, mögest du dich an die Zeit und deine Weisheit in meiner Kindheit erinnern.

Nicht zuletzt danke ich Mouhamadou Ousmane für die wertvolle Freundschaft und die vielseitige Unterstützung.

## Zusammenfassung

### Entwicklung einer einfachen, empfindlichen und schnellen Methode zur Immundiagnose der Bilharziose (Schistosomiasis)

Die Bilharziose, auch Schistosomiasis genannt, ist in vielen tropischen und subtropischen Regionen der Welt nach der Malaria die zweitwichtigste Parasitenerkrankung. Die Krankheit wird durch verschiedene Trematoden der Gattung *Schistosoma* ausgelöst. Da weder zur Zeit noch in naher Zukunft ein ausreichend wirksamer Impfstoff zur Verfügung stehen wird, müssen sich Programme zur Bekämpfung der Schistosomiasis auf die Diagnose und die medikamentöse Behandlung der betroffenen Bevölkerung konzentrieren.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Diagnoseverfahren zu entwickeln, welches empfindlich genug ist, auch mittlere und leichte Infektionen nachzuweisen. Nach Möglichkeit sollte auch versucht werden, zwischen den in Afrika gemeinsam auftretenden Erreger-Arten *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma haematobium* zu diskriminieren. Dies sollte mit Hilfe speziesspezifischer rekombinanter Antigene erreicht werden.

Aus cDNA-Banken von adulten *S. mansoni*-Würmern und Eiern von *S. japonicum* wurden mit pools von Patientenseren zahlreiche immunreaktive Klone isoliert und charakterisiert. Dazu wurden die Phagenklone durch PCR-Analyse, Sequenzanalyse und Expression der Genprodukte als rekombinante Proteine in größerem Maßstab in reiner Form dargestellt. Um ihre Brauchbarkeit für die Immundiagnose zu testen, wurden die rekombinanten Antigene in einem Westernblot-ähnlichen Verfahren mit größeren Zahlen von Patientenseren und Kontrollseren untersucht. Als wichtigstes Ergebnis wurde dabei ein neues Antigen, Sj22, entdeckt, das nicht nur zu einer deutlichen Steigerung der Empfindlichkeit des Nachweises aller wichtigen Schistosomenarten führt, sondern insbesondere auch die Diagnose der asiatischen Form der Krankheit, für die es noch kein ausreichend empfindliches Nachweisverfahren gibt, zuläßt. Die angestrebte Diskriminierung der beiden afrikanischen Arten der Erreger gelang leider nicht.

Durch die Kombination des neuen Antigens Sj22 mit zwei weiteren schon bekannten diagnostischen Antigenen konnte ein Nachweisverfahren für die Krankheit etabliert werden, das im Unterschied zu anderen Diagnoseverfahren eine extrem niedrige Nachweisgrenze bezüglich der Krankheitserreger hat. Es eignet sich daher insbesondere für solche Länder, die durch Bekämpfungsmaßnahmen die Bilharziose weitgehend reduziert haben oder gefährdet sind, die Seuche einzuschleppen.

Da die Diagnose im Feld unter einfachsten Bedingungen erfolgen muß, wurde versucht, die Technik möglichst einfach und sicher zu gestalten. Es wurde mit Erfolg getestet, daß Vollblut statt Patientenserum verwendet werden kann und daß die geringe Menge benötigten Blutes auf Filterpapier eingetrocknet werden kann. Da hierfür keine Kanülen benötigt wären, wird dadurch das Infektionsrisiko sowohl für das medizinische Personal als auch für die betroffene Bevölkerung beträchtlich herabgesetzt.

Schließlich gelang es auch noch, das Testverfahren erheblich zu beschleunigen. Durch ein neu entwickeltes Verfahren zur Konjugation von Protein A an ein Kohlenstoffkolloid und dessen Verwendung zum Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen kann der Immuntest mit derselben Empfindlichkeit jetzt innerhalb von 15 Minuten durchgeführt werden.

**INHALTSVERZEICHNIS****ABKÜRZUNGEN****DEFINITIONEN**

<b>A- EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
A-1 Epidemiologie der Bilharziose	1
A-1-1 Der Erreger	2
A-1-2 Der Lebenszyklus von Schistosomen	3
A-1-3 Die Krankheit	4
A-1-4 Bekämpfung der Schistosomiasis	5
A-2 Diagnose der Schistosomiasis	7
A-2-1 Parasitologische Verfahren	7
A-2-2 Immunologische Verfahren	8
A-3 Zielsetzung der Arbeit	9
A-4 Geplante Forschungsschwerpunkte	11
<b>B- MATERIAL</b>	<b>12</b>
B-1 Bakterienstämme	12
B-2 Parasiten	13
B-3 Antibiotika	13
B-4 Kulturmedien und Platten	13
B-5 Antiseren und Immunreagentien	14
B-5-1 Infektionsseren	14
B-5-2 Kontrollseren	14
B-5-3 Alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper	14
B-6 Nucleinsäuren und Nucleotide	15
B-6-1 Schistosomen-cDNA	15
B-6-2 Plasmide	15
B-6-3 Nitrocellulosemanbran	15
B-6-4 Oligonucleotide	15
B-6-5 Nucleotide	17
B-7 Enzyme	17
B-7-1 Restriktionsendonucleasen	17

B-7-2 Sonstige Enzyme	17
B-8 Größenstandards	18
B-8-1 DNA-Größenstandard	18
B-8-2 Protein-Größenstandards	18
B-9 Affinitätsmatrices	18
B-10 Chemikalien	19
B-10-1 Spezielle Chemikalien	19
B-10-2 Fertig-Kits	20
B-11 Lösungen und Puffer	20
B-11-1 Puffer für molekularbiologische Methoden	20
B-11-2 Gelelektrophorese Puffer	21
B-11-2-1 DNA-Gele	21
B-11-2-2 Protein-Gele	22
B-11-3 Puffer und Lösungen für Western-Blot, das Screening und den Line-Blot	23
B-11-3-1 Standardpuffer	23
B-11-3-2 Antigenverdünnungspuffer	23
B-11-3-3 Antikörperverdünnungspuffer	24
B-11-3-4 Waschlösung und Puffer für die Farbreaktion	24
B-11-3-5 Färbelösungen	25
B-12 Fotomaterial und Röntgenfilme	25
B-13 Geräte	25
B-13-1 Blot-Apparatur	25
B-13-2 Gel-Elektrophorese-Systeme	25
B-13-3 Zentrifugen	26
B-13-4 Schüttler	26
B-13-5 PCR-Geräte	26
B-13-6 Geräte für Ultraschall-Aufschluss	26
B-13-7 ELISA-Reader	26
B-14 Sonstiges Material	27

<b>C- METHODEN</b>	28
C-1 Immunologische Methoden	28
C-1-1 Immunoscreening der $\lambda$ gt11/ $\lambda$ ZAPII-Expressions-cDNA-Genbanken	28
C-1-1-1 Plattieren der cDNA-Genbanken	28
C-1-1-2 Induktion von $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteinen	28
C-1-1-3 Reaktion mit dem Antiserum	28
C-1-1-4 Nachweis der Bindung antigenspezifischer Antikörper	29
C-1-1-5 Isolation von Phagen	30
C-1-1-6 Phagen-Lysate	30
C-1-2 Western-Blot-Analyse	30
C-1-3 Line-Blot	31
C-2 Molekularbiologische Methoden	32
C-2-1 Untersuchung rekombinanter Phagen	32
C-2-1-1 Bestimmung der cDNA-Länge in Lambda gt11 mit PCR	32
C-2-1-2 Präparative PCR	33
C-2-2 Enzymatische Reaktionen an DNA	34
C-2-2-1 Restriktion von DNA	34
C-2-2-2 Einfüll-Reaktion	34
C-2-2-3 Ligation	34
C-2-3 Klonierung von PCR-Fragmenten in pDS-Sti2-His Vektor	35
C-2-4 Umwandlung der lambda ZAPII-Klone im Phagemide	36
C-2-5 Präparation von Plasmid-DNA	37
C-2-6 Sequenzanalyse	38
C-3 Mikrobiologische Methoden	38
C-3-1 Kultivierung von E. coli	38
C-3-2 Transformation von E. coli	39
C-3-2-1 Kompetente Bakterien: Calciumchlorid-Methode	39
C-3-2-2 Transformation	39
C-3-3 Expression von MS2-Fusionsproteinen in E. coli	39
C-3-4 Expression von Histidin-Fusionsproteinen	40
C-3-5 Plattieren von Lambda-Phagen	40
C-4 Biochemische Methoden	41
C-4-1 Reinigung von MS2-Fusionsproteinen	41
C-4-2 Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen	41

C-4-3 Alternative Reinigung von Histidin6- Fusionsproteinen	42
C-4-4 Protein-Konzentration Bestimmung	42
C-4-5 Gel-Elektrophorese	43
C-4-5-1 DNA-Agarose-Gele	43
C-4-5-2 Polyacrylamidgele	43
C-4-5-3 Sequenz-Gele	43
C-4-5-4 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen	44
<b>D – ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>45</b>
<b>Teil 1: Isolierung und Charakterisierung immunreaktiver Antigene</b>	<b>45</b>
D-1 Rekombinante Antigene aus der <i>S. mansoni</i> Ei-cDNA-Bank	46
D-1-1 Immunoscreening der <i>S. mansoni</i> Ei-Expressions cDNA-Genbank	46
D-1-2 Untersuchung der rekombinanten Phagen	48
D-1-2-1 Bestimmung der cDNA-Länge in Lambda gt11 mit PCR	48
D-1-2-2 Reindarstellung der Phagenklone	49
D-1-3 Klonierung von PCR-Fragmenten in pDS-Sti2-His Vektor	51
D-1-4 Proteinexpression	54
D-1-5 Charakterisierung der <i>S. mansoni</i> cDNA-Klone durch Sequenzanalyse	55
D-1-6 Reaktion der rekombinante Proteine mit Patientenseren	57
D-2 Isolation von Antigenen aus einer cDNA-Bank adulter Würmer von <i>S. japonicum</i>	59
D-2-1 Screening der <i>S. japonicum</i> -Genbank mit Patientenseren	59
D-2-2 PCR-Analyse	60
D-2-3 Analyse der Klone durch Proteinexpression und Westernblot	61
D-2-4 Charakterisierung der immunologisch stark reagierenden Klone durch Sequenzanalyse	62
D-2-4-1 Klone 9 und 26	63
D-2-4-2 Klone 28 und 48	64
D-2-4-3 Klone 14, 49 und 83	64
D-2-4-4 Klone 27, 44, 51, 74 und 82	65
D-2-5 Beurteilung der Verwendbarkeit dieser Klone	65
D-2-6 Konstruktion des Expressionsvektor pQE-ZAP	66
D-2-7 Überprüfung des Plasmids pQE-ZAP mittels Restriktionsverdau	68



D-2-8 Umklonierung der <i>S. japonicum</i> Antigene in pQE-ZAP	69
D-2-8-1 Expression von <i>S. mansoni</i> Fimbrin (Klone 49 und 83)	69
D-2-8-2 Expression von Klon 82 (Funktion unbekannt)	70
D-2-8-3 Expression von Klon 51 (Funktion unbekannt)	71
D-2-8-4 Expression von Klon 27 als MS2-Fusionsprotein	71
<b>Teil 2: Diagnose der Bilharziose mit Hilfe rekombinanter Antigene</b>	<b>73</b>
D-3-1 Seren für die Immunologische Charakterisierung der Antigene	73
D-3-2 Immunreaktion der neu isolierten rekombinanten <i>S. japonicum</i> -Antigene	74
D-3-3 Sj22 als diagnostisches Antigen für die Schistosomiasis japonica	77
D-3-4 Allgemeine Eignung von Sj22 für die Immundiagnose der Bilharziose	80
D-3-5 Ein einfacher Weg zur Serumgewinnung	83
D-3-6 Haltbarkeit der präparierten Nitrocellulosestreifen	85
D-4 Die Entwicklung eines schnelleren Diagnoseverfahrens ("Dip-Stick")	88
D-4-1 Nachweis der Bindung antigenspezifischer Antikörper durch mit kolloidalem Gold konjugierten ProteinA	89
D-4-2 Herstellung von mit kolloidem Kohlenstoff markierten ProteinA	90
D-4-3 Etablierung eines effizienten ProteinA-Kohlenstoff-Kolloid-Komplexes	93
<b>E- SCHLUSSBETRACHTUNG</b>	<b>97</b>
<b>F- LITERATUR</b>	<b>98</b>
<b>G- ANHANG</b>	

## Abkürzungen

A	Adenin
AA	Acrylamid
á	anti
amp	Ampicillinresistenz
anti	Antiserum gegen
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BICIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CTP	Cytosintriphosphat
d	Desoxy-
dd	Didesoxy-
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GHC	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
$\mu$	micro-

M	Mol/l
mA	Milliampere
min	Minute
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
MS2	Replikase des Bakteriophagen MS2
MW	Molekulargewicht
n	nano
nt	Nucleotide (Länge von DNA-Fragmenten)
NBT	Nitroblautetrazolium
NTA	nitrilotriacetic acid (Nitrilotriessigsäure)
NTP	Nucleosidtriphosphat
p	pico-
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pol I	DNA Polymerase I
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RNase	Ribonuclease
rNTP	Ribonucleotid
RT	Raumtemperatur
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
SEA	soluble egg antigens (lösliche Ei-Antigene)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
T	Thymin
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
Ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumen-/Volumen-Verhältnis
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichts-/Volumen-Verhältnis
x	mal

## Definitionen

Folgende Begriffe werden in dieser Arbeit als Fachwörter verwendet:

<i>annealing</i>	Anlagerung von Nukleinsäuresträngen
<i>background</i>	unspezifischer Hintergrund, der vom spezifischen Signal subtrahiert werden muß
<i>blunt ends</i>	„stumpfe“ DNA-Enden
<i>in frame</i>	im (richtigen) Leseraster
<i>linker</i>	synthetisches, zu sich selbst komplementäres Oligonukleotid, das die Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym enthält
<i>ori</i>	Replikationsursprung
<i>PCR</i>	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
<i>pellet</i>	Sediment nach Zentrifugation
<i>polylinker</i>	DNA-Region in Vektoren, welche mehrere aneinandergereihte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen enthält
<i>pool</i>	vereinigte Fraktionen
<i>primer</i>	Oligonucleotid als Startpunkt für die Kettenverlängerung
<i>screening</i>	Identifizierung positiver Bakterienkolonien
<i>sticky ends</i>	„klebrige“ DNA-Enden (überstehende Einzelstränge)
<i>template</i>	Matrize für die DNA/RNA-Polymerisation

## **A- EINLEITUNG**

### **A-1 Epidemiologie der Bilharziose**

Die Bilharziose, auch Schistosomiasis genannt, ist in manchen endemischen Regionen die zweitwichtigste Parasitenerkrankung nach der Malaria. Diese Infektionskrankheit ist schon lange bekannt und es gibt bereits Aufzeichnungen aus der Zeit der Pharaonen in Ägypten. Der Erreger wurde wissenschaftlich erstmals von dem deutschen Arzt Theodor Bilharz im Jahre 1851 beschrieben. Nach ihm wird die Krankheit im deutschen Sprachraum auch als Bilharziose bezeichnet (WHO, 1998). Über 200 Millionen Menschen sind weltweit infiziert, 600 Millionen Menschen sind in gefährdeten Gebieten einer Infektionsgefahr ausgesetzt (WHO, 1998). Durch die Entwicklung neuer Medikamente ist die Zahl der schweren Erkrankungen und Todesfällen in den letzten Jahren zwar gesunken, allerdings hat die Zahl der Neuinfektionen insgesamt zugenommen. Dies ist hauptsächlich die Folge der Errichtung neuer Bewässerungsanlagen. Durch diese Stauseen und Kanäle entstehen weitere Biotope für Süßwasserschnecken, die als Zwischenwirte für die Schistosomen dienen.

Zur Zeit gibt es für die Diagnose der Bilharziose noch kein optimal geeignetes immunologisches Diagnoseverfahren. Eine Schistosomen-Infektion wird nach wie vor mit parasitologischen Methoden diagnostiziert, was einen hohen zeitlichen und personellen Aufwand erfordert. Den zur Verfügung stehenden immunologischen Verfahren mangelt es an Sensitivität und Spezifität. Hauptgrund dafür ist das Fehlen geeigneter Antigene. Außerdem sind die bisher verwendeten Antigene nur durch zeit- und kostenintensive Reinigungsmethoden in zu geringen Mengen und schwankender Qualität zu gewinnen, was eine Standardisierung von Testverfahren nicht ermöglicht.

### A-1-1 Der Erreger

Die Schistosomiasis wird durch verschiedene Trematoden der Gattung *Schistosoma* ausgelöst. Diese digenen Trematoden, auch Saugwürmer genannt, leben geschlechtlich getrennt in den Blutgefäßen von Warmblütern. Schistosomen sind sexuell dimorph; das Männchen ist dicker und erreicht je nach Art eine Länge von bis zu 20 mm, während das Weibchen dünner und länger wird, je nach Art 7 bis 22 mm lang (**Abb.1**). Die dorsoventral abgeflachten Männchen rollen die lateralen Partien ein, so daß eine Bauchfalte (Canalis gynaecophorus) entsteht, in der das Weibchen bei der Paarung aufgenommen wird. Durch diese Bauchfalte erscheint der Körper des Männchens längsgespalten. Die wichtigsten Schistosomenarten sind *S. haematobium*, *S. mansoni* und *S. japonicum*. *S. haematobium*, Erreger der Urogenitalbilharziose, ist in Afrika und im Mittleren Osten zu finden. *S. mansoni*, Erreger der Darmbilharziose, ist endemisch in Afrika, hauptsächlich im Niltal, aber auch in Süd- und Mittelamerika. *S. japonicum*, Erreger der asiatischen Darmbilharziose (Katayama-Fieber), ist endemisch auf den Phillipinen und in China. Neben dieser drei verbreitetsten Arten, treten in kleinerem Umfang auch *S. intercalatum* in Zentralafrika und *S. mekongi* in Südasien auf.



**Abb. 1: Schistosoma mansoni. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Wurmpärchens (Dr. Breternitz)**

## A-1-2 Der Lebenszyklus von Schistosomen

Die Entwicklung der humanpathogenen Schistosomenarten verläuft weitgehend identisch (ROLLINSON & SIMPSON, 1987 ; JORDAN, WEBBE & STURROCK, 1993). Auf eine sexuelle Generation im Menschen folgt eine asexuelle Entwicklungsphase in einer Süßwasserschnecke die für jede Schistosomenart spezifisch ist. Die adulten Schistosomen haben eine Lebenserwartung von bis zu 30 Jahren, durchschnittlich liegt das erreichte Alter bei 8-10 Jahren. Alle Arte leben im Pfortadersystem der Leber und wandern nach der Paarung zur Eiablage in die peripheren Blutgefäße aus, *S. mansoni* und *S. japonicum* in die Mesenterialgefäße des Darmes und *S. haematobium* in die Venen der Blase. Die Weibchen von *S. mansoni* und *S. haematobium* legen jeweils ca. 300 Eier pro Tag, die Weibchen von *S. japonicum* sogar bis zu 3000 Eier. Bei *S. mansoni* und *S. japonicum* werden die Eier mit dem Stuhl abgegeben, bei *S. haematobium* über den Harn. Bis zu 50% der Eier verbleiben jedoch im Körper des Wirtes. Diese werden entweder im Bereich von Blase oder Darm eingekapselt oder mit dem Blutstrom in alle Organe des Körpers verschleppt, wo es häufig zu schweren pathologischen Veränderungen kommt.

In den für die jeweilige Schistosomenart spezifischen Eiern entwickelt sich die Wimpernlarve (Miracidium). Bei Kontakt mit Süßwasser schlüpfen die Miracidien aus der Eihülle und müssen innerhalb von 24 Stunden Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria* für *S. mansoni*, *Oncomelania* für *S. japonicum* und *Bulinus* für *S. haematobium* als Zwischenwirt finden. In den Zwischenwirten differenzieren sich die Miracidien zu Muttersporocysten, aus denen sich zahlreiche Tochtersporocysten asexuell entwickeln. Nach einem weiteren Entwicklungsschritt bohren sich schließlich die für den Menschen infektiösen Cercarien (Gabelschwanzlarven) ins Freie. Pro Tag können aus einer infizierten Schnecke bis zu 3000 Cercarien freigesetzt werden. Kommt der Mensch mit kontaminiertem Wasser in Kontakt, dringen die Cercarien durch die Haut unter Abwurf ihres Gabelschwanzes in den Körper ein. Dabei beginnt die Differenzierung der Cercarien zu Schistosomula. Die jungen Würmer wandern nach vier bis fünf Tagen in die Venen oder Lymphgefäße der Haut ein und werden von dort passiv mit dem Blutstrom über die rechte Herzkammer zunächst in die Lunge transportiert deren Kapillarsystem sie passieren müssen. Einige Woche nach der Infektion erreichen sie das Pfortadersystem der Leber wo sie zu adulten Würmern heranwachsen, womit der Zyklus wieder geschlossen ist. (**Abb.2**)

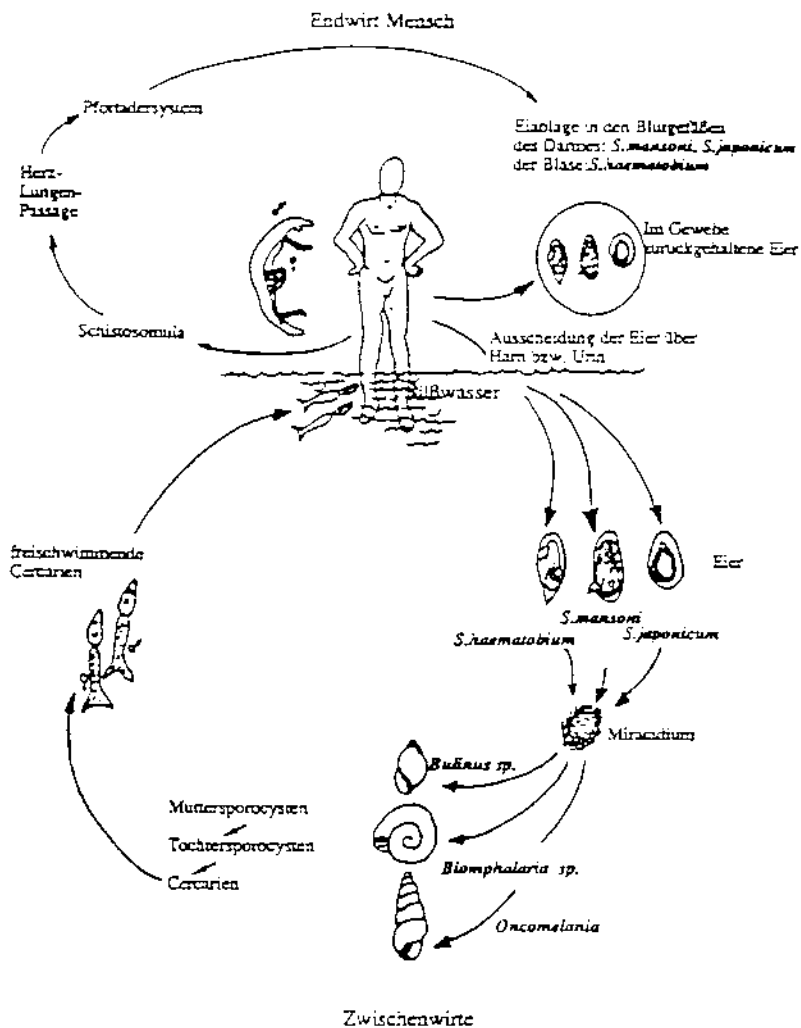


Abb. 2: Lebenszyklus von Schistosomen

### A-1-3 Die Krankheit

Einige Stunde nach Eindringen der Cercarien in die Haut kommt es zur sogenannten Schistosomendermatitis. Dabei handelt sich um Juckreize und Hautrötungen, die durch die von Cercarien abgegebenen Sekrete verursacht sind. Diese erste Reaktionen auf eine Schistosomeninfektion klingen aber nach wenigen Tagen ab. Die akute Phase der Schistosomiasis führt nach einer Inkubationszeit von 3 bis 9 Wochen zu meist unspezifischen Symptomen wie Fieber, Mattigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen, Diarrhoe und Gewichtsverlust. Leber und Milz sind leicht



vergrößert, während im Blutbild eine starke Eosinophilie und erhöhte Antikörperspiegel zu beobachten sind. Diese Symptome sind weitgehend auf die Ausscheidungen der Würmer zurückzuführen. Diese Phase, die bei Bewohnern von Endemiegebieten meist unerkannt verläuft, ist bei *S. japonicum* am heftigsten; es tritt das sogenannte Katayama-Fieber auf.

Wesentlich gravierendere Schädigungen des Wirtes werden nicht durch den Parasiten selbst, sondern durch dessen Eier verursacht. Die Eier sitzen in den Kapillaren fest und lösen mit ihren Endstacheln Irritationen aus, die zu kleinen Abszessen führen. Dabei treten bei einer Infektion mit *S. mansoni* oder *S. japonicum* Blutungen im Bereich des Enddarmes, bei *S. haematobium* Blutungen in der Blasenwand auf. Bei der Urogenitalbilharziose können die Gewebswucherungen eine Urämie verursachen, in schweren Fällen entwickeln sich maligne Blasentumore. Außerdem verursachen die Eier, die in die Leber gelangen, starke Entzündungsreaktionen (Granulome) bis hin zur Bildung von Pseudopapillen und Pseudotuberkeln. Dies kann zur Vergrößerung der Leber (Hepatosplenomegalie) führen. Durch Veränderungen der Gefäßeigenschaften kommt es zu einem Blutstau vor der Leber (portale Hypertension), der zur Ausbildung porta-systemischer Querverbindungen (Anastomosen), zu Ascites und zu Varizen in der Speiseröhre führen kann. Starker Befall kann auch zu einer Leberzirrhose führen.

#### **A-1-4 Bekämpfung der Schistosomiase**

Die beste Möglichkeit zur Bekämpfung der Schistosomiasis wäre einer weit verbreiteten Ansicht nach die Entwicklung einer Vakzine (BUTTERWORTH et al., 1987). In dieser Richtung werden große Anstrengungen unternommen (Reviews: SMITHERS, 1986; JAMES, 1987; CAPRON et al., 1987; SHER et al., 1989). Im Wesentlichen wurden bisher zwei Strategien mit unterschiedlichem Erfolg eingesetzt: eine Vakzinierung für Tiere mit durch ionisierende Strahlen atenuierten Cercarien und verschiedene biochemisch aufgereinigte oder rekombinant hergestellte Antigenpräparationen. Mit atenuierten Cercarien kann ein beachtlicher Immunschutz erzielt werden (bis zu 90%), allerdings ist die Methode aus ethischen Gründen schwer auf den Menschen übertragbar. Die Erfolge mit rekombinanten Antigenen sind trotz gelegentlicher Erfolgsmeldungen, die bisher aber nie reproduziert werden konnten, eher negativ zu bewerten. In verschiedenen Tiermodellen wurde eine

Reduktion der Wurmlast um 20-30% erreicht, was eine Anwendung am Menschen bisher noch nicht rechtfertigt.

Einen weiteren Angriffspunkt zur Bekämpfung der Bilharziose bildet der Zwischenwirt, da Schneckenpopulationen durch Molluskizide und ökologische Maßnahmen dezimiert werden können. Dieser Ansatz hat jedoch sehr große Nachteile. Um die Erfolge der Bekämpfung des Zwischenwirtes zu sichern, muss der Einsatz von Molluskiziden ständig wiederholt werden, was hohe Kosten verursacht. Diese Methode hat auch nur Sinn bei isolierten Wasservorkommen, z.B. in künstlichen Bewässerungssystemen und Oasen. Der Einsatz von Molluskiziden kann auch erhebliche negative ökologische Folgen mit sich bringen, da er z.B. Fischbestände gefährdet (FENWICK, 1987). Bemerkenswerte Erfolge in der Schneckenbekämpfung konnten durch das Aussetzen natürlicher Feinde, wie z.B. räuberische Fische, erzielt werden (KOLBERG, 1994).

In die Chemotherapie wurde durch die Entwicklung von Praziquantel vor einigen Jahren ein entscheidender Durchbruch erzielt. Das Medikament ist zwar weitgehend frei von Nebenwirkungen und kann zur Behandlung der drei wichtigsten Schistosomeninfektionen verwendet werden (THOMAS, 1981), schützt aber nicht vor einer Reinfektion, so daß die Therapie regelmäßig wiederholt werden muss (GRYSEELS et al., 1991; DUNNE et al., 1992). Außerdem berichten manche neuere Studien über eine zunehmende Resistenzentwicklung gegen Praziquantel in Ägypten und im Senegal (STELMA et al., 1995; ISMAIL et al., 1996).

Der einfachste Schutz gegen eine Infektion mit Schistosomen wäre die Vermeidung des Kontaktes mit kontaminiertem Wasser. Gerade dies lassen jedoch die Lebensbedingungen der Bevölkerung von Endemiegebieten meist nicht zu. Durch fehlende sanitäre Einrichtungen und Kläranlagen kommt es ständig zur Kontamination der Gewässer mit Fäkalien und somit auch mit Eiern; in den betroffenen Regionen dienen diese Wasservorkommen als Nutzwasserreservoir. Sie werden zum Waschen, zum Baden, für den Bewässerungslandbau und für andere Dingen des täglichen Lebens benötigt. Erziehung zur Hygiene und allgemeine gesundheitspolitische Maßnahme sind deshalb wichtige Elemente in Programmen zur Bekämpfung der Schistosomiasis (LIESE, 1987).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in Anbetracht der hohen Zahlen infizierter Menschen in den endemischen Regionen dringend neue Bekämpfungsstrategien zu entwickeln sind. Da weder zur Zeit noch in naher Zukunft eine Vakzine zur

Verfügung stehen wird, konzentrieren sich Programme zur Bekämpfung der Schistosomiasis auf die Diagnose und medikamentöse Behandlung der betroffenen Bevölkerung.

## **A-2 Diagnose der Schistosomiasis**

Die zur Zeit eingesetzten Diagnoseverfahren beruhen auf zwei unterschiedlichen Prinzipien, zum einen auf parasitologischen, zum anderen auf immunologischen Nachweismethoden. Ein einfaches und häufig angewandtes Diagnoseverfahren in Endemiegebieten von *S. haematobium* ist die Frage nach Blut und Urin (STOTHARD, 1995). Diese Art der Diagnose ist sicherlich nicht die Lösung, sondern zeigt nur, wie notwendig es ist, ein einfaches, sensitives und spezifisches Diagnoseverfahren zu entwickeln.

### **A-2-1 Parasitologische Verfahren**

Die parasitologischen Verfahren beruhen auf der Bestimmung der Eier, die mit dem Stuhl oder Harn ausgeschieden werden. Bei Stuhluntersuchungen hat sich das Kato-Katz-Verfahren (KATZ, 1972) etabliert. Bei diesem Verfahren werden Stuhlproben der Patienten auf Eier von *S. mansoni* bzw. *S. japonicum* mikroskopisch untersucht. Dieses Verfahren ist allgemein anerkannt und wird in der Regel als Standard zur Bestimmung der Sensitivität immunologischer Verfahren herangezogen. Um das tatsächliche Auftreten der Bilharziose mit dem Kato-Katz-Verfahren zu bestimmen sind in der Regel aber mehrere Stuhluntersuchungen notwendig. Einmalige Untersuchungen führen zu einer starken Unterschätzung der Infektionsrate im Untersuchungsgebiet (DE VALS & GRYSEELS, 1992). Die Bestimmung der Eier bei *S. haematobium* erfolgt durch die Filtration von Urinproben mit einer anschließenden Färbung des Filterpapiers.

Die Ausscheidung der Eier im Stuhl bzw. Urin erfolgt allerdings nicht kontinuierlich. Bei *S. haematobium* ist die Anzahl von der Tageszeit abhängig. Bei *S. mansoni* treten Schwankungen über Tage hinweg auf (FELDMEIER, 1993). Gleichzeitig kommen bei diesen Verfahren auch individuelle Fehler des Untersuchungspersonals zum Tragen, die oft auch durch mangelnde Motivation oder Zuverlässigkeit verursacht werden.

## A-2-2 Immunologische Verfahren

Die immunologischen Diagnose zielen zum einen auf den Nachweis zirkulierender Schistosomen-Antigene in Blut bzw. Urin der Patienten, zum anderen auf den Nachweis Schistosomen-spezifischer Antikörper.

Der Nachweis von zwei frei zirkulierenden Schistosomen-Antigenen stellt seit einigen Jahren das aussichtsreichste Verfahren zur Etablierung einer Immundiagnose der Bilharziose dar. Dabei handelt es sich um die beiden Antigene CCA und CAA (circulating cathodic/anodic antigen), die mit Hilfe monoklonaler Antikörper diagnostiziert werden. Das Projekt wird vorwiegend von der Arbeitsgruppe Deelder in Leiden betrieben (DEELDER et al., 1989). Der entscheidende Vorteil des Nachweises von zirkulierenden Antigenen ist, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Antigenmenge und der Stärke der Infektion (Wurmlast) besteht. Dies gestattet, daß die Behandlung einer Chemotherapie in Bezug auf die Wirkung verfolgt werden kann (FELDMEIER, 1993). In mehreren Studien wurde der Einsatz der beiden Antigene in verschiedenen Verfahren getestet. Beim Nachweis einer *S. mansoni* Infektion mit CAA konnte z.B. im MBAC-EIA (magnetic bead antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay) eine Sensitivität von 88-89 % und eine 100%ige Spezifität erzielt werden (GUNDERSEN et al., 1992). Ähnliche Erfolge wurden beim Nachweis von CCA und/oder CAA im Blut bzw. im Urin bei Infektion mit *S. japonicum* (QIAN & DEELDER, 1993) und *S. mansoni* (VAN ETTEN et al., 1994) erzielt. Der wesentliche Nachteil dieses Verfahrens liegt in der geringen Sensitivität bei leichten Infektionen. Weiter zeigte sich in einer epidemiologischen Feldstudie in Mali, dass die Erwartungen in Bezug auf Sensitivität und Spezifität des Diagnoseverfahrens nicht erfüllt werden konnten (TRAORÉ, 1994).

Zum Nachweis spezifischer Antikörper stehen unterschiedliche serologische Verfahren zur Verfügung. Es werden z.B. folgende Methoden eingesetzt:

Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT), hier werden im Patientenserum vorhandene Antikörper mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten von adulten Schistosomen nachgewiesen. Eine andere, einfachere Technik ist der COP-Test (circumovaler Präzipitationstest). Der Nachweis beruht auf der Bildung von Präzipitatlinien um Schistosomeneier aufgrund sekretorischer Ei-Antigene. Daneben existieren noch zahlreiche modifizierte ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) und RIA- (radio immunosorbent assay) -Verfahren (allg. Übersicht BERGQUIST,

1990 und FELDMEIER, 1993). Ein weiteres Verfahren ist die Westernblotanalyse mit Wurmhomogenat (RUPPEL et al., 1988).

Für den Nachweis parasitenspezifischer Antikörper gibt es eine Vielzahl von Antigenpräparationen. Oft werden lösliche Ei- Antigene (SEA) oder lösliche Wurmantigene (SWAP) eingesetzt, mit denen Sensitivitäten über 90 % erzielt wurden (JANITSCHKE et al., 1987 & BOCTOR et al., 1987). Eine der besten Antigenpräparationen ist CEF6 (cationic exchange fraction 6). In epidemiologischen Studien konnte für dieses Antigen der Nachweis erbracht werden, daß es sich hervorragend für Serodiagnoseverfahren eignet. Es konnte allerdings nur in geringen Mengen präparativ dargestellt werden (DOENHOFF et al., 1990 & 1993). Daneben existiert eine Reihe weiterer Antigene wie z.B. die Wurmantigene Sm32 und Sm31, die zum Teil auch schon rekombinant dargestellt werden (Übersicht siehe WEISS & JUNGHANSS, 1990).

### **A-3 Zielsetzung der Arbeit**

Durch die Entwicklung neuer Medikamente ist die Mortalitätsrate bei der Bilharziose in den letzten Jahren zwar gesunken, in der Folge der Errichtung neuer Bewässerungsanlagen und damit Schaffung neuer Biotop für die als Zwischenwirte dienenden Süßwasserschnecken hat die Zahl der Neuinfektionen jedoch insgesamt zugenommen. Dabei kommt es nicht nur zur Vermehrung der lokal bereits vorhandener Parasiten, sondern infolge der Verbreitung neuer Schneckenarten auch zum Auftreten neuer Schistosomen-Spezies. Die verstärkte Mobilität der Weltbevölkerung, gerade auch in den Entwicklungsländern, trägt zur Verbreitung der Erregerarten ebenfalls bei.

Zur Bekämpfung der Seuche ist die Kenntnis der Erregerspezies wichtig, u.a. weil manche Medikamente nur gegen bestimmte Schistosomenarten wirken und weil Kontrollmaßnahmen auch die Bekämpfung der Zwischenwirte einschließen müssen, wenn sie wirkungsvoll sein sollen, die für die einzelnen Schistosomen unterschiedlichen Zwischenwirte jedoch verschiedene Biotop bevorzugen. Daher haben wir uns zum Ziel gesetzt, ein Diagnoseverfahren zu entwickeln, welches die Diskriminierung unterschiedlicher Erregerarten zuläßt.

Die verschiedenen Schistosomenarten werden heute hauptsächlich anhand ihrer in Stuhl oder Urin anzufindenden, morphologisch unterschiedlichen Eier identifiziert, wobei diese Untersuchungen relativ aufwendig und wenig empfindlich sind. Neu entwickelte immundiagnostischen Methoden (HAKANGARD, C., DEELDER, A.M., GABONE, R. M. NILSSON, L. A. AND OUCHTERLONY, O. 1996; KLINKERT, M.Q. et al, 1992) lassen bisher keine Differenzierung zwischen den verschiedenen Spezies zu. Wir haben durch mehrjährige eigene Arbeit und in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen ein verbessertes Immundiagnoseverfahren entwickelt, welches auf dem Nachweis Schistosomen-spezifischer Antikörper im peripheren Blut infizierter Personen beruht (KLINKERT, M.Q. et al, 1992; RINNERT, T, 1996). Das Verfahren eignet sich für den hochempfindlichen Nachweis von Infektionen mit den wichtigsten südamerikanischen und afrikanischen Erregern, *S. mansoni* und *S. haematobium*, und in eingeschränkter Weise auch für den wichtigsten asiatischen Typ, *S. japonicum*. Für diesen Test werden drei rekombinant hergestellte Antigene von *S. mansoni*, Sm31 (Cathepsin B) (KLINKERT, M.Q. et al, 1992; KLINKERT, M.Q., RUPPEL, A. and BECK, E. 1987; LIPPS, G., FÜLLKRUG, R. and BECK, E. 1996), Sm32 (Hämoglobinase) (KLINKERT, M.Q. et al, 1992; KLINKERT, M.Q., RUPPEL, A. and BECK, E. 1987; KIEßLING-PARR, 1994) und SmE16 (Calmodulin) (MOSER, D., DOEHOF, M. J., and KLINKERT, M.Q. et al, 1992; ROTH, B. 1993) einzeln oder als Mischung linienförmig auf eine Trägerfolie aufgebracht, mit Patientenserum oder Gesamtblut inkubiert, und das Vorhandensein parasitenspezifischer Antikörper durch Enzym-gekoppelte zweite Antikörper in Verbindung mit einer Farbreaktion nachgewiesen (line blot immuno assay; LIA). Die Menge des für den LIA benötigten Serums ist sehr gering und kann aus einem auf Papier eingetrockneten Tropfen Blut eluiert werden. Die Gewinnung der Blutproben im Feld erfordert keine Spritzen und vermeidet somit die Gefahr der Übertragung infektiöser Krankheiten durch den unsachgemäßen Umgang mit Kanülen, was in vielen Entwicklungsländern in starkem Maß zur Verbreitung von Infektionskrankheiten beiträgt.

Neben der Etablierung des für Feldstudien geeigneten Testverfahrens stehen als wesentliche Vorarbeiten für das Projekt der Arbeitsgruppe mehrere cDNA-Genbanken aus den verschiedenen Entwicklungsstadien von *S. mansoni*, große Zahlen von gut charakterisierten Infektionsseren aus Afrika, verschiedene zur Expression der rekombinanten Antigene geeignete Vektorsysteme und mehrere etablierte Methoden zur Reindarstellung dieser Antigene zur Verfügung.

#### **A-4. Geplante Forschungsschwerpunkte**

Zur immunologischen Charakterisierung einzelner Schistosomenarten sollen speziesspezifische Antigene in rekombinanter Form dargestellt und im Immunoblot mit Patientenseren eingesetzt werden. Die Strategie zur Isolation dieser Antigene wird sich folgendermaßen gestalten: Aus cDNA-Expressionsbibliotheken von adulten Würmern und von Eiern der wichtigsten Schistosomenarten, *S. mansoni*, *S. haematobium* und *S. japonicum* werden getrennt mit Pools von entsprechenden Patientenseren immunreaktive Klone isoliert und mit Serumpools von jeweils mit den anderen Schistosomenarten infizierten Patienten gegemessen. Antigene, welche mit jeweils nur einem Serumpool reagieren, werden dann rein dargestellt und mit größeren Zahlen von Einzelseren auf Sensitivität und Spezifität hin überprüft. Die Überprüfung der Spezifität muss auch eventuelle Kreuzreaktionen mit anderen infektiösen Erregern, insbesondere mit häufig auftretenden helminthischen Parasiten, einschließen.

Da zu erwarten ist, daß die meisten der für nur eine Schistosomenart spezifischen Antigene mit jeweils nur einer Subfraktion der entsprechenden Patientenseren reagieren wird, müssen für jede Spezies vermutlich mehrere solcher Antigene isoliert werden. Das Vorkommen monospezifischer Antigene wurde bei früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe für *S. mansoni* schon beobachtet, aber aufgrund der anders ausgerichteten Interessenlage nicht weiter bearbeitet.

## B- MATERIAL

### B-1 Bakterienstämme

#### E. coli W6 ( $\lambda$ ) rex:

Der Stamm enthält einen defekten  $\lambda$ -Prophagen und produziert konstitutiv das Wildtyp cI-Repressorgen des Bakteriophagen  $\lambda$  (REMAUT et al., 1981 & 1983).

#### E. coli 537:

E. coli C600 Stamm (m<sup>+</sup>, f<sup>-</sup>, thr<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, pro<sup>-</sup>, supE; Cold Spring Harbour, Appleyard, 1959); enthält ein Plasmid, das eine temperatursensitive Mutante des  $\lambda$ -Repressorgen cI 857 und als Selektionsmarker das Kanamycinresistenzgen trägt (KÜPPER et al., 1982).

#### E. coli Y1090:

Bei diesem Stamm (*ΔlacU169, proA<sup>+</sup>, Δton, araD139, strA, supF [trpC22::Tn10]* (pMC9 =pBR322-lacIq) handelt es sich um ein Derivat des Originalwirtsstammes von YOUNG & DAVIS, (1983a & b) zur Plattierung des Expressionsvektors  $\lambda$ gt11.

#### E. coli XL1-Blue-pREP:

recAI endAI gyr A96 thi-I hsdR 17 supE44 relAI  
lac [F' proAB lacIq ZDM15 Tn10 (Tetr)]

#### E. coli XL1-Blue-MRF'

D (mcrA) 183 *D*(merCB-hsdSMR-mrr)173 endAI supE44 thi-I recAI gyrA96 relAI  
Lac [F' proAB lacIq ZDM15 Tn10 (Tetr)]



*E. coli* XL0LR

D (mcrA) 183 *D*(merCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi- I recA1 gyrA96 relA1

Lac [F' proAB lacIq *ZDM*15 Tn10 (Tetr)] Su- (nonsuppressing)  $\lambda$ r (lambda resistant)

**B-2 Parasiten**

*S. mansoni* Eier das von der WHO zur Verfügung gestellt wurde (E. BECK, Gießen)

*S. japonicum* Adults-Würmern, das von einer australischen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde.

**B-3 Antibiotika**

Ampicillin, Serva, Heidelberg

Kanamycinsulfat, Merck und Co. Darmstadt

Tetracyclin, Serva, Heidelberg

**B-4 Kulturmedien und Platten**

Standard I Nährbouillon, Merck und Co. Darmstadt

Standard I Platten: Standard I Nährbouillon mit 1,5% (w/v) Bacto Agar (Difco)

NZYDT-Platten: 21,1 g/l mit 1,5% ) Bacto Agar

NZYDT-Weichagar: 21,1 g/l mit 7 g/l Agarose (Sigma)

NZY-Medium: 1% Bacto-Tryptone, 0,5% Bacto-Yeast-Extract, 0,5% NaCl, 0,2% MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

*Antibiotikaplatten:*

Standard I Platten mit Antibiotika folgender Konzentrationen:

Ampicillin: 100 µg/ml

Kanamycin: 25 µg/ml

## **B-5 Antiseren und Immunreagentien**

Die verwendeten Antiseren werden bei - 20°C in 50% Glycerin gelagert.

### **B-5-1 Infektionsseren**

Die Seren der chronisch infizierten Afrikaner stammen aus

- einer Feldstudie, die in Zusammenarbeit mit der „Ecole Nationale de Medecine et de Pharmacie du Mali“ in dem Zeitraum von 1989 bis 1991 durchgeführt wurde. Diese Seren sind überwiegend spezifisch für *S. mansoni*. Ein gewisser Teil der Patienten war aber sowohl mit *S. mansoni* als auch mit *S. haematobium* infiziert.
- einer Feldstudie, die von der Arbeitsgruppe von Dr. Grace Adeoye, Universität Lagos, in Nigeria durchgeführt wurde. Diese Seren stammen von Patienten mit einer *S. haematobium* Infektion.

### **B-5-2 Kontrollseren**

Als Kontrollen werden zum einen die Seren von ehemaligen Labormitarbeitern der Arbeitsgruppe E. Beck (ZMBH, Universität Heidelberg) und die Seren von Blutspendern der Blutbank der Universitätsklinik Gießen und zum anderen die Seren von Labormitarbeitern der Ecole Nationale de Medecine et de Pharmacie du Mali, Bamako, Mali eingesetzt. Es wurde davon ausgegangen, dass keiner der Serumspender mit Schistosomen infiziert ist bzw. war.

### **B-5-3 Alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper**

Ziege-anti-Humanserum IgG, Fc-Fragmentspezifität, 0,6 mg/ml (Dianova, Hamburg)

Ziege-anti-Humanserum IgE, Fc-Fragmentspezifität, 0,6 mg/ml (Dianova, Hamburg)

Ziege-anti-Humanserum IgA,  $\alpha$ -Kettenspezifität, 0,3 mg/ml (Dianova, Hamburg)

Ziege-anti-Humanserum IgM, Fc<sub>5μ</sub> Fragmentspezifität, 0,3 mg/ml (Dianova, Hamburg)

## **B-6 Nucleinsäuren und Nucleotide**

### **B-6-1 Schistosomen-cDNA**

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendete cDNA-Bank handelte es sich um eine  $\lambda$ gt11-Ei-cDNA-Bank und eine *S. japonicum*  $\lambda$ ZAPII -cDNA-Bank aus adulten Würmern.

### **B-6-2 Plasmide**

pBluescript SK, Phagemid (Firma Stratagene)  
 pDS-Sti2-His (Beck, unveröffentl. Daten)  
 pDS56/RBSII-6xHis (STÜBER et al., 1990)  
 pEx34c (ein Derivat von pEx31b, STREBEL et al., 1985)  
 pQE-ZAP (Sané, unveröffentl. Daten)  
 pREP4 (GOTTESMANN et al., 1981)

### **B-6-3 Nitrocellulosemanbran:**

Hybond-C, Amersham UK  
 BA 85, Schleicher und Schuell

### **B-6-4 Oligonucleotide**

Die Oligonucleotide wurden im Labor von Dr. J. H. HEGEMANN am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Gießen synthetisiert beziehungsweise bei der Firma Pharmacia, Freiburg, erworben.

#### **MS2-primer :**

AGAAGGTTTC TTACATGAC

(entspricht Codons 80-85 der MS2-Polymerase, plus-Strang)

#### **MS2-N :**

ATTACCCATG GCGAAGAC

(nahe N-Terminus der MS2-Pol.)

**pex<sup>-</sup>:**

ATCACCGAAA CGCGCGAGGC

(Pos. 2088-2069 in pBR322, minus-Strang)

**pDS-3':**

GAGTTCTGAG GTCATTACTG

(pDS56/RBSII-6xHis, minus-Strang pos. 191-210)

**pBR-322:**

CGTATCACGA GGCCCTTTTCG

(pBR322, plus-Strang pos. 4333-4352)

**pDS-forw:**

AGCGGATAAC AATTCACAC A

**lambda gt11-forw:**

TGGCGACGAC TCCTGGAGCC CG

**lambda gt11-rev:**

ACACCAGACC AACTGGTAAT G

**sti11 forw:**

CTGGTTCCGG CGATGGCGAC GACTCCTGGA GCCCG

zusammen mit

**sti11rev:**

CTCGCTCCGG CGACACCAGA CCAACTGGTA ATG

(für PCR mit lambda gt11-Fragmenten)

**sti plus:**

AATTCACTGG TTCCGGCGCC GGAGCGAGT

zusammen mit

**sti minus:**

AGCTTACTCG CTCCGGCCGCC GGAACCAGT

(Einführung einer sti-Klonierungsstelle zwischen EcoRI und HindIII)

**sti His-1:**

AATTACATCA CCATCACCAT CACG

zusammen mit

**sti His-2:**

AATTCTGGAT GGTGATGGTG ATGT

(zur Einführung eines N-terminalen His-tails für pDSsti-exprimierte polypeptide)

**Oligonucleotid ZAPApus:**

5'AA' TTG'AAT'TCG'GCG'GCC'GCT'CTA'GAA'CTA'GTG'GAT'CCT'CGA'GGG'CCC'GGT'ACC'A3'  
(54mer)

(5'AA'TTG'AAT'TCG'GCG'GCC'GCT'CTA'GAA'CTA'GTG'GAT'CCT'CGA'GGG'CCC'GGT'ACC'A3')

**Oligonucleotid ZAPAmminus:**

5'AG'CTT'GGT'ACC'GGG'CCC'TCG'AGG'ATC'CAC'TAG'TTC'TAG'AGC'GGC'CGC'CGA'ATT'C3'  
(54mer)

(5'AG'CTT'GGT'ACC'GGG'CCC'TCG'AGG'ATC'CAC'TAG'TTC'TAG'AGC'GGC'CGC'CGA'ATT'C3')

**B-6-5 Nucleotide**

Desoxynucleotide (Boehringer Mannheim)

Didesoxynucleotide (Pharmacia, Freiburg)

**B-7- Enzyme**

**B-7-1 Restriktionsendonucleasen**

Die Restriktionsendonucleasen BamHI, Bgl II, HindIII und NgoMI stammen von Roche (ehemalige Boehringer Mannheim), die Enzyme EcoRI, EcoRV, HpaI, NarI, NotI, NsiI, PstI, PvuI, Sal I, SmaI, SpeI, SspI, XbaI und XhoI von NEB New England Biolabs, Schwalbach.

**B-7-2 Sonstige Enzyme**

DNA-Polymerase Klenow-Fragment	(Boehringer Mannheim)
RNase A	(Boehringer Mannheim)
T4-DNA-Ligase	(AGS, Heidelberg)
T4- DNA-Polymerase	(Boehringer Mannheim)
T7-- DNA-Polymerase	(Promega, Heidelberg)
Taq-DNA-Polymerase	(Promega, Heidelberg)
Urease Type VI	(Sigma, Deisenhofen)

## B-8 Größenstandards

### B-8-1 DNA-Größenstandard

pSP64: HindIII, DraI und HinfI geschnitten (E. Beck, Gießen): Angaben in bp

2999 2288 1198 692 517 396 354 218 176

### B-8-2 Protein-Größenstandards

Größenstandard (Labormischung; E. Beck, Gießen)

Prestained- Größenstandard (low molecular weight, Biorad, München)

Proteine	Biorad	Labormischung
Phosphorylase B	110	-
Rinderserumalbumin		66 (200ng/μl)
Ovalbumin	81	45 (400 ng/μl)
Carboanhydrase	84	31 (200 ng/μl)
Trypsin-Inhibitor	47	21 (800 ng/μl)
Myoglobin	33	17,8 (200 ng/μl)
Lysozym	24	-
Cytochrom C	20,200	12,5 (200 ng/μl)
Aprotinin	16	6,5 (400 ng/μl)
Glucagon	-	3,5 (400 ng/μl)
	-	

**Protein-Größenstandards. Angaben in kDa**

### B-9 Affinitätsmatrices

TALON-Matrix zur Proteinaufreinigung (ClonTech, Heidelberg)

Ni-NTA-Agarose zur Proteinaufreinigung (Qiagen, Hilden)

Ni-NTA-Konjugat, gekoppelt an Alkalische Phosphatase (Qiagen, Hilden)

## B-10 Chemikalien

Alle sonst nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Bachem, Heidelberg

Biomol, Hamburg

Boehringer Mannheim, Mannheim

Merck, Darmstadt

Serva, Heidelberg

Sigma, Deisenhofen

Roth, Karlsruhe

### B-10-1 Spezielle Chemikalien

Acrylamid	(Serva)
Agarose für Gelelektrophorese	(Sigma)
Albumin Rinderserum Fraktion V (BSA)	(Roth)
Ammoniumpersulfat (APS)	(Serva)
Ampicillin	(Sigma)
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	(Gerbu)
Coomassie Brilliant Blue R250	((Serva)
N,N-Dimethylformamid (DMF)	(Roth)
Dithiothreitol (DTT)	(Biomol)
Ethidiumbromid	(Serva)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Serva)
Guanidiniumhydrochlorid (GHC)	(ICN)
Harnstoff	(ICN)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranose (IPTG)	(Gerbu)
Kanamycinsulfat	(Serva)
$\beta$ -Mercaptoethanol	(Serva)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(Roth)
Nitroblautetrazolium (NBT)	(Gerbu)
Nitrocellulose	(Schleicher & Schuell)
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin	(TEMED) (Serva)

Tween-20 (Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat)	(Serva)
Triton X-100	(Merck)
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	(Roth)

### **B-10-2 Fertig-Kits**

DIG DNA Labelling and Detection Kit (Boehringer Mannheim)

T7-DNA-Sequenzierungs-Kit (Pharmacia, Freiburg)

EasyPure DNA Purification Kit (Biozym, Hess. Oldendorf)

Plasmid DNA Präparation-Kit (Pharmacia, Freiburg)

Ligation-Kit (Eppendorf)

### **B-11 Lösungen und Puffer**

Alle Puffer sind in ihren Endkonzentrationen angegeben. Bei den Angaben der Stocklösungen in Klammern handelt es sich um die empfohlenen Konzentrationen der anzusetzenden Lösungen.

#### **B-11-1 Puffer für molekularbiologische Methoden**

<u>Ligase-Puffer</u> (für T4-Ligase)	50 mM	Tris-HCl
(Stocklösung 10x)	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
pH 8,0	0,5 mM	ATP
	1 mM	DTT
	1 mM	EDTA
	50 mM	NaCl
<u>T4-Polymerase-Puffer</u>		
(Stocklösung 10x)	700 mM	Tris-HCl
pH 8,0	1 M	K-Acetat
	70 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	DTT
	0,2 %	BSA



10xPolymerase-Puffer

pH 7,0	200 mM	Tris-HCl
	60 mM	MgCl <sub>2</sub>
	500 mM	KCl
	10 mM	DTT

Sol A

pH 8,0	25 mM	Tris-HCl
	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA

Sol B

0,2 M	NaOH
1 %	SDS

Sol C

pH 4,5	3 M	Na-Acetat
	2 M	Essigsäure

TE-Puffer

(Stocklösung 100x)	10 mM	Tris-HCl
pH 8,0	0,1 mM	EDTA

**B-11-2 Gelelektrophorese Puffer****B-11-2-1 DNA-Gele**TAE-Puffer

(Stocklösung 10x)	40 mM	Tris-OH
pH 8,0	40 mM	Na-Acetat
	2 mM	EDTA

TBE-Puffer

(Stocklösung 10x)	90 mM	Tris-Borat
pH 8,3	2,5 mM	EDTA

<u>Farbmarker nativ (FM)</u>	0,4 mg/ml	Xylencyanolblau
	0,2 mg/ml	Bromphenolblau
	0,1 mM	EDTA
	75 %	Glycerin
<u>Färbelösung für DNA-Gele</u> (Stocklösung 10.000x)	2 µg/ml	Ethidiumbromid

### **B-11-2-2 Protein-Gele**

<u>Probenpuffer für Proteine (2x)</u> pH 6,8	125 mM	Tris-HCl
	10 %	β-Mercaptoethanol
	20 %	Glycerin
	4 %	SDS
	0,02 %	Bromphenolblau

<u>Acrylamidlösung (30:1)</u> pH 6,8	30 %	Monoacrylamid
	0,75 %	Bisacrylamid

<u>Sammelgelpuffer</u>  (Stocklösung 4x)	125 mM	Tris-HCl
	0,1 %	SDS

<u>Trenngelpuffer</u> (Stocklösung 4x) pH 8,8	375 mM	Tris-HCl
	0,1 %	SDS

<u>Tris-Glycin-Puffer (TG)</u> (Stocklösung 10x)	25 mM	Tris-OH
	192 mM	Glycin
	0,1 %	SDS

<u>Färbelösung für Proteingele</u>	0,1 %	Coomassie Blau
	50 %	Ethanol
	10 %	Essigsäure

<u>Entfärbelösung für Proteingele</u>	5 %	Ethanol
	7,5 %	Essigsäure

## **B-11-3 Puffer und Lösungen für Western-Blot, das Screening und den Line-Blot**

### **B-11-3-1 Standardpuffer**

<u>Denaturierungslösung</u>	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS

<u>Neutralisierungslösung</u>	200 mM	Tris-HCL
pH 7,0		

<u>Transferpuffer</u>	25 mM	Tris-OH
(TG-Puffer+Ethanol)	192 mM	Glycin
	10 %	Ethanol

<u>1x TBST-Puffer</u>	10 mM	Tris-HCl
(Stocklösung 20x)	150 mM	NaCl
pH 8,0	0,05 %	Tween 20

<u>1x TBS-Puffer</u>	10 mM	Tris-HCl
(Stocklösung 20x)	150 mM	NaCl
pH 8,0		

### **B-11-3-2 Antigenverdünnungspuffer**

<u>Ag-Puffer 1</u>	1 x	TBST
	0,2 %	Tween 20
	10 %	Glycerin
	1 mM	DTT
<u>Ag-Puffer 2</u>	1 x	TBS
	10 %	Glycerin

Ag-Puffer 3

1 × TBS  
 10 % Glycerin  
 1 mM DTT

Ag-Puffer 4

1 × TBS  
 10 % Glycerin  
 1 mM DTT  
 1 mM CaCl<sub>2</sub>

**B-11-3-3 Antikörperverdünnungspuffer**Ak-Puffer 1

1 × TBST  
 1 % BSA  
 1 mM DTT

Ak-Puffer 2

1 × TBST  
 1 % BSA  
 1 mM DTT  
 3 mM EDTA

**B-11-3-4 Waschlösung und Puffer für die Farbreaktion**Waschpuffer

1 × TBST  
 0,5 M NaCl

Alkalische-Phosphatase-Puffer

pH 9,5

100 mM Tris-HCl  
 100 mM NaCl  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Stop-Mix

pH 8,0

10 mM Tris-HCl  
 1 mM EDTA

Absättigungspuffer

1 × TBST  
 1 % Tween 20

<u>Colloidal-Gold und Protein A Puffer</u>	0,1 %	Tween 20
	1 x	PBS
	0,1 %	PEG 2000

### **B-11-3-5 Färbelösungen**

BCIP -Lösung                      50 mg/ml      BCIP (Bromochlorindolylphosphat)  
in 100%igen DMF (Dimethylformamid)

NBT-Lösung                      50 mg/ml      NBT (Nitrobluetetrazolium)  
in 70%igen DMF

### **B-12 Fotomaterial und Röntgenfilme**

Agfa Rodimal, Negativentwickler	(Agfa-Gevart, Leverkusen)
Ilford Ilfospeed, Papierentwickler	(Ilford Limited Mobberley, Cheshire)
Ilford Pan F, 18 Din, Negativfilm	(Ilford Limited Mobberley, Cheshire)
Ilford RC DE LUXE, Fotopapier	(Ilford Limited Mobberley, Cheshire)
Kodak X-omat XAR5 Röntgenfilme	(Eastman Kodak, Rochester, NY)
Polaroid 667 Professional	(Polaroid Corporation, Cambridge, MA)
Tetenal Negativfixierer	(Tetenal Photowerk, Norderstedt)
Tetenal Papierfixierer	(Tetenal Photowerk, Norderstedt)

### **B-13 Geräte**

#### **B-13-1 Blot-Apparatur**

Fast-Blot-Apparatur                      (Biometra, Göttingen)

#### **B-13-2 Gel-Elektrophorese-Systeme**

Horizontales Minigel-System	(AGS, Heidelberg)
Minigelkammern	(Keutz, Reiskirchen)
Spannungsgeber EPS 500/400	(Pharmacia, Freiburg)

Spannungsgeber 2297 Macrodrive 5	(LKB, Bromma, Schweden)
Geltrockner	(Biorad, München)

### **B-13-3 Zentrifugen**

Kühlzentrifugen	J2-21 (Beckman Instruments, Summerset) Mit den Rotoren JA 10, JA 14, JA 17, JA 20 Minifuge 2 (Heraeus, Hanau)
Tischzentrifugen	Biofuge A (Heraeus, Hanau) 5415 (Eppendorf Gerätebau, Hamburg)

### **B-13-4 Schüttler**

Bakterien-Schüttler Typ 3020	(Gesellschaft für Labortechnik, Burgweldel)
Certomat R	(Braun, Melsungen)
Diffusions-Entfärbeapparatur	(Desaga, Heidelberg)
Mixer 5432	(Eppendorf Gerätebau, Hamburg)

### **B-13-5 PCR-Geräte**

Gene ATAQ Controller	(Pharmacia, Freiburg)
UNO Thermoblock	(Biometra, Göttingen)

### **B-13-6 Geräte für Ultraschall-Aufschluss**

Desintegrator Sonoplus HD70	(Bandelin Electronic, Berlin)
Mikrospitze UW	(Bandelin Electronic, Berlin)

### **B-13-7 ELISA-Reader**

Microplate Reader 3550-UV	(Biorad, München)
Precision Microplate Reader Emax	(MWG Biotech, Ebersberg)
Microplate Reader MR5000	(Dynatech, Burlington, MA)
ELISA plate washer	(Dynatech, Burlington, MA)

## **B-14 Sonstiges Material**

Zeichenkegel 1mm Durchmesser (Rotring, Hamburg)

Zeichenbrett DIN A4 (Rotring, Hamburg)

Inkubationswannen Acutran (Schleicher und Schuell, Dassel)

Standard Mikrotiterplatten (Greiner, Solingen)

## **C- METHODEN**

### **C-1 Immunologische Methoden**

#### **C-1-1 Immunoscreening der $\lambda$ gt11/ $\lambda$ ZAPII-Expressions-cDNA-Genbanken**

Rekombinante  $\lambda$ gt11 bzw.  $\lambda$ ZAPII Phagen, die für immunreaktive Proteine kodieren, wurden mit Hilfe eines Humanserumpool (10 Seren, welche stark positiv reagieren, wurden zu einem Pool gemischt) nach der Methode von Young & Davis (1983a & b) aus der *S. mansoni*  $\lambda$ gt11-Ei-cDNA-Genbank und aus der *S. japonicum*  $\lambda$ ZAPII - cDNA-Genbank aus adulten-Würmern isoliert.

##### **C-1-1-1 Plattieren der cDNA-Genbanken**

Die cDNA-Genbanken wurden wie unter(C-3-5) beschrieben in einer Dichte von etwa  $4 \times 10^4$  pro NZY-Agaroseplatte (12x12cm) ausplattiert und bei 42°C inkubiert (die Plaques sollten gerade erkennbar sein).

##### **C-1-1-2 Induktion von $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteinen**

Danach wurden zuvor in 10mM IPTG getränkte und bei Raumtemperatur getrocknete Nitrocellulose-Filter luftblasenfrei aufgelegt und 2-3h bei 37°C weiter inkubiert. Die Position der Filter wurde durch Einstechen mit der Spitze einer Pasteurpipette markiert und die Filter vorsichtig abgehoben. Die Platten müssen vor Abnahme der Filter für ca 20 min in den Kühlraum gestellt werden (der Weichagar könnte an den Filtern kleben bleiben). Zur Anfertigung von Duplikaten kann nach Entfernung des ersten Filters ein zweiter aufgelegt und nochmals für 3 h bei 37°C inkubiert werden.

##### **C-1-1-3 Reaktion mit dem Antiserum**

Vor der Inkubation der Filter mit dem Antiserum werden freie Proteinbindungsstellen auf den Nitrocellulosefiltern abgesättigt, indem sie 1 h bei RT in 1% BSA,  $1 \times$  TBS, und 0.05% Tween (Blocking-Solution) inkubiert werden (BATTEIGER et al, 1982). Zur Bindung des ersten Antikörpers wurden die Filter für 3 - 4 h bei RT oder über



Nacht bei 4°C in 1: 200 bis 1: 1000 (in 0.5 % BSA, 1 × TBS, 0.05 % Tween) verdünntes präabsorbiertes Antiserum gelegt. Dieses präabsorbierte Serum muss im Voraus zubereitet werden.

Nach der Inkubation werden die Filter dreimal für je 10 min mit 1 × TBST gewaschen, um überschüssiges Antiserum zu entfernen.

#### Präabsorption des Humanserums:

a)- Extrakt aus  $\lambda$ gt11-infizierten Zellen:

Auf die benutzten Platten der am Vortag gescreenten Genbank wurden jeweils 2,5 ml 1 × TBST gegeben, ca 20 min stehen lassen und gelegentlich geschüttelt. Der Überstand wurde abgesaugt und 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert, um Bakterien zu entfernen. In den klaren Überstand wurden danach 10 × 10 cm Nylon-Filter gelegt (5 min). Anschließend wurden die Nylon-Filter einmal mit TBST gewaschen, dann in 1% BSA in 1 × TBST gelegt (1 min).

b)- Präadsorption des Humanserums:

200  $\mu$ l des „Humanserumpool“ wurden in 20 ml 1 % BSA, 1 × TBST verdünnt, einer der präparierten Nylon-Filtern eingelegt und 2 h bei 4°C leicht geschüttelt. Dann wurde der erster Filter durch weitere präparierte Nylon-Filter ersetzt und 2 bis 3 h weiter geschüttelt. Danach wurden die Nylon-Filter entfernt und das präadsorbierte Serum bei 4°C gelagert.

#### **C-1-1-4 Nachweis der Bindung antigenspezifischer Antikörper**

Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch Inkubation der Filter mit an alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Human-Antikörpern (IgG) (1: 7500 in 1 % BSA, 1 × TBST verdünnt). Überschüssiges Antiserum wurde wie oben durch dreimaliges Waschen entfernt.

Die Farbreaktion lief in Alkalischem Phosphatase- (AP) Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) ab und beruhte auf der Umsetzung von BCIP und NBT zu einem unlöslichen Farbstoff.

Beide Substanzen wurden frisch zugesetzt, 30 µl BCIP-Lösung (50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid) und 30 µl NBT-Lösung (50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid) auf 10 ml Puffer. Die Filter wurden einzeln in AP-Farbsubstrat-Lösung gelegt und die Farbentwicklung beobachtet. Die Anfärbung dauert in der Regel 2 - 10 min und geht bis zu 4 h weiter, wenn sie nicht gestoppt wird. Die Farbreaktion wurde durch Überführen der Filter in Stop-Mix (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM EDTA) beendet. Die Nitrocellulose-Filter wurden anschließend getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

### **C-1-1-5 Isolation von Phagen**

Die positiven Plaques wurden durch Einstechen mit der Spitze einer Pasteurpipette vorsichtig isoliert und in Eppendorfröhrchen mit 1 ml Phagenpuffer überführt. Davon wurden zwei bis drei Verdünnungen ( $10^{-2}$  bis  $10^{-4}$ ) auf 9 cm NZY-Platten wieder ausplattiert. Die Platte mit der günstigsten Zahl von Plaques (mehrere 100) wurde wie zuvor erneut gescreent. Nach viermal Screenen wurden saubere abgetrennte positive Plaques isoliert.

### **C-1-1-6 Phagen-Lysate**

Um die Phagen auf lange Zeit lagern zu können, wurde aus jedem isolierten positiven Plaque ein Lysat wie folgt hergestellt:

$10^4$  Phagen wurden jeweils auf einer 8 cm NZY-Platte mit 3 ml Weich-Agar plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden auf jede Platte 1.5 ml NZY Medium zugegeben und 2 bis 3 h bei RT schütteln gelassen. Danach wurde jeder Überstand 1 min zentrifugiert und in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. Nach Zugabe von jeweils 20 µl  $\text{CHCl}_3$  wurden die Phagen-Lysate bei 4°C gelagert.

### **C-1-2 Western-Blot-Analyse**

Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe einer Fast-Blot-Apparatur von Polyacrylamid-Gelen auf Nitrocellulose übertragen. Dazu wurden nacheinander ein Whatman-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das Proteingel und wiederum ein Whatman-Papier, jeweils mit Transferpuffer getränkt,

übereinandergelegt. Der Transfer wurde bei einem Minigel für 1 h bei 70 mA durchgeführt. Zur Kontrolle des Blots wurde das Proteingel mit Coomassie angefärbt.

Transferpuffer: 1 × Tris/Glycin-Puffer, 20 % Methanol

Zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen wurde die Nitrocellulose nach der Transfer 30 min bis 1 h mit 3 % BSA in TBST-150 inkubiert. Die Reaktion mit Antiserum erfolgt mindestens 1 h in 1 × TBST, 1 % BSA (Verdünnung abhängig vom eingesetzten Serum). In Anschluß an die Inkubation mit dem Antiserum wurde die Nitrocellulose mit 1 × TBST mehrmals gewaschen.

Anschließend erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper wie beim Immunoscreening durch Inkubation mit einem alkalische Phosphatase-konjugierten zweiten Antikörper (1: 7500 verdünnt in 1 × TBST, 1 % BSA) und Farbreaktion wie unter C-1-1-4 beschrieben.

### **C-1-3 Line-Blot**

Bei diesem von ROSSI et al (1991) erstmals beschriebenen Verfahren wurden Antigene mit Tuschestiften (Zeichenkegel) direkt auf Nitrocellulose aufgetragen. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip des indirekten ELISA. Die benötigten Antigene wurden in einem geeigneten Antigenverdünnungspuffer (Ag-Puffer) in die Tuschestifte gefüllt (ca 100 µl pro Stift) und anschließend als durchgehende Linie auf die Nitrocellulose aufgetragen. Darauf folgt eine Absättigung der Nitrocellulose mit 1 × TBST, 1 % Tween 20 für 30 min. Die Nitrocellulose wurde mit Hilfe eines Streifenschneiders senkrecht zur Auftragsrichtung der Antigene in 4 mm breite Streifen geschnitten. Diese präparierten Streifen stellen das Ausgangsmaterial für die Diagnose dar. Die zu untersuchenden Humansenen (Infektionsseren und Kontrollseren) wurden in einem geeigneten Antikörperverdünnungspuffer (Ak-Puffer) eingesetzt. Es wurden 500 µl des Ak-Puffer plus 5 µl des zu untersuchenden Serums (Endkonzentration: 1:200) in Inkubationswannen vorgegeben. Die präparierten Streifen wurden für 1 Stunde auf einem Diffusions-Schüttler in den Serumverdünnungen inkubiert. Es folgten drei gemeinsame 10minütige Waschschrte der NC-Streifen in 150 bis 250 ml Waschlösung (1 × TBST, 0.5 M NaCl). Danach folgte der Inkubationsschritt mit dem zweiten Antikörper (IgG-Fc, alkalische Phosphatase konjugiert) für eine Stunde in Ak-Puffer in einer 1: 7000 Verdünnung.

Es wurden je 500  $\mu\text{l}$  pro Streifen in die Inkubationswannen vorgegeben. Anschließend erfolgte ein Waschschrift wie oben und die Farbreaktion wie unter C-1-1-4 beschrieben.

## **C-2 Molekularbiologische Methoden**

### **C-2-1 Untersuchung rekombinanter Phagen**

#### **C-2-1-1 Bestimmung der cDNA-Länge in Lambda gt11 mit PCR**

Isolierte Phagen-Plaques wurden aus Agar-Platten ausgestochen und in 500  $\mu\text{l}$  Phagenpuffer suspendiert. Von jeder Phagen-Suspension wurden 2  $\mu\text{l}$  abpipettiert und in ein Eppendorfröhrchen mit 100  $\mu\text{l}$  Wasser überführt, kurz gevortext und zur DNA-Denaturierung 10 min lang in ein kochendes Wasserbad gestellt. Die Proben wurden danach rasch abgekühlt. Somit bleiben die Einzelstränge getrennt. Von jeder Probe wurden jeweils 2  $\mu\text{l}$  als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

2  $\mu\text{l}$  Template (aufgekochte Phagen-Suspension)

1  $\mu\text{l}$  10  $\times$  Taq-Puffer (Promega)

1  $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$

1  $\mu\text{l}$  dNTPs (2,5 mM)

1  $\mu\text{l}$   $\lambda\text{gt11}$  forward primer (20  $\mu\text{M}$ )

1  $\mu\text{l}$   $\lambda\text{gt11}$  reverse primer (20  $\mu\text{M}$ )

0,2  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase (5 Units pro  $\mu\text{l}$ )

mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 10 l Gesamtvolumen auffüllen und

mit 10  $\mu\text{l}$  Paraffinöl überschichten und in einen Thermocycler stellen.

Die einzelnen Temperaturschritte betragen für insgesamt 35 Zyklen:

Denaturierung: 30 s 94°C

Annealing: 60 s 60°C

Polymerisation: 90 s 72°C

Nach Beendigung des Zyklus wurden die Proben auf einem Stück Parafilm mit einem Tropfen Auftragspuffer gemischt und auf ein 1 % Agarose- oder 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Danach wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung gefärbt, gewässert und auf einem UV-Schirm betrachtet und fotografiert.

### **C-2-1-2 Präparative PCR**

Zur Subklonierung in den Expressionsvektor pDS-Sti2 wurde die cDNA aus  $\lambda$ gt11-Phagen durch spezieller Primer (sti2-11 forward und sti2-11 reverse) mittels PCR um die sog. „sticky“-Sequenzen verlängert, die zur Insertion in den Vektor dienen (s. Ergebnisse **Abb. 7**). Als Template diente jeweils eine geringe Menge der analytischen mit den Primern  $\lambda$ gt11 forward und  $\lambda$ gt11 reverse gewonnenen PCR-Ansätze.

2  $\mu$ l Template (Aliquot des entsprechenden analytischen PCR-Fragmentes)

3  $\mu$ l 10 $\times$  Taq-Puffer (Promega)

3  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>

3  $\mu$ l dNTPs (2,5 mM)

1  $\mu$ l sti2-11 forward (10  $\mu$ M)

1  $\mu$ l sti2-11 reverse (10  $\mu$ M)

1  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 Units/ $\mu$ l)

auf 30  $\mu$ l mit H<sub>2</sub>O auffüllen und mit Paraffin überschichten. Die Amplifikation erfolgte in insgesamt 25 Zyklen:

Denaturierung: 30 sec 94°C

Annealing: 30 sec 60°C

Polymerisation: 60 sec 72°C

Nach elektrophoretischer Auftrennung und kurzem Anfärben mit Ethidiumbromid wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des EASY PURE Kits (Biozym) nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Ein Aliquot der DNA wurde auf einem Agarosegel analysiert.

## **C-2-2 Enzymatische Reaktionen an DNA**

### **C-2-2-1 Restriktion von DNA**

Zum Zweck einer Ligation oder einer Identifizierung positiver Klone, wurde die endonukleolytische Spaltung von DNA nach den Standardvorschriften (SAMBROOK et al., 1989) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die einzelnen Enzyme entsprachen dabei den Angaben der jeweiligen Hersteller. Präparative DNA-Restriktionen wurden für 2-3h inkubiert während für analytische Zwecke eine Reaktionszeit von einer Stunde berechnet wurde. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde durch Trennung der Fragmente in Agarose-Gelen überprüft.

### **C-2-2-2 Einfüll-Reaktion**

Bei der Klonierung war meist eine Einfüll-Reaktion erforderlich. Dabei handelt es sich um überhängende Enden von Restriktionsfragmenten das man erst zu Blunt-Enden umwandeln sollte. Überhängende 5' -Enden von DNA-Fragmenten könnten durch T4 DNA Polymerase effizient mit dNTPs aufgefüllt, 3' -überhängende Enden durch die 3'→5'- Exonuklease-Aktivität der DNA Polymerase I (Klenow) abgebaut werden.

Nach vollständiger Spaltung der DNA wurden direkt in den Restriktionsansatz alle 4 Nucleotide in einer Endkonzentration von 100 mM zugegeben und die Reaktion mit 100 U/ml Enzym gestartet. Nach 20 min Inkubation bei RT oder 30 min bei 11°C wurde die Reaktion gestoppt (10 min bei 75°C). Dann wurde der Ansatz mit Glasmilch (EASY PURE) gereinigt.

### **C-2-2-3 Ligation**

Die Ligation von DNA-Molekülen erfolgte mit Hilfe von T4-DNA-Ligase. Bei Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmide wurde der Vektor in einer Konzentration von 0,01-0,1 pmol/10-20 µl Reaktionsansatz eingesetzt, das jeweilige Insert im drei- bis fünffachen molaren Überschuß. Um die Insertions-Effizienz abschätzen zu können, wurde als Negativ-Kontrolle ein Ligationsansatz mit dem Vektor allein parallel dazu durchgeführt. Für Religationen linearisierter Plasmide reichten bereits 0,001-0,01 pmol DNA/10 µl aus. Für die Liegierung homologer überstehender Enden (Sticky-

ends) wurden 250 U/ml Ligase eingesetzt. Bei „blunt end“ Ligationen wurde die Ligasekonzentration auf 500 U/ml erhöht. Die Ligation erfolgte nach einer Inkubation von 4 h bei RT oder über Nacht bei 15°C.

### **C-2-3 Klonierung von PCR-Fragmenten in pDS-Sti2-His Vektor**

Um die von den Phagen aufgenommenen *Schistosoma*-cDNA sequenzieren zu können wurden die PCR-Fragmenten in den Vektor pDS-Sti2-His (E. Beck) umklont. Die Klonierung von PCR-Fragmenten nach diesem System beruht auf dem Prinzip, daß anstelle von Schnittstellen von Restriktionsenzymen künstliche sticky-ends von jeweils 15 Nukleotiden Länge sowohl in den Vektor als auch in das DNA-Fragment eingeführt und anschließend miteinander hybridisiert werden.

Es wurden folgende Schritte gemacht:

a]- Linearisierung des Vektors pDS-His-Sti2:

- 20 µl Plasmid DNA
- 5 µl NEB4 Puffer
- 2 µl NgoMI
- 23 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde dann bei 37°C inkubiert und nach 1 h 5 µl davon auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde parallele umgeschnittenes Plasmid-DNA aufgetragen.

b]- Einführung von sticky ends in pDS-sti-His:

- 40 µl linearisierte DNA (2-5 µg)
- 5 µl 10 × T4- Pol-Puffer
- 5 µl 1mM dTTP
- 1 µl T4 DNA Polymerase

Der Ansatz wurde 30 min bei 20 – 25°C (RT) inkubiert, anschließend mit Glasmilch gereinigt und in 50 µl TE aufgenommen.

**10 × T4- Pol-Puffer:** 0.7 M Tris/HCl pH 8.0

- 70 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1.0 M K-acetat
- 10 mM DTT
- 2 mg/ml BSA

c]- Einführung von sticky-ends in das PCR-Fragment:

Auf dem cDNA-Fragment waren die Sequenzen für die komplementären sticky-ends durch PCR mit den Primern sti2-11 forward und sti2-11 reverse eingeführt worden (s. **C 2-1-2**). Danach wurde das PCR-Fragment mit T4 DNA Polymerase 20 min bei RT inkubiert, diesmal aber in Anwesenheit von dATP. Der Ansatz wurde danach mit Glasmilch gereinigt und in 10 µl TE aufgenommen.

d]- Hybridisierung

0.3 µl Vektor-DNA

1 µl Fragment

2.3 µl 1 M NaCl/20 mM Tris pH 8.0

Der Ansatz wurde 1 bis 3 h bei RT inkubiert und danach zur Transformation von 100-200 µl XL-1 Blue/pREP Ca-Zellen eingesetzt.

#### **C-2-4 Umwandlung der lambda ZAPII-Klone im Phagemide**

Zunächst wurden Übernachtskulturen von *E.coli* XL1-Blue MRF' und *E. coli* XL0LR in NZY Medium mit Tetracyclin (25 µg/ml) und Maltose (0.2%) angelegt.

Die zwei Übernachtskulturen wurden dann in einem Verhältnis von 1:3 mit frischem NZY Medium verdünnt und auf Eis gestellt.

Danach wurde in einem sterilen 15 ml-Plastikröhrchen,

200 µl XL1-Blue MRF' Zellen

100 µl Phagensuspension aus einem isolierten Plaque (zuerst zentrifugiert)

1 µl Helferphagen (ExAssist, > 10<sup>6</sup> pfu/µl), gemischt.

Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 3 ml NZY Medium zugegeben und 3 h bei 37°C geschüttelt. Die Inkubation über Nacht ist auch möglich.

Danach wurden die Probe 20 min bei 65-70°C erhitzt und für 10 min in einem Swing-out Rotor zentrifugiert. Anschließend wurden 1 bis 2 ml von jedem Überstand (Phagemid) in sterile Eppendorfröhrchen überführt und bei 4°C gelagert.

Im Anschluß wurden einzelne Klone mit Phagemid wie folgt isoliert:

200 µl von XL0LR Zellen und 2 µl von Phagemid wurden in einem sterilen Eppendorfröhrchen gemischt. Nach einer 15minütigen Inkubation bei 37°C wurden 50 µl davon auf eine Ampicillin-Platte (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.



### C-2-5 Präparation von Plasmid-DNA

Die unter Selektionsdruck gewachsenen Bakterien wurden abzentrifugiert, das Pellet in Sol A resuspendiert und mindestens 5 min bei RT inkubiert. Durch rasche Zugabe von Sol B wurden die Zellen lysiert, DNA und Proteine denaturiert, die RNA wurde hydrolysiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis, wurde Sol C zugegeben, der Ansatz vorsichtig aber gut durchgemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Plasmid-DNA blieb in Lösung und konnte von den ausgefällten Proteinen, der genomischen DNA und Membranresten durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Menge der zugegebenen Lösungen richtete sich nach dem jeweiligen Kulturvolumen:

<b>Kulturvolumen</b>	<b>1,5 ml</b>	<b>40 ml</b>	<b>250 ml</b>
Sol A	100 µl	4 ml	10 ml
Sol B	200 µl	8 ml	20 ml
Sol C	150 µl	6 ml	15 ml

Zusammensetzung der Lösungen:

Sol A:        25 mM Tris-HCl pH 8,0  
               10 mM EDTA  
               50 mM Glucose

Sol B:        0,2 M NaOH  
               1 % SDS

Sol C:        3 M K-Acetat (für Midi oder Maxi-Präparation, Na-Acetat)  
               2 M Essigsäure

Nach 20 min Zentrifugation bei  $15000 \times g$  wurde der Überstand mit einem Volumen 80 % Phenol, dann mit einem Volumen Phenol/Chloroform, und schließlich mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Bei jedem Extraktionsschritt wurden die Ansätze heftig gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 2,5 Volumen 100 % Ethanol und Inkubation auf Eis (10 bis 20 min) wurde die DNA gefällt.

Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und überschüssiges Salz durch zweimaliges Waschen mit 80 % Ethanol entfernt. Die gewonnenen DNA wurde vollständig getrocknet und in einer TE/RNase-Lösung resuspendiert. Alternativ zu dieser Methode wurden auch Affinitätssäulen den Firmen Qiagen und Pharmacia (Mini, Midi Maxi-Kit) verwendet. Die Durchführung der Plasmid-Reinigung entsprach den Anleitungen der Hersteller.

### **C-2-6 Sequenzanalyse**

Für die DNA-Sequenzanalyse wurde der T7-Sequenzierungs-Kit der Firma Pharmacia eingesetzt. 2-4 µg Plasmid-DNA in 8 µl TE wurden mit 2 µl 2 M NaOH für 10 min bei RT denaturiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 10 µl 0,9 M Natriumacetat pH 4,5 neutralisiert. Nach Zugabe von 3 Volumen 100%igen Ethanols wurde die DNA für 5 min bei RT und 5 min auf Eis präzipitiert, für 10 min abzentrifugiert, mit 75%igem Ethanol gewaschen und schließlich getrocknet. Danach wurde das Pellet in 10µl Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 2 pmol Primer sowie 2 µl Annealing-Puffer zugegeben. Die Mischung wurde auf 65°C erhitzt und während 30-60 min wieder auf RT abgekühlt. Zu dem Template-Primer-Hybrid wurden 3 µl Labelling- Mix (dCTP, dTTP, dGTP, 0,5 µl [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP (=5 µCi), 0,5 µl 0,1 M DTT sowie 2 µl T7-Polymerase (3 U) gegeben.

Nach 5 min bei RT wurden jeweils 4,5 µl des Ansatzes in vier getrennte Reaktionsgefäße überführt, in die zuvor jeweils 2,5 der Sequenzierungsmixe (jeweils 80 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 8 µM des jeweiligen dNTP) pipettiert worden waren. Nach Inkubation für 5 min bei 37°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von jeweils 5 µl Farbmarker für denaturierende Gele gestoppt. Nach Erhitzen auf 90°C für 3 min wurden jeweils 1,5 µl der Proben auf einem Sequenz-Gel analysiert.

## **C-3 Mikrobiologische Methoden**

### **C-3-1 Kultivierung von *E. coli***

*E. coli*- Stämme wurden unter ausreichender Belüftung in Standard I-Medium und unter Selektionsdruck über Nacht kultiviert. Die Inkubationstemperatur betrug bei allen verwendeten Stämme 37°C, außer bei *E. coli* 537. Dieser Stamm wurde bei 28°C kultiviert. Die Dichte stationärer Kulturen beträgt ca 1-2 . 10<sup>9</sup> Zellen /ml.

## **C-3-2 Transformation von *E. coli***

### **C-3-2-1 Kompetente Bakterien: Calciumchlorid-Methode**

Zur Transformation von *E. coli* Zellen zur Aufnahme von extrachromosomaler DNA wurde eine Modifikation der Methode nach HERRMANN et al., 1980 verwendet. Frische Übernachtskulturen wurden im Verhältnis 1: 100 in Standard I-Medium angeimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einer Dichte von  $1-2 \times 10^8$  Zellen/ml (exponentielle Wachstumsphase) wurden die Bakterien-Kulturen pelletiert (5 min bei 5000 g) und in  $\frac{1}{2}$ Kulturvolumen eiskalter 30 mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert.

Nach 30 min auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert (2 min bei 5000 rpm) und in  $\frac{1}{20}$  Ausgangsvolumen 30 mM  $\text{CaCl}_2$  aufgenommen. Die Kompetenz der Zellen blieb auf Eis für etwa 1 Woche erhalten.

### **C-3-2-2 Transformation**

Bei Rücktransformationen von intakten Plasmiden reichte bereits eine DNA-Menge von 0,001 pmol aus. Für Ligationsansätze wurden 0,05-0,1 pmol DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte mit 100-200  $\mu\text{l}$  kompetenten Bakterien für 30 min auf Eis. Nach Hitzeschock (5 min bei 37°C) wurden 0,8 ml antibiotikafreies Standard I-Medium zugegeben und 30 min bis 1 h bei 37°C inkubiert (*E. coli* 537, bei 28°C). Durch kurze Zentrifugation (ca 20 Sekunden) wurden die Bakterien pelletiert, das Medium dekantiert und nach Resuspendierung im Restüberstand auf den entsprechenden Antibiotikaplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C bzw. 28°C für *E. coli* 537. Es wurden parallel positive und negative Kontrolle durchgeführt um die Kompetenz der Bakterien und die Menge falsch positive Klone abschätzen zu können.

### **C-3-3 Expression von MS2-Fusionsproteinen in *E. coli***

MS2-Expressionsvektoren wurden in *E. coli* 537 Bakterien unter Kanamycin- und Ampicillin-Selektion bei 28°C über Nacht vermehrt. Von einer solchen hochgewachsene Kultur wurde im Verhältnis 1:5 auf 42°C vorgewärmtes antibiotikafreies Standard I Medium übergeimpft.

Das Endvolumen betrug bei analytischen Ansätzen 2,5 ml, bei präparativen Ansätzen meist 250 ml. Bei ausreichender Belüftung wurden die Kulturen 2 h unter kräftigem Schütteln bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert. Im Fall der analytischen Ansätze wurde das Pellet in 100 µl 4 × Probenpuffer aufgenommen, 10 min bei 95°C gekocht und 20 µl auf einem SDS-PAA-Gel analysiert. Bei präparativen Ansätzen wurde eine Fusionsprotein-Reinigung durchgeführt (**C-4-1**).

### **C-3-4 Expression von Histidin-Fusionsproteinen**

Mit pDS/pQE-Derivaten transformierte *E. coli* XL-1 Blue, die das Repressorplasmid pREP4 und den Expressionsvektor enthalten, wurden unter Kanamycin- (50 µg/ml), Ampicillin- (250 µg/ml) und Tetracyclin- (15 µg/ml) Selektion in Standard-I-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert. Aus den frischen Übernachtskulturen wurden im Verhältnis 1:10 angeimpft und nur noch unter Ampicillin-Selektion 30 min bei 37°C weiter inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) induziert, anschließend wurden die Kulturen für weitere 3-4 h inkubiert. Für analytische Zwecke wurden Aliquots der Kulturen abzentrifugiert, mit Probenpuffer für 10 min bei 95°C aufgeköcht und mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert.

### **C-3-5 Plattieren von Lambda-Phagen**

Die Angaben beziehen sich auf Platten mit einem Durchmesser von 12 cm, bzw. 9 cm. Zuerst wurde eine Phagentiterbestimmung durchgeführt, um die geeignete Verdünnung (die in NZY-Medium erfolgt) für das Plattieren zu bestimmen. Dann wurde von der entsprechenden Verdünnung jeweils 100 µl in Wassermannröhrchen mit 0,5 ml (0,1 ml) einer frischen Kultur von *E. coli* gemischt. Die Mischung wurde 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 ml (3 ml) Weichagar, der auf 42°C vorgewärmt wurde, zugegeben, kurz gemischt und auf NZY-Agaroseplatten verteilt. Die Platten wurden 10 min bei RT stehen gelassen und danach bei 42°C 3-4 h inkubiert. Für λgt11-Phagen (*S. mansoni* Ei-Bank) wurden *E. coli* Y1090 als Indikator-Bakterien eingesetzt. Bei der *S. japonicum* Genbank wurden die λZAPII Phagen in dem Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue vermehrt.

## **C-4 Biochemische Methoden**

### **C-4-1 Reinigung von MS2-Fusionsproteinen**

Die Reinigung von MS2-Fusionsproteinen wurde im wesentlichen nach der Vorschrift von Küpper et al. (1982) durchgeführt.

Zellen einer induzierten 250 ml Kultur wurden pellitiert und mit 8 ml 50 mM Tris pH 8,0, 0,1 M NaCl resuspendiert. Nach diesem Waschschrift wurden die Bakterien abzentrifugiert und in 1,6 ml 10% Sucrose, 50 mM Tris pH 8,0 aufgenommen. Nach Zugabe von 1,6 ml EDTA (0,5 M) und 1,6 ml Lysozym (5 mg/ml) wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zur Degradation der Membranen 4 ml Triton-Lyse-Mix zugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die teilweise lysierten Zellen wurden dann durch eine kurze Ultraschallbehandlung (4 × 15 s) vollständig aufgebrochen.

Unlösliches Material (Membranfraktion) wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 10.000 rpm pellitiert. Aus diesem Sediment wurden schrittweise durch jeweils 30minütige Inkubation bei 37°C in je 8 ml 5 % Triton X-100 bzw. 1 M Harnstoff bzw. 7 M Harnstoff, 0,2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (wobei vor jeder Inkubation ein kurzes Beschallen erfolgte) die Proteine der Membranfraktion rückextrahiert. Das Fusionsprotein findet sich in der Regel in der 7 M Harnstoff-Fraktion.

### **C-4-2 Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen**

Bakterien einer mit IPTG induzierten Kultur wurden nach 3-4 h pellitiert und in 1/10 Volumen 6 M Guanidinium/HCl pH 8,0 aufgenommen, gevortext und nach kurzer Ultraschallbehandlung 1 h auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Dabei gehen die Bakterien nahezu vollständig in Lösung. Nach 10minütige Zentrifugation wurde der klare Überstand zusammen mit 1/200 Volumen TALON-Affinitätsmatrix (Firma ClonTech) unter sanfter Durchmischung auf einem Elektrodrehmotor bei RT über Nacht inkubiert. Die Affinitätsmatrix wurde für 1 min pelletiert und mit 8 M Harnstoff dreimal bei pH 8,0 und einmal bei pH 7,5 gewaschen. Anschließend wurden die an die Matrix gebundenen Proteine mit einem geeigneten Volumen 100 mM EDTA in 8 M Harnstoff pH 7,5 eluiert. Ein Aliquot der Proteinlösung wurde durch SDS-PAGE analysiert.

### **C-4-3 Alternative Reinigung von Histidin6- Fusionsproteinen**

Bakterien einer wie unter **C-3-5** beschriebenen induzierten Kultur wurden zentrifugiert und in 10 ml Sonifikationspuffer (10% w/v Ethylenglycol, 100 mM NaCl, 40 mM Tris, HCl pH 8,5) resuspendiert. Nach 5 min Ultraschallbehandlung auf Eis, wurden die Zellen bei 4 °C 10 min zentrifugiert (10.000 x g).

Das Pellet wurde in 10 ml 8 M Harnstoff, 40 mM Tris, 10% w/v Ethylenglycol, und 250 mM NaCl, HCl pH 8,5 resuspendiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei RT wurde zu dem Überstand, 750 µl Talonsuspension (≈ 375 µl Bettvolumen) gegeben und auf einem Elektrodrehmotor 30 min bis 2 h bei RT inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation (200 x g, 2 min) wurde die Talonmatrix mit 10 ml 8 M Harnstoff, 40 mM Tris, 10% w/v Ethylenglycol, und 250 mM NaCl, HCl zweimal bei pH 8,5 und einmal bei pH 7,0 gewaschen. Die Affinitätsmatrix wurde nach jeder Waschrunde für 2 min pelletiert. Nach einer sorgfältigen Entfernung des letzten Waschpuffers wurden die Proteine mit 1 ml 8 M Harnstoff, 40 mM MES/NaOH pH 6,0, 10% w/v Ethylenglycol, 100 mM NaCl, eluiert. (Alternativ mit 50 mM Imidazol oder 100 mM EDTA in einem der Harnstoffpuffer)

Nach Zentrifugation (14.000 x g, 2 min bei RT) wurde der Überstand abgenommen und Reste von Talon mit Sterilfilter entfernt.

### **C-4-4 Protein-Konzentration Bestimmung**

Die Bestimmung der Konzentration Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe des Bicinchoninsäure-(BCA-) Protein-Assays der Firma Pierce. Jeweils 5 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 100 µl der Detektionslösung (50 Teile Reagent A, 1 Teil Reagent B) vermischt und in Mikrotiter-Platten für 1 h bei 37 °C inkubiert. Jede Messung wurde in Doppelwerten durchgeführt. Die Protein-Konzentration konnte nach Extinktions-Messung bei 570 nm im ELISA-Reader durch Vergleich mit einer Serumalbumin-Verdünnungsreihe mit Konzentration zwischen 50 und 1000 µg/ml errechnet werden.

## **C-4-5 Gel-Elektrophorese**

### **C-4-5-1 DNA-Agarose-Gele**

Zur Analyse von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarose-Gele mit Konzentrationen von 1-2 % mit TAE als Laufpuffer verwendet. Zur Kontrolle des Laufverhaltens wurden die Proben vor dem Auftrag mit Nativ-Farbmarker (20 %) vermischt. Die Elektrophorese erfolgte bei 90-110 V. Nach dem Lauf wurden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt, in Wasser entfärbt und bei 254 nm fotografiert. Für präparative Zwecke wurden jedoch nur vertikale Agarose-Gele verwendet, um die DNA quantitativ aus dem Gel gewinnen zu können. Um eine Schädigung der DNA zu vermeiden, wurde auch das Gel nur 2 min gefärbt und kurz bei 366 nm betrachtet. In Frage kommende Banden im Gel wurden markiert und bei Tageslicht mit einem Skalpell ausgeschnitten.

### **C-4-5-2 Polyacrylamidgele**

Zur Isolierung und Analyse kleiner DNA-Fragmente (< 400 bp) wurden native Polyacrylamidgele (6 % in  $\frac{1}{2} \times$  TBE) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 40 mA. Die Lokalisierung der DNA-Banden erfolgte wie bei Agarosegelen.

### **C-4-5-3 Sequenz-Gele**

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente zur Sequenzanalyse wurden denaturierende Polyacrylamid-Gele verwendet (6 % Polyacrylamid, 7 M Harnstoff in TBE). Vor dem Probenauftrag wurden die Gele, die eine Größe von 200 × 400 × 0,4 mm besaßen, für 1 h bei 40-50 W vorlaufen gelassen. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte bei 50-55 W. Nach dem Lauf wurden sie in Ethanol/Essigsäure für 10 min fixiert, auf Whatman-Papier aufgezogen und 1 h bei 80°C getrocknet. Die Position der radioaktiv markierten DNA-Banden wurden durch Autoradiographie nach Auflegen eines Röntgenfilms und Exposition über Nacht bei -70°C sichtbar gemacht.

### C-4-5-4 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970). In der Regel wurden 6%ige Sammelgele und 15-18%ige Trenngele verwendet, der Vernetzungsgrad betrug 29:1 (Acrylamid: Bisacrylamid). Die Elektrophorese erfolgte bei ca 10 V/cm.

#### Trenngel 15 % (für zwei Minigele)

4 × Trenngelpuffer	2,5 ml
30 % Acrylamid	5,0 ml
bideest. H <sub>2</sub> O	2,5 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	5 mg
TEMED	10 µl

#### Trenngel 18 % (für zwei Minigele)

4 × Trenngelpuffer	2,5 ml
30 % Acrylamid	6,0 ml
bideest. H <sub>2</sub> O	1,5 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	5 mg
TEMED	10 µl

#### Sammelgel 6 % (für zwei Minigele)

4 × Sammelgelpuffer	1,25 ml
30 % Acrylamid	1,0 ml
bideest. H <sub>2</sub> O	2,75 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	2,5 mg
TEMED	5 µl

Nach dem Lauf wurden die Gele für 30 min mit Coomassie-Blau gefärbt, in Ethanol/Essigsäure vollständig entfärbt und auf dem Geltrockner für 45 min bei 80°C auf einem Filterpapier als Träger getrocknet.



## D – ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, ein Diagnoseverfahren zu entwickeln, welches den sicheren Nachweis und möglichst auch die Diskriminierung unterschiedlicher Erregerarten der Bilharziose zuläßt. Dies sollte mit Hilfe speziesspezifischer rekombinanter Antigene erreicht werden. Eine Diskriminierung der Erregerarten wäre zum einen wichtig für die korrekte medikamentöse Behandlung der betroffenen Patienten, zum anderen wäre dies aber auch eine wichtige Information darüber, in welche Weise gegen die Überträger der Seuche vorgegangen werden muß. Die für den Menschen infektiösen Larvenformen dieser Parasiten werden nämlich durch Süßwasser-schnecken ausgeschieden, die unterschiedlich für jede Spezies sind, verschiedene Biotope besiedeln und dementsprechend mit unterschiedlichen Maßnahmen bekämpft werden müssen.

Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils werden Arbeiten zur Isolierung und Reindarstellung solche Antigene dargestellt. Der zweite Abschnitt befaßt sich mit der Frage, wie weit die speziesspezifischen rekombinanten Antigenen für die Immundiagnose der Bilharziose eignet sind.

### Teil 1: Isolierung und Charakterisierung immunreaktiver Antigene

Zur Durchführung des ersten Teils dieser Arbeit mußten zunächst Antigene durch Immunoscreening aus Genbanken der Schistosomenarten *S. mansoni* und *S. japonicum* isoliert werden. Für die dritte wichtige Schistosomenart *S. haematobium* stand leider keine geeignete Genbank zur Verfügung, da sich diese Spezies nur unter erheblichem Aufwand im Labor halten läßt. Es konnte jedoch damit gerechnet werden, daß einzelne Antigene von *S. mansoni* und *S. japonicum* von den Seren der mit den verschiedenen Schistosomenarten infizierten Patienten in unterschiedlicher Weise erkannt würden und somit eine Diskriminierung zuließen. Wichtig ist vor Allem die Unterscheidung von *S. haematobium* und *S. mansoni*, da beide Arten in Afrika oft gemeinsam auftreten. Im asiatischen Raum ist nur *S. japonicum* von Bedeutung, wobei es für diese Spezies bisher allerdings noch keinen ausreichend empfindlichen immunologischen Nachweis gibt, und in Südamerika kommt nur *S. mansoni* vor.

Für die Suche nach neuen diagnostischen Antigenen wurden zwei Genbanken benutzt :

1. Eine Genbank von *S. mansoni* (cDNA-Bank aus Eiern) in  $\lambda$ gt11
2. Eine Genbank von *S. japonicum* (cDNA-Bank aus adulten Würmern) in  $\lambda$ ZAP

Die cDNA-Bank aus Eiern von *S. mansoni* stammt aus dem Labor von E. Beck, Gießen, die *S. japonicum*-Bank aus dem Labor von P.J. Brindley, Brisbane, Australien.

## **D-1 Rekombinante Antigene aus der *S. mansoni* Ei-cDNA-Bank**

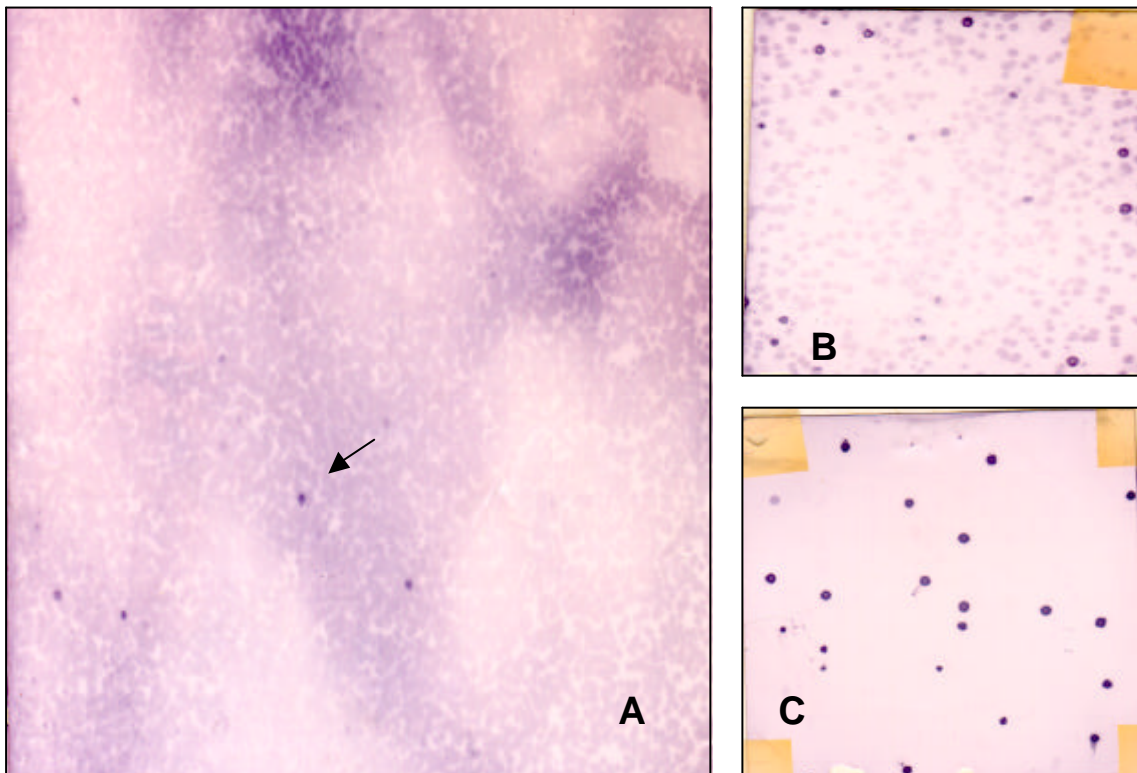
Zur Isolierung rekombinanter Antigene wurde ein Durchmusterung (Screening) einer Phagen-Genbank aus Eiern von *S. mansoni* mit einer Mischung von 10 Seren von Personen, bei denen parasitologisch nur eine *S. mansoni*-Infektion nachgewiesen worden war, durchgeführt. Die Verwendung einer Mischung von Seren war nötig, da aus früheren Versuchen bekannt war, daß jeder Patient ein unterschiedliches Muster an Antigenen des Parasiten erkennt.

### **D-1-1 Immunoscreening der *S. mansoni* Ei-Expressions cDNA-Genbank**

Das Immunoscreening wurde nach der Methode von Young & Davis (1983a & b) durchgeführt. Zunächst mußte der aktuelle Phagentiter der Bank bestimmt werden. Daraufhin wurde die  $\lambda$ gt11-Expressionsbank so ausplattiert, daß pro Platte ca.  $4 \times 10^4$  Plaques resultierten. Um die Komplexität der Bank ( $5 \times 10^5$  Klone) weitgehend auszunutzen, wurden 10 Platten verwendet. Die Phagen-Plaques wurden auf Nitrocellulose-Membranen abgeklatscht und mit dem „Humanserumpool“ inkubiert. Humanseren aus Afrika besitzen erfahrungsgemäß einen hohen Titer von Antikörpern gegen *E. coli*. Da diese Antikörper zum einem mit dem *E. coli*-Rasen und zum anderen mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-Anteil der Fusionsproteine reagieren, können falsche positive Signale beim Screening entstehen (MOSER, 1988). Die eingesetzte Serumverdünnung wurde daher vorab mit einem Extrakt aus  $\lambda$ gt11-infizierten Zellen präabsorbiert. Es wurden insgesamt ca. 100 positive Plaques ermittelt und die betreffenden Regionen aus den Agarplatten ausgestochen.

Um die betreffenden rekombinanten Phagen einzeln zu isolieren, wurden sie aus dem ausgestochenen Agar eluiert, erneut plattiert und wiederum mit dem Serumpool untersucht.

Nach vier solchen Screening-Runden wurden schließlich 53 rekombinante Phagenklone rein dargestellt und durchnummeriert (s. **Abb. 3**). Alle eindeutig isolierten rekombinanten Phagen wurden als Plattenlysate vermehrt, um sie auf längere Zeit lagern zu können.



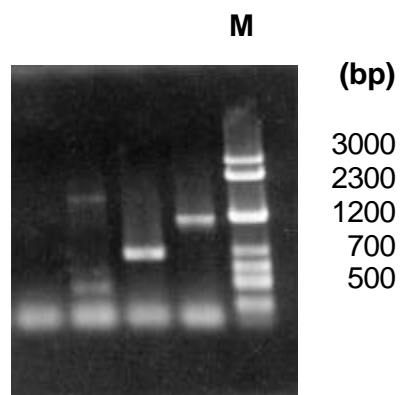
**Abb 3: Isolation einzelner Klone aus der *S. mansoni* Ei-cDNA-Bank mit Infektionsserum.** Rekombinante I gt11-Phagen, die für immunreaktive Antigene kodieren, wurden mit Hilfe eines pools von 10 stark positiv reagierenden Patientenserum aus der *S. mansoni* I gt11-Ei-cDNA-Genbank isoliert. **A** = erstes Screening; **B** = zweites Screening; **C** = drittes Screening; der Pfeil zeigt auf einen positiven Klon beim ersten Screening

## D-1-2 Untersuchung der rekombinanten Phagen

Die immunologisch positiven und rein dargestellten rekombinanten Phagen wurden im Anschluß näher untersucht. Die wichtigsten Kriterien für die Charakterisierung waren die Identifizierung des entsprechenden Genprodukts und die Stärke und Häufigkeit der Reaktion mit Seren von Patienten mit Infektionen durch verschiedene Schistosomenarten. Mögliche Kreuzreaktionen mit anderen infektiösen Erregern, insbesondere mit häufig auftretenden Wurmparasiten, mußten ausgeschlossen werden.

### D-1-2-1. Bestimmung der cDNA-Länge in Lambda gt11 mit PCR

Zunächst wurde die Größe der von den Phagen aufgenommenen Schistosoma-cDNA mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) bestimmt. Für die PCR wurden Primer verwendet ( $\lambda$ gt11 forward und  $\lambda$ gt11 reverse), die ca. 30 bp links und rechts der Insertionsstelle im Phagenvektor hybridisierten. Die Bedingungen für die Durchführung der PCR sind im Methodenteil (C-2-1-1) beschrieben. Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese analysiert (Abb. 4)



**Abb. 4: PCR-Analyse der in den Phagen integrierten Schistosoma-cDNA.** Die PCR-Ansätze wurden auf analytisch auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. M = DNA-Marker.

Die Länge der cDNA-Inserts wurde anhand des parallel aufgetragenen Größenmarkers abgeschätzt. Kleinere cDNA-Inserts, die auf dem 1 % Agarosegel nicht gut zu sehen sind, wurden teils auf einem 2 %igen -Agarosegel, teils auf einem 6 %igen-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Phagenklone, die bei dieser Analyse kein eindeutiges oder nur ein sehr kurzes cDNA-Fragment enthielten, wurden erneut bezüglich der Stärke ihrer Reaktion mit einem Serumpool untersucht.

Daraufhin wurden die Klone 1, 2, 5, 7, 15, 17, 27, 28, 30, 32-35, 37, 39, 40-43, 46 und 51 aus verschiedenen Gründen von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen: Für die Phagenklone 1, 2, 7, 39 und 40 war die Immunantwort sehr schwach, außerdem war die Größe der cDNA-Inserts aufgrund der PCR nicht eindeutig. Die Phagenklone 5, 17, 27, 32, 43, 45 und 51 hatten sehr kleine Inserts und die Stärke der Immunantwort war nicht eindeutig genug. Für die Phagenklone 15, 28, 30, 33, 34, 35, 37, 41, 42 und 46 war der PCR wiederholt negativ, was durch den Verlust bzw. Veränderung einer der beiden Insertionsstellen während der Klonierung zu erklären ist. Dies ist eine bereits zuvor bekannte Schwäche der verwendeten relativ alten cDNA-Bank und mußte in Kauf genommen werden. Als brauchbar konnten letztlich die Phagenklone 6, 11-13, 16, 18-21, 24-26, 29, 36, 38, 44, 47-50, 52, 54 und 55 herausfiltriert werden.

#### **D-1-2-2. Reindarstellung der Phagenklone**

Alle verbliebenen Phagenklone wurden nochmals auf ihre Reinheit überprüft. Bei den Klonen 11, 16, 18, 19, 20 und 21 waren bei der PCR jeweils zwei Banden aufgetaucht, die auf eine Kontamination mit einem zweiten Phagen hinwiesen. Für diese Phagen wurde ein fünftes Screening durchgeführt, um den jeweils richtigen Klon herauszufinden. Bei manchen Klonen war im Laufe der Reindarstellung durch wiederholtes Ausplattieren die Stärke des immunologischen Signals deutlich schwächer geworden. Um auszuschließen, daß während des Screenings stark positive Klone verloren gegangen waren, wurden für die Phagen 29, 38, 44, 47, 48 und 49 jeweils 2 positive isolierte Plaques des zweiten Screenings nochmals plattiert. Für die Phagen 52, 54 und 55 wurde die Aufreinigung sogar ab dem ersten Screening nochmals durchgeführt.

Um sicher zu gehen daß es sich bei den letztlich isolierten Phagen nicht um falsch positive Klone handelte, wurden als Kontrolle jeder positive Phagenklon mit einem negativen Klon als Mischung gemeinsam ausplattiert und durch Immunfärbung der Plaques überprüft, ob die Farbreaktion eindeutig stärker war als bei den zugemischten negativen Kontrollplaques. Nach allen Ausschlußkriterien blieben schließlich nur noch die Phagenklone 11-13, 16, 18, 21, 24-26, 36, 38, 44, 48 und 50 übrig.

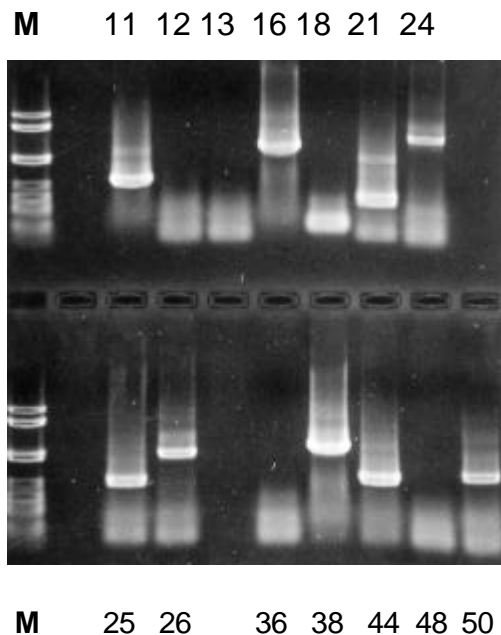
In der folgende Tabelle ist die Größe der inserierten cDNA (PCR-Fragment) und die Stärke der Immunantwort dieser Phagen dargestellt.

Klone Nr.	cDNA bp	Stärke der Immunantwort
11	800	++
12	176	+
13	176	+
16	2100	++
18	218	++
21	500	+
24	2200	(+)
25	700	+
26	1300	+++
36	1200	(+)
38	2000	++
44	1000	+++
50	1000	(+)

**Tabelle 1: Länge der cDNA-Inserte und Stärke der Immunantwort**

Legende:   +++ = sehr gute Reaktion mit Patientenseren.  
 ++ = Reaktion mit 50% der Patientenseren.  
 + = Reaktion mit < 50% der Patientenseren.  
 (+) = schwache Reaktion mit ≤ 50% der Patientenseren.

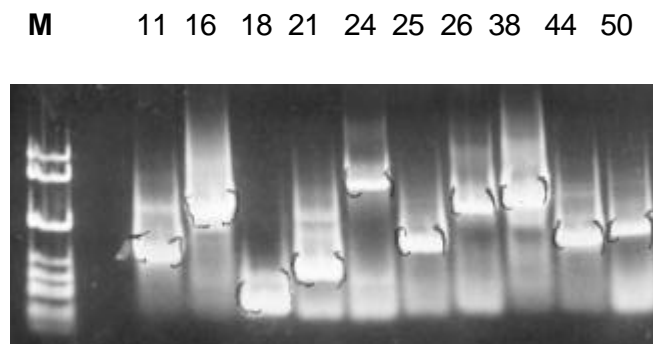
Für jeden dieser Klone wurde nochmals eine analytische PCR durchgeführt (**Abb.5**).



**Abb. 5: Größe der cDNA-Inserts der aus der egt11 *S. mansoni* Ei-cDNA-Bank isolierten Klone.** Jeweils 10 µl PCR-Produkt wurden auf ein analytisches 1%iges Agarosegel aufgetragen.

### D-1-3 Klonierung von PCR-Fragmenten in pDS-Sti2-His Vektor

Für die Umklonierung der cDNA aus dem  $\phi$ gt11-Vektor in ein Expressionsplasmid wurde jeweils eine präparative PCR (20  $\mu$ l) mit den Primern sti2-11forward und sti2-11reverse durchgeführt (**Abb.6**). Die DNA-Banden wurden danach aus dem Gel geschnitten und mit einem DNA-Reinigungs-Kit (Easy Pure, Biozym) nach Anleitung des Herstellers gereinigt.



**Abb. 6: Präparative Darstellung der cDNA-Inserts;** Auftrennung auf einem vertikalen 1% Agarosegel. Die Fragmente wurden wie markiert aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert.

Zur Expression der potentiellen diagnostischen Antigene und zum Zweck der DNA-Sequenzierung wurden die PCR-Fragmente in den Expressionsvektor pDS-Sti2-His umkloniert (**Abb. 7**). pDS-Sti2-His ist verwandt mit dem Vektor pQE-9 (Qiagen) und trägt folgende Sequenz an der Klonierungsstelle:

Eco RI                      NgmI    HindIII

..**ATG**GAGAATTACATCACCATCACCATCACGAATTCGCACCCAACGCCGGCGTGCGTCCGCAAGCTTAAT...

M R E L H H H H H H E F A P N A G V R P Q A Stop

Durch Linearisierung des Vektors mit dem Restriktionsendonuclease NgmI und anschließende Inkubation mit T4 DNA Polymerase in Anwesenheit von dTTP entstehen links und rechts der Schnittstelle einzelsträngige Enden. Komplementäre kohäsive Enden werden auf dem zu klonierenden DNA-Fragment eingeführt. Dies erfolgt durch PCR-Amplifikation des cDNA-Fragments mit Primern, die zusätzlich zu den für die Amplifikation der DNA notwendigen Sequenzen 15 Nukleotide zur Herstellung der kohäsiven Einzelstrangbereiche tragen. Die Inkubation des PCR-Fragments mit T4 DNA Polymerase, diesmal in Anwesenheit von dATP, führt zu einzelsträngigen Enden, die komplementär zu den Enden des Vektors sind.

Vektor und PCR-Fragment wurden anschließend miteinander hybridisiert. Die Hybride sind bei Raumtemperatur stabil, d. h. es wird keine Ligase zum Verbinden von Vektor und Insert eingesetzt. Die kohäsiven Enden am 5'-Ende und am 3'-Ende sind unterschiedlich. Dies verhindert die Rezirkularisierung des Vektors und erlaubt gerichtetes Einklonieren des DNA-Fragments.

### pDS-Sti2-His, Sequenz der Klonierungsstelle:

```

                Eco RI                NgO MI                Hind III
.. ATGAGAGAATTACATCACCATCACCATCACGAATTCGCACCCAACGCCCGGCGTGCGTCCGCAAGCTTAAT...
  M  R  E  L  H  H  H  H  H  H  E  F  A  P  N  A  G  V  R  P  Q  A  Stop

```

### kohäsive Enden im Vektor:

```

      Eco RI                                Hind III
...GAATT 3'                                5' CCGGCGTGCGTCCGCAAGCTTAAT...
...CTTAAGCGTGGGTTGCGGCC 5'                                3' TTCGAATTA...

```

### Primer zur Herstellung kohäsiver Enden am PCR-Fragment:

```

                Sti2 forw                gt11 forw
sti2-11forward:  CGCACCCAACGCCGGTggcgacgactcctggagcccg

                Sti2 rev                gt11 rev
sti2-11reverse:  GCGGACGCACGCCGGTtacaccagaccaactggaatg

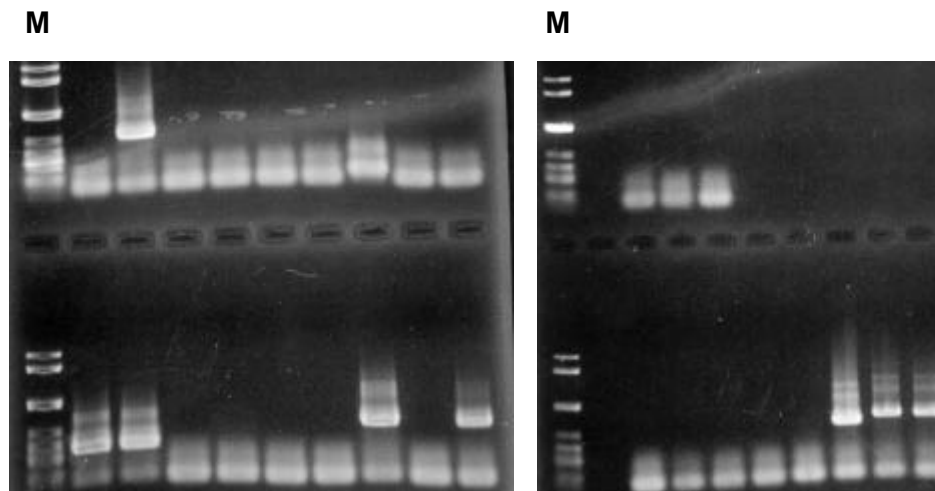
```

### Abb. 7 Das pDS-Sti2-His Vektorsystem

Dieser Vektor (3,2 kb) erlaubt die induzierbare Expression des betreffenden Proteins und versieht es gleichzeitig mit einer Sequenz von 6 Histidin-Resten am N-terminalen Ende, was eine einfache Reinigung durch Affinitätschromatographie ermöglicht. Als Selektionsmarker dient das Gen für Ampicillinresistenz. Aufgrund der hohen Expressionsrate kann der Vektor pDS-Sti2-His nur stabil in *E. coli* etabliert werden, wenn der durch den lac-Operator kontrollierte Promotor effektiv reprimiert ist. Da die meisten *E. coli*-Stämme nicht genügend lac-Repressor synthetisieren, müssen die Bakterien zusätzlich das Repressorplasmid pREP4 (GOTTESMANN et al., 1981) enthalten, welches das lacI-Gen sowie ein Gen für Kanamycinresistenz als Selektionsmarker trägt.

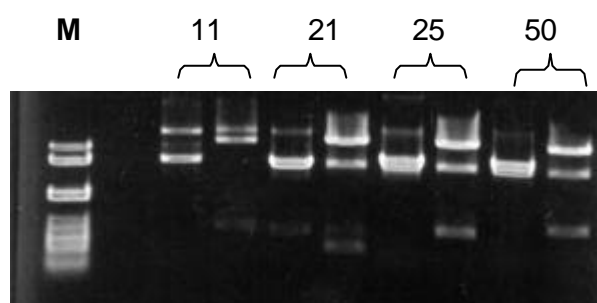
Kompetente Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-Blue, die das Repressorplasmid pREP tragen, wurden mit dem Hybridisierungsansatz transformiert. Die resultierenden Klone wurden durch PCR mit den Sti2-11-Primern analysiert ( **Abb. 8**).





**Abb. 8: Analyse den pDS-Sti2-His-Klonen.** Für jeder KLon wurden jeweils 3 einzelne Kolonien (um die Chance auf der richtige Klon zu kommen zu erhöhen) die auf die Selektionsplatte aufgewachsen sind vorsichtig herauspipettiert, mit 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O zusammengemischt, 10 Minuten bei 100°C aufgeköcht und dienten dann als Template für die PCR-Ansätze

Zur Identifizierung der klonierten Gene und zur Überprüfung des Leserahmens, der theoretisch richtig sein sollte, mußten die Klone durch Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierungen charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde von allen in der PCR-Analyse positiven Klonen eine DNA-Mini-Präparation durchgeführt und die DNA durch Spaltungen mit Eco RI untersucht. Alle rekombinanten Klone zeigten Insertgrößen im erwarteten Größenbereich (Abb. 10).



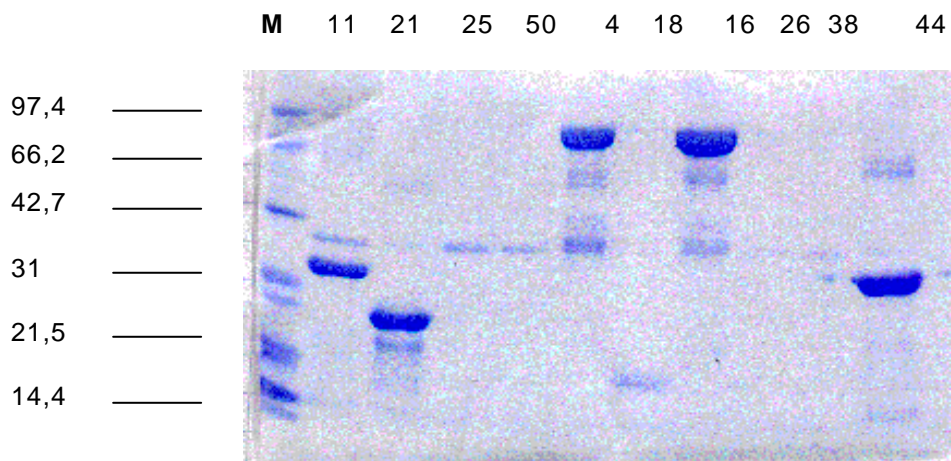
**Abb. 10: Spaltung der pSti2-Klone mit EcoRI.** Die aus  $\phi$ gt11 in pDS-Sti2 His umklonierten cDNAs (hier am Beispiel der Klone 11, 21, 25 und 50) wurden durch Verdau der Plasmid-DNA mit EcoRI untersucht. Jeweils 5  $\mu$ l jedes Spaltungsansatz wurde neben 1  $\mu$ l ungeschnittener DNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Das Umklonieren der cDNA aus den Lambda-Phagen in den pDS-Sti2-His-Vektor gestaltete sich mühsam, wodurch drei weitere Klone verloren gingen. Da es sich aber um immunologisch nur schwach reagierende Kandidaten handelte, wurde auf sie

verzichtet. Letztlich konnten nur die Klone 11, 16, 18, 21, 24, 25, 26, 38, 44 und 50 erfolgreich umgesetzt werden.

### D-1-4 Proteinexpression

Zur Darstellung der durch die pDS-Sti2-His-Expressionsvektoren kodierten rekombinanten Proteine wurden *E. coli* XL-1 Blue Zellen, die das Repressorplasmid pREP enthielten, mit den Plasmiden transformiert und unter Kanamycin- und Ampicillin-Selektion in ST1-Medium bei 37°C über Nacht kultiviert (Vorschrift von Stüber et al., 1990). Am nächsten Morgen wurden die Zellen 1 : 5 mit frischem Medium verdünnt und 30 min weiter kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 2 mM IPTG (Endkonzentration) und weiterer Inkubation für 3 bis 4 Stunden. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, wie unter **C-4-2** beschrieben in Guanidinium-Hydrochlorid lysiert und die Proteine mittels einer Talon-Affinitätsmatrix (Clontech) aufgereinigt. Aliquots der gereinigten Proteine wurden durch SDS-PAGE analysiert ( **Abb.11**).



**Abb. 11 Expression der rekombinanten Antigene als Histidin-Fusionsproteine.**

Aliquots der über Talon aufgereinigten Proteine wurden auf einem 15% igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blue gefärbt.

Zwei Klone (18 und 38) exprimierten kein erkennbares Protein, so daß letztlich nur 9 Klone übrig blieben

### **D-1-5 Charakterisierung der *S. mansoni* cDNA-Klone durch Sequenzanalyse**

Die Charakterisierung der codierten Antigene erfolgte die (teilweise) Ermittlung der Nukleotidsequenz der cDNA und dem Vergleich dieser Sequenzen bzw. der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit verfügbaren Datenbanken. Mit Hilfe geeigneter Primer wurde eine DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode durchgeführt. Alle cDNAs wurden von beiden Seiten ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden im Anschluß mit den Sequenzen aktueller Datenbanken verglichen.

Dazu wurde als Software das BLASTN-Programm des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) Heidelberg eingesetzt, das zusammen mit zahlreichen weiteren Sequenzverarbeitungs-Programmen über ein UNIX-Betriebssystem registrierten Anwendern zur Verfügung gestellt wird (HUSAR = Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources). Die computergestützte Sequenz-Analyse mit HUSAR erlaubt die Analysierung einer gegebenen Nukleinsäuresequenz. Nach erfolgter Sequenz-eingabe gibt es eine Vielzahl verschiedener Analysemöglichkeiten. Unter anderem besteht die Möglichkeit, eine Nukleinsäuresequenz in allen Leserahmen in die Aminosäuresequenz zu translatieren, biochemische Parameter berechnen zu lassen, konservierte oder charakteristische Sequenzen zu suchen, eine Karte der vorhandenen Restriktionsschnittstellen zu erstellen oder verschiedene Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen miteinander zu vergleichen, um eventuelle Homologien aufzuzeigen.

Die ermittelten Nukleotidsequenzen waren nicht immer eindeutig zu lesen. Da die cDNAs aber jeweils von beiden Richtungen (mit forward-Primer und reverse-Primer) ansequenziert wurden, konnten jeweils beide ermittelten Sequenzen (d.h. Plus- und Minusstrang) für die Homologiesuche eingesetzt werden.

In der folgenden Tabelle sind die gewonnenen Homologie-Daten zusammengefaßt.

Klon	Fragment	Homol.	Genbank-Eintrag	Beschreibung
11f	471 bp	> 90 %	eminv:SMCBP	<i>Schistosoma mansoni</i> calcium-binding protein mRNA
11r	257 bp			
16f	247 bp	100 %	eminv:SMPMYA1	<i>Schistosoma mansoni</i> paramyosin mRNA, complete cds
16r	282 bp			
21f	638 bp	(74 %)	emvrl:OA40837	Ovine adenovirus terminal protein gene, partial cds
		(61 %)	eminv:DM4FRNP N	<i>Drosophila melanogaster</i> mRNA for non-edited RNA binding protein
21r	157 bp	(83 %)	emhum1:AC00397 6	<i>Homo sapiens</i> chromosome 17, clone hCIT.91_J_4, complete sequence
25f	412 bp	73 %	emvrt:TCATPMR	Torpedo californica mRNA for (Na <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> ) ATPase alpha subunit
		73 %	eminv:CE18546	<i>Caenorhabditis elegans</i> Na,K-ATPase alpha subunit (eat-6) gene, complete cds
		69 %	eminv:ASATPASE	A.franciscana mRNA for Na,K-ATPase alpha subunit
25r	265 bp	75 %	eminv:ASATPASE	A.franciscana mRNA for Na,K-ATPase alpha subunit
		71 %	emvrt:TCATPMR	Torpedo californica mRNA for (Na <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> ) ATPase alpha subunit
		70 %	emvrt:GGATPAS	Chicken (Na <sup>+</sup> + K <sup>+</sup> )-ATPase mRNA, complete cds
26f	483 bp	95 %	emest1:AA559386	TBRI-Saber-cercaria-A <i>Schistosoma mansoni</i> cDNA clone MC260332.NA 5'
26r	260 bp	91 %	emest1:AA559387	TBRI-Saber-cercaria-A <i>Schistosoma mansoni</i> cDNA clone MC260335.NA 5'
38f	247 bp	(87 %)	emest1:AA639000	<i>Homo sapiens</i> cDNA clone IMAGE:1182366 similar to gb:X73424 PROPIONYL-COA CARBOXYLASE BETA CHAIN
38r	243 bp	-----	-----	----- NONE !!! -----
44f	218 bp	97 %	eminv:SMCBP	<i>Schistosoma mansoni</i> calcium-binding protein mRNA, 3' end
44r	196 bp			
50f	445 bp	99 %	emest14:SMAA288 27	<i>Schistosoma mansoni</i> , adult worm (E.Margutti and J.C.Parra) <i>Schistosoma mansoni</i> cDNA clone
		95 %	emest14:SMAA405 94	<i>Schistosoma mansoni</i> , egg stage <i>Schistosoma mansoni</i> cDNA clone SME0131
50r	250 bp			

Tabelle 2 : Ergebnisse der Homologie-Suchen für die cDNA-Klone

Als Ergebnis dieser Homologiestudie stellte sich heraus, daß zwei Klone (11 und 44) dem *S. mansoni* Calmodulin entsprachen, welches in der eigenen Arbeitsgruppe bereits früher als diagnostisches Antigen charakterisiert worden war (Moser et al. 1991), Klon 16 entsprach dem Paramyosin, einem Hauptbestandteil des Teguments der adulten Parasiten, welches zu einer starken aber leider nicht spezifischen Immunreaktion führt, und Klon 25 scheint eine Natrium-Kalium-ATPase zu sein, da er Homologien zu entsprechenden Ionenkanälen in anderen Organismen aufweist. Für die übrigen Klone wurden Homologien zu *S. mansoni* cDNA-Sequenzen unbekannter Funktion ermittelt.

### D-1-6 Reaktion der rekombinante Proteine mit Patientenseren

Zur Untersuchung der Eignung der rekombinante Proteine für die Immundiagnose der Bilharziose, wurde ihre Reaktivität mit einer großen Anzahl von Infektionsseren getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Klon Nr.	Identität	Reaktion mit Patientenseren
11	<i>S. mansoni</i> Calmodulin	+++
44	<i>S. mansoni</i> Calmodulin	+++
4	<i>S. mansoni</i> Paramyosin	+++
16	<i>S. mansoni</i> Paramyosin	+++
21	unbekannte <i>S. mansoni</i> cDNA	+
25	<i>S. mansoni</i> Natrium-Kalium ATPase	+
26	unbekannte <i>S. mansoni</i> Cercarien cDNA	(+)
50	unbekannte <i>S. mansoni</i> cDNA	(+)
24	unbekannte <i>S. mansoni</i> cDNA	(+)

**Tabelle 3 : Reaktivität der rekombinante Proteine mit Patientenseren**

Legende:    +++ = sehr gute Reaktion mit Patientenseren.  
               +    = Reaktion mit < 50% der Patientenseren.  
               (+) = schwache Reaktion mit ≤ 50% der Patientenseren.

Die dem Calmodulin entsprechenden Klone 11 und 44 und der dem Paramyosin entsprechende Klon 16 reagierten besonders gut mit den Patientenseren. Dies entsprach der bisher gemachten Erfahrung mit diesen Antigenen.

Sie scheinen besonders immundominant zu sein und werden daher beim Screenen einer *S. mansoni*-Genbank mit Infektionsseren regelmäßig entdeckt. Für Paramyosin hat sich in früheren Untersuchungen herausgestellt, daß es nicht ausreichend spezifisch für Schistosomen ist. Es wurden immunologische Kreuzreaktionen mit anderen Helminthen beobachtet. Zur großen Enttäuschung wurden bei dieser Untersuchung keine weiteren, stark immunreaktiven Antigene entdeckt. Die Klone 21 und 25, die ein unbekanntes Antigen bzw. eine Natrium-Kalium-ATPase codieren, wurden von maximal 50% der Infektionsseren erkannt. Außerdem wurden beide Antigene von *S. mansoni*-Seren und *S. haematobium*-Seren nicht unterschiedlich erkannt. Die Häufigkeit der Reaktion der übrigen drei von den Klonen 24, 26 und 50 codierten Antigene lag noch deutlich niedriger, und auch hier wurde kein Unterschied in der Erkennung durch Erreger-spezifische Seren beobachtet. Eine weitere Bearbeitung schien sich daher nicht zu lohnen. Da sich auf diese Weise das angestrebte Ziel, die Unterscheidung von *S. mansoni* und *S. haematobium*-Infektionen nicht erreichen ließ, wurde als alternativer Ansatz ein zweiter Anlauf mit einer Genbank von *S. japonicum* unternommen.

## **D-2 Isolation von Antigenen aus einer cDNA-Bank adulter Würmer von *S. japonicum***

Nachdem die Suche nach neuen, für die Immundiagnose brauchbaren Antigenen in der Ei-cDNA-Bank von *S. mansoni* negativ verlaufen war, sollte als weitere potentielle Quelle für solche Antigene eine cDNA-Bank aus adulten Würmern von *S. japonicum* untersucht werden. Diese Bank wurde freundlicherweise von Dr. J. P. Brindley aus Brisbane, Australien, zur Verfügung gestellt. Bei der Auswahl dieser Genbank spielte die Überlegung eine Rolle, daß mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit Antigene anzutreffen waren, die durch Seren von Patienten mit *S. mansoni*-Infektionen und *S. haematobium*-Infektionen unterschiedlich erkannt würden, da *S. japonicum* systematisch weiter von *S. mansoni* und *S. haematobium* entfernt ist, als diese beiden Spezies untereinander. Gleichzeitig wurde erwartet, daß bei dieser Gelegenheit Antigene entdeckt werden könnten, die sich für die bisher noch unzureichende Immundiagnose von *S. japonicum*-Infektionen eignen würden.

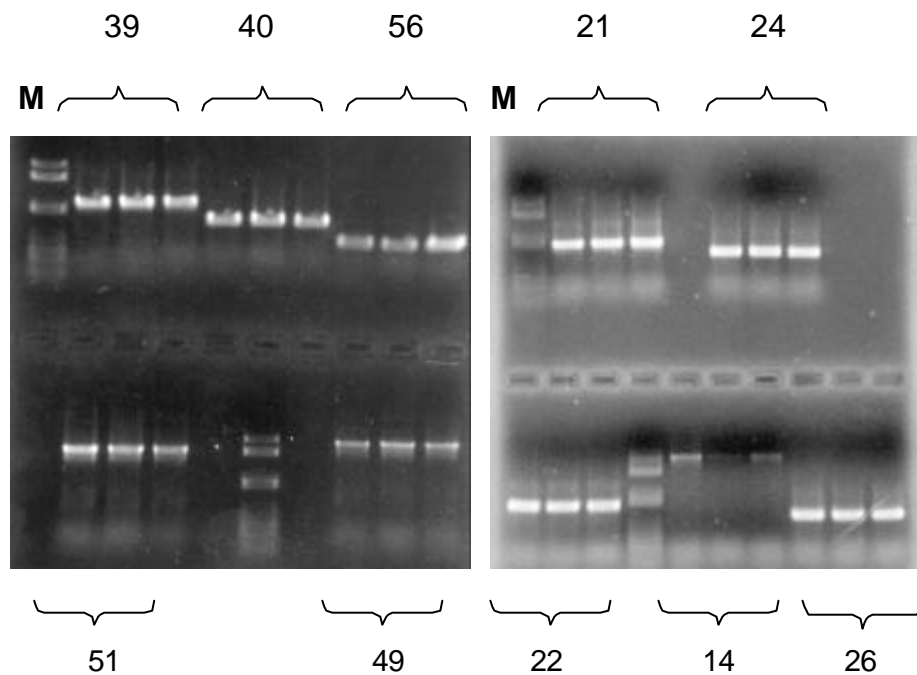
Die *S. japonicum*-Genbank hat den Phagen Lambda ZAPII als Vektor. Lambda ZAPII besitzt ein Phagemid als Integrationsstelle für die cDNA, daher ist das mühsame Umklonieren der cDNA aus positiven Phagenklonen nicht mehr nötig. Durch Überinfektion mit einem Helferphagen kann die cDNA als Bestandteil eines kleinen Plasmids (Phagemid pBluescript Sk) erhalten und auf diese Weise leicht charakterisiert werden.

### **D-2-1 Screening der *S. japonicum*-Genbank mit Patientenserum**

Zur Identifizierung immunreaktiver Antigene in der Genbank wurden wie anfangs beschrieben Plaque-Lifts von 12 Platten mit je  $4 \times 10^4$  ausplattierten Phagen hergestellt (sie besitzt eine Komplexität von  $4 \times 10^5$  unterschiedlichen Klonen) und mit einem Pool aus 10 stark positiv reagierenden Seren von Patienten mit Mischinfektionen von sowohl *S. mansoni* als auch *S. haematobium* untersucht. Aus einer Anzahl von 98 positiv reagierenden Plaques konnten nach vier Screening-Runden insgesamt 46 positive Phagenklone rein isoliert werden. Anschließend wurden diese Lambda ZAPII-Klone durch Überinfektion mit einem M13-Helferphagen in Phagemide umgewandelt.

### D-2-3 PCR-Analyse

Nach Umsetzen der cDNA in die pBluescript SK-Phagemide wurde zunächst die Größe der cDNA durch PCR-Analyse mit Hilfe von Primern bestimmt, die auf die den Polylinker flankierenden T3 und T7 Promotoren hybridisieren. Die Länge der cDNA-Inserts aller Phagemide-Klonen lag zwischen 400 und 3000 bp. In **Abb 12** sind einige Ergebnisse exemplarisch dargestellt.

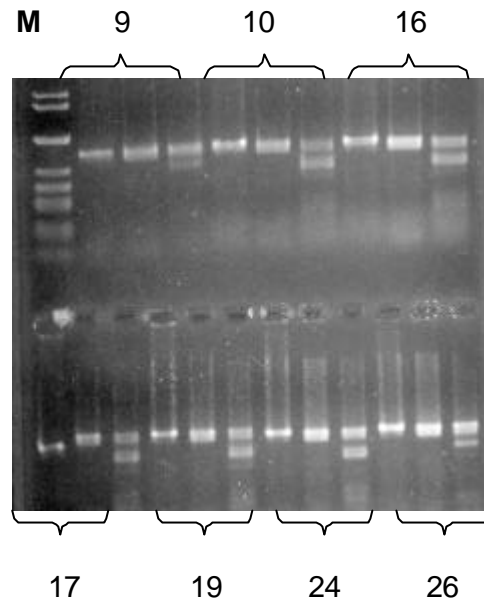


**Abb. 12: Analyse der durchschnittlichen Insertgröße der Phagemide-Klone.**

Aus Lambda ZAP II in das Phagemid pBluescript SK umgewandelte Klone wurden durch PCR mit den Primern T7 und T3 analysiert. Von jedem Umwandlungs-Ansatz wurden drei Ampicillin-resistente Kolonien untersucht und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

Um die Zahl der zu analysierenden Klone einzuengen, wurde versucht festzustellen, ob einige der 46 Klone mehrfach vertreten waren. Sieben Klone hatten die gleiche cDNA Größe von ca 1000 bp. Es wurde vermutet, daß diese identisch sind. Dies wurde durch Verdau der cDNA mit den zwei relativ häufig schneidenden Restriktionsenzyme Hpa I und Rsa I überprüft. Es stellte sich heraus, daß alle 7 Klone dasselbe Verdauungsmuster aufwiesen und daher mit Sicherheit denselben Klon darstellten (**Abb.13**).





**Abb.13: Restriktionsanalyse der Klone 9, 10, 16, 17, 19, 24 und 26.**

Die mit den Primern T7 und T3 erzeugten PCR-Fragmente der 7 Klone wurden jeweils einzeln mit den Restriktionsenzymen HpaI und RsaI verdaut und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Für jeden Klon gilt: Spur 1: unverdaut, Spur 2: verdaut mit HpaI, Spur 3: verdaut mit Rsa I

Durch die später erfolgte DNA-Analyse stellte sich heraus, daß es sich um den unten näher beschriebene Klon Sj22 handelte

#### **D-2-4 Analyse der Klone durch Proteinexpression und Westernblot**

Insgesamt sind 46 aus der *S. japonicum*-Bank isolierte Klone durch PCR-Analyse näher untersucht worden. Klone, die ein eindeutiges PCR-Fragment aufwiesen, wurden auf Expression des codierten Proteins untersucht. Aliquots von Minikulturen, die durch Zugabe von IPTG zur Expression des rekombinanten Proteins induziert worden waren, wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Proteine anschließend auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit demselben pool von Patientenserum, der für das Screening der Genbank verwendet worden war, im Westernblot untersucht. Bei etwa der Hälfte der Klone war in diesem Westernblot ein Protein eindeutig nachweisbar. Induzierte Lysate dieser Klone wurden anschließend einzeln auf Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert, die Membranen anschließend in Streifen geschnitten und mit jeweils 10 bis 20 verschiedenen Patientenserum nochmals untersucht. Klone, die durch die Stärke ihrer Immunreaktion und der Häufigkeit ihrer Erkennung durch einzelne

Patientenseren besonders interessant erschienen, sind auf der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Klone Nr.	Protein (MW)	Immunantwort
9, 10, 16, 17, 21 24, 26	27 kDa	+++
14	55 kDa	+++
27	70 kDa (?)	+++
28	95 kDa	+++
44	65 kDa	+++
48	95 kDa	+++
49	55 kDa	+++
51	-	+++
56	24 kDa	+++
74	-	+++
79	45 kDa	+++
82	55 kDa (?)	+++
83	48 kDa	+++
84	24 kDa	+++
87	24 kDa	+++

**Tabelle 4: Zusammenstellung der durch Proteinexpression und Westernblot-Analyse besonders interessant erscheinend Antigene.** +++ = starke Reaktion mit Patientenseren; für die Klone 51 und 74 war im Westernblot keine eindeutige Proteinbande auszumachen. Die strake Immunreaktion des Gesamtextraktes führte jedoch zu dem Entschluß, diese Klone weiter zu untersuchen. Bei den Klonen 27 und 82 trat im Westernblot eine (schwache) Bande der angegebenen Größe auf, die Zuordnung zur klonierten cDNA ist jedoch nicht eindeutig, da auch kleinere Banden mit den Seren reagierten.

#### **D-2-5 Charakterisierung der immunologisch stark reagierenden Klone durch Sequenzanalyse**

Klone, die von mehr als 50 % der Patientenseren erkannt wurden, wurden durch Sequenzanalyse der cDNA näher untersucht um festzustellen, für welche Gene sie kodieren. Die Sequenzen wurden kommerziell mit Hilfe eines vollautomatischen DNA-Sequenziergerätes analysiert und wurden als Textdateien vorgelegt. Mit allen Sequenzen wurden Homologie-Vergleiche in Datenbanken wie unter **D-1-5** beschrieben durchgeführt. Dabei stellte sich erwartungsgemäß heraus, daß mehrere Klone demselben Gen entsprachen, auch wenn unterschiedliche Abschnitte als cDNA kloniert worden waren. Ein erheblicher Teil der Klone ließ sich keinem bekannten Gen zuordnen, was beim gegenwärtigen Stand der Genomanalyse von Schistosomen nicht erstaunlich ist.

Da bisher nur rund 10000 EST-Sequenzen aus verschiedenen Entwicklungsstadien hauptsächlich von *S. mansoni* vorhanden sind, wurden für die Homologiesuche die Nukleotidsequenzen auch in Aminosäure-sequenzen übersetzt. Die Ergebnisse für die einzelnen Klone sind im Folgenden aufgeführt.

### D-2-5-1 Klone 9 und 26

Von den 7 identisch erscheinenden Klonen 9, 10, 16, 17, 21, 24 und 26 (siehe oben) wurden die Nummern 9 und 26 sequenziert. Es stellte sich daraus, daß beide dem Gen des Proteins Sj22 von *S. japonicum* (SANTIAGO et al., 1998) entsprachen. Sj22 ist ein im Tegument von adulten *S. japonicum*-Würmern verankertes Membranprotein. Es wurde von anderen Arbeitsgruppen als Kandidat für ein protektives Antigen zur Impfstoffentwicklung untersucht (LI et al, 2000). Allerdings blieben diese Versuche erfolglos. Seine Eignung als diagnostisches Antigen war bisher aber noch nicht untersucht worden. Der ermittelte Teil der Sequenz der Klone 9 und 26 (ca. 520 Nukleotide) entspricht dem N-terminalen Bereich des Sj22-Proteins (Aminosäuren 4–144). Es wurde eine Homologie von 99 % ermittelt. Da dies den Klon eindeutig identifizierte, wurde auf eine vollständige Ermittlung der Sequenz verzichtet. Aus der Sequenz geht klar hervor, daß der N-Terminus vollständig enthalten ist. Das Methionin ist durch den lacZ-Fusionsanteil des Vektors ersetzt. Die Tatsache, daß bei der Expression des rekombinanten Proteins ein Molekulargewicht von 27 kDa ermittelt wurde (s.o.) wies auf eine vollständige cDNA hin. Dieses Antigen erwies sich in den weiteren Untersuchungen als äußerst wichtig. Daher ist hier die vollständige Aminosäuresequenz wiedergegeben (**Abb. 14**).

<b>Klone 9 + 26</b>	ATTEYRLSLMEQFIRAFIEIDKDNNELIDKQELTKYCQQNQMDMKQIDPWIFDFTDKD	
<b>Sj22.6</b>	MATTEYRLSLMEQFIRAFIEIDKDNNELIDKQELTKYCQQNQMDMKQIDPWIFDFTDKD	60
<b>Klone 9 + 26</b>	GKVSLEEFRCRGFGLKVWEVRREKEELKKDKEGKVSTLPLDIQIIAATMSKAKQYNICCKF	
<b>Sj22.6</b>	GKVSLEEFRCRGFGLKVWEVRREKEELKKDKEGKVSTLPLDIQIIAATMSKAKQYNICCKF	120
<b>Klone 9 + 26</b>	KELLDKTSRTGDEVRAVANDLKAF	
<b>Sj22.6</b>	KELLDKTSRTGDEVRAVANDLKAFDSEYGRVWQVIILTGSYWMNFSHEPFLSMQFKYSN	180
<b>Sj22.6</b>	YVCLLWRTPSS	191

**Abb 14: Identität der Klone 9 und 26 mit dem Membranprotein Sj22**

### D-2-5-2 Klone 28 und 48

Die Klone 28 und 48 kodieren für das schistosomale Paramyosin. Klon 28 ist identisch mit der von YANG et al. (1992) publizierten Sequenz für einen Teilbereich des Paramyosins von *S. japonicum*. Klon 48 entspricht einer von LANAR et al. (1986) publizierten Sequenz, die für einen anderen Abschnitt des Paramyosin von *S. mansoni* kodiert. Das offene Leseraster beginnt an Position 187 und endet an Position 762 der Nukleotidsequenz und kodiert für 183 Aminosäuren der Paramyosins von *S. japonicum*., dessen vollständige Sequenz in der EMBL-Invertebraten-Datenbank unter der Nummer Q05870 abgerufen werden kann. Paramyosin ist in großen Mengen als Muskelprotein in Schistosomen enthalten und gilt als Vakzinekandidat (LANAR et al., 1986). In einer Studie wurde die humorale Antwort parasitologisch positiver und negativer Personen gegen dieses Antigen untersucht (CORRERA-OLIVEIRA et al., 1989). Interessanterweise wurde dabei gefunden, daß parasitologisch negative Personen im Vergleich zu infizierten Personen einen deutlich erhöhten Antikörper-Titer gegen dieses Protein besaßen. Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, daß die humorale Immunantwort gegen Paramyosin eine Rolle bei der natürlichen Resistenz gegen eine Schistosomeninfektion spielt. Für die Immundiagnose ist dieses Protein allerdings von eingeschränktem Wert – es wurde Kreuzreaktionen mit den homologen Proteinen anderer Parasiten aufgezeigt.

### D-2-5-3 Klone 14, 49 und 83

Die von Klone 14, 49 und 83 kodierten Proteine weisen eine hohe Homologie mit dem Gen für das Fimbrin von *S. mansoni* auf (SABER et al. 1994) (s. **Anhang**). Fimbrin spielt eine wichtige Rolle bei der Vernetzung von Actin im Muskel. Es wird ebenfalls als potentieller Vakzinekandidat für *S. mansoni* diskutiert (HIRSCH et al. 1997). Das entsprechende Gen von *S. japonicum* ist noch nicht beschrieben. Die sequenzierten Bereiche zeigen eine Homologie von 86 % mit dem Gen von *S. mansoni*. Die Länge aller drei Klone könnten der vollständigen cDNA entsprechen (bei *S. mansoni* sind es 2400 bp).

#### D-2-5-4 Klone 27, 44, 51, 74 und 82

Bei den Klonen 27, 44, 51, 74 und 82 handelt es sich um unbekannte Proteine von *S. japonicum*, denn es ergaben sich keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten Sequenzen. Die Nukleotidsequenz des Klons 44 zeigte daß, kein offenes Leseraster im unmittelbaren Anschluß an das durch den Vektor vorgegebene Startcodon vorhanden war. Da der Klon ohnedies nur schwach mit den Patientenseren reagierte, wurde auf die weitere Untersuchung verzichtet. Die Nukleotidsequenz des Klons 74 zeigte von Nukleotid 1-130 eine Homologie mit dem Paramyosin. Die Sequenz von Position 130 bis 900 ergab jedoch ein offenes Leseraster für ein unbekanntes Protein. Da die positive Immunreaktion dieses Klones vermutlich auf den Paramyosin-Anteil zurückzuführen war, wurde auch er nicht weiter bearbeitet.

#### D-2-6 Beurteilung der Verwendbarkeit dieser Klone

Aus der ermittelten Immunreaktivität und den Ergebnissen der Sequenzanalyse mußte ein Strategie zu Weiterführung der Experimente entwickelt werden. Eine Zusammenfassung der Daten ist in der folgende Tabelle wiedergegeben:

Klon Nr.	cDNA (bp)	Protein (MW)	Beschreibung	Reaktion mit Patientenseren
9	1000	27 kDa	Sj22 (Membranprotein)	+++
14	2500	55 kDa	S.j. Fimbrin	+++
26	1000	27 kDa	Sj22 (Membranprotein)	+++
27	>2000	?kDa	unbekanntes S.j Protein	+
28	>3000	95 kDa	S.j. Paramyosin	++
44	2500	65 kDa	unbekanntes S.j. Protein	+
48	3000	95 kDa	S.j. Paramyosin	++
49	2800	55 KDa	S. j. Fimbrin	+++
51	1700	57kDa	unbekanntes S.j Protein	+++
74	3000	95kDa	S.j. Paramyosin	+++
82	1100	28 kDa	unbekanntes S.j Protein	+++
83	2400	48 kDa	S.j. Fimbrin	+++

**Tabelle 5: Charakterisierung der in pBluescript SK klonierten *S. japonicum* Antigene**

Legende:   +++ = starke Reaktion mit Patientenseren  
 ++ = mittelstarke Reaktion mit Patientenseren  
 + = schwache Reaktion mit Patientenseren

Die Klone 28, 48 und 74 reagierten sehr gut mit den Patientenseren. Sie entsprechen jedoch dem Paramyosin, von dem aus früheren Publikationen bekannt ist, daß es nicht ausreichend spezifisch für Schistosomen ist (es gibt immunologische Kreuzreaktionen mit anderen Helminthen).

Wesentlich interessanter erschienen die Klone 9 und 26 (Sj22) und 49 und 83 (Sj Fimbrin). Die rekombinanten Proteine waren als definierte Banden im Westernblot erkennbar, d.h. sie waren stabil. Außerdem reagierten sie immunologisch sehr stark und eine Spezifität für die Spezies *Schistosoma* sollte zumindest für Sj22 garantiert sein. Dies hat sich in der weiteren Arbeit auch bestätigt, wie später noch beschrieben werden wird.

Die Klone 27, 51 und 82 waren dagegen als rekombinante Proteine in *E. coli* offensichtlich nicht stabil. Dies hat sich in anschließenden Experimenten ebenfalls bestätigt, und es mußten alternative Strategien zu ihrer Expression entwickelt werden.

Mit Ausnahme von Klon 44 und der drei Klone für Paramyosin stellten also alle diese Antigene potentielle Kandidaten für die Immundiagnose dar. Es wurde daher versucht, sie in größerem Maßstab und in reiner Form darzustellen. Dazu waren die Phagemide als Expressionsvektoren ungeeignet. Die entsprechenden cDNAs wurden daher in ein neues effizienteres Expressionssystem umkloniert, das zu diesem Zweck eigens konstruiert wurde.

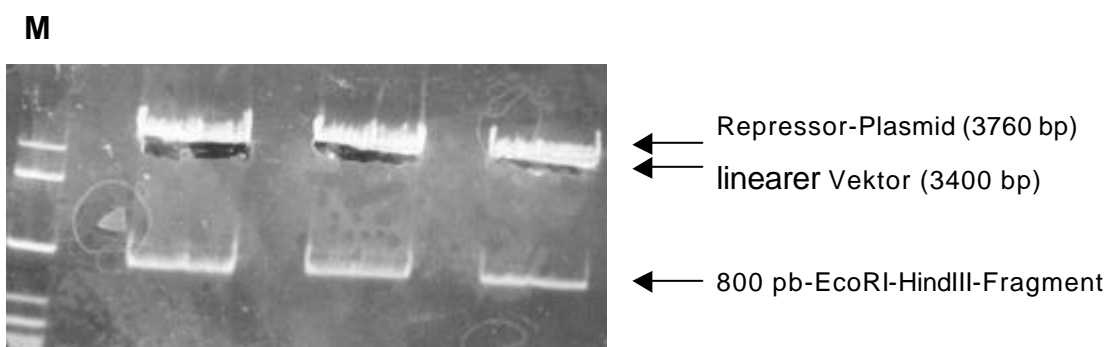
### **D-2-7 Konstruktion des Expressionsvektor pQE-ZAP**

Zur Expression der rekombinanten Antigene wurde der Expressionsvektor pQE-ZAP neu entworfen. Er erlaubt die Expression von Genen im selben Leseraster wie in Lambda ZAPII bzw. in den Phagemiden, jedoch in wesentlich größerer Menge und ohne lacZ-Anteil, stattdessen mit einer Affinitätssequenz zur Reinigung der Proteine über eine Metall-Affinitätsmatrix. Der pQE-ZAP Vektor entspricht im Prinzip dem Typ III / IV der pQE-Expressionsvektoren von QIAGEN. Die pQE-Vektoren besitzen zur Expression von rekombinanten Genen einen extrem starken Promotor vom Bakteriophagen T5, dem zwei in Tandem angeordnete lac Operator Sequenzen

folgen. Dies garantiert eine wirksame Repression des Promotors durch den lac-Repressor in Abwesenheit des Induktors IPTG. Im Anschluß an die Promotor/Operator-Region folgt als starkes Translationsinitiations-Element eine synthetische ribosomale Bindungsstelle (RBS II) mit nachfolgendem AUG-Startcodon und eine Sequenz, die für 6 Histidine kodiert. Die Transkription wird durch den Terminator  $t_0$  des Phagen Lambda und  $t_1$  des *E. coli* Operon terminiert. Als Selektionsmarker dient das Gen für Ampicillinresistenz.

Für die Konstruktion des Vektors pQE-ZAP wurde als Ausgangsmaterial das oben unter D-1-3 schon beschriebene Plasmid pDS-Sti2-E16 verwendet. Zwischen die EcoRI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen wurde eingeführt, der mehrere wichtige Restriktionsschnittstellen des Mischlinkers in pBluescript SK enthält. Der Adapter wurde aus zwei komplementären 54mer-Oligonukleotiden (ZAP A minus und ZAP A plus) hergestellt, die nach der Hybridisierung am 5'-Ende eine kohäsive EcoRI- und am 3'-Ende eine kohäsive HindIII-Schnittstelle aufwiesen.

Zur technischen Vereinfachung der Ligierung des Adapters in pDS-Sti2 wurde ein pDS-Sti2-Klon verwendet, der ein 800 bp Insert trug (ein Derivat des Klones pDS-Sti2-Sm16, das durch Deletion eines XhoI-Fragments konstruiert worden war). Durch Herausfallen des 800 bp-Fragments nach Spaltung mit EcoRI und HindIII konnte der vollständige Verdau des Vektors leicht überprüft werden (**Abb. 15**)

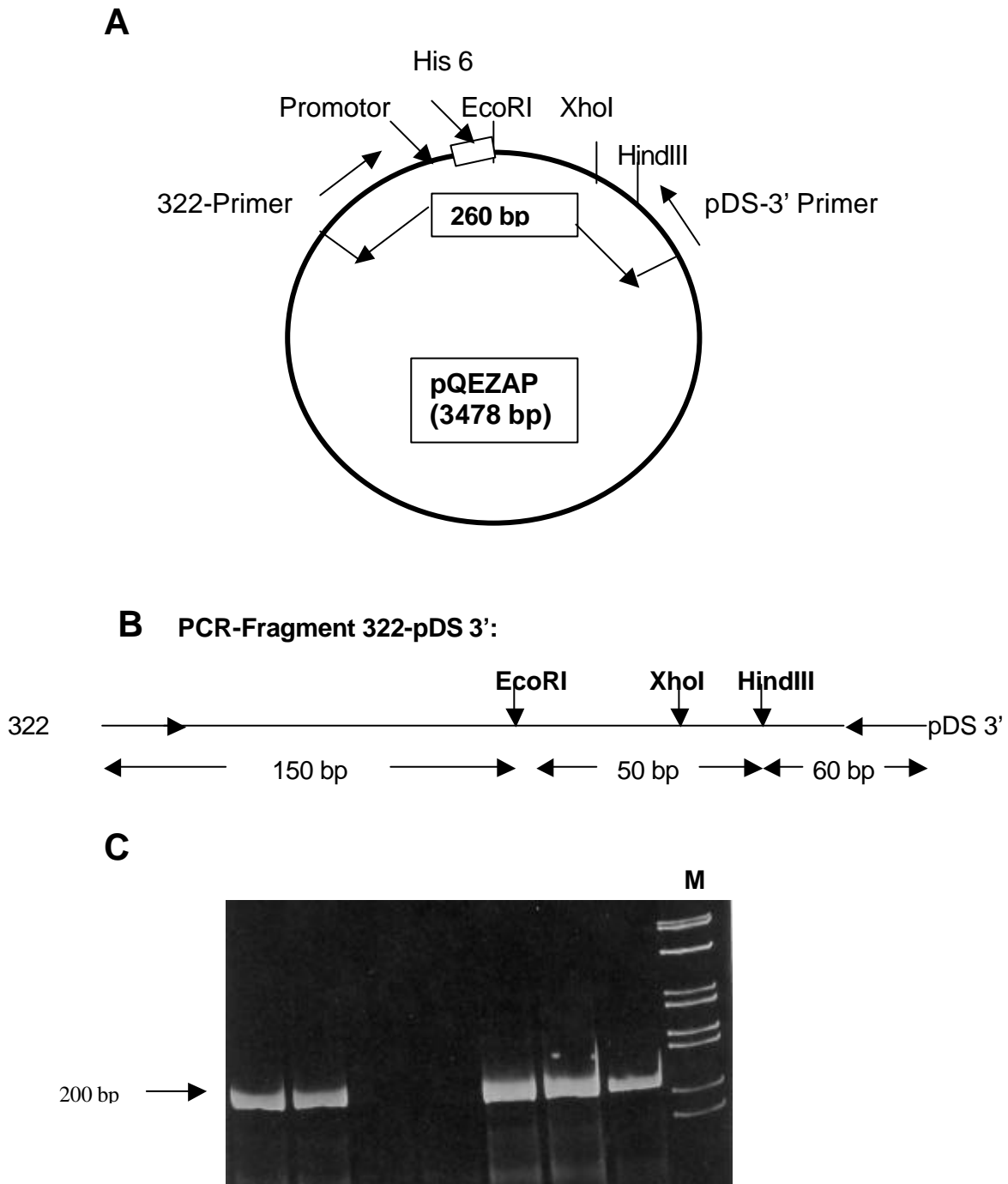


**Abb.15: Doppelrestriktionsverdau des Plasmids pDS-Sti2-Sm16 mit EcoRI und Hind III.**

Plamid-DNA von drei pDS-Sti2-Sm16-Klonen wurde mit EcoRI und HindIII verdaut und auf einem vertikalen Agarosegel aufgetrennt. Die lineare Vektorbande ist bereits ausgeschnitten.

## D-2-8 Überprüfung des Plasmids pQE-ZAP mittels Restriktionsverdau

Die Konstruktion der Expressionsvektor pQE-ZAP wurde folgendermaßen überprüft: Einzelne Kolonien wurden durch PCR mit den Primern ZAP A minus und 322 analysiert. Richtigen Klone ergeben dabei ein 200 bp Fragment, falsche Klone dagegen kein Fragment (**Abb.16**).



**Abb. 16: Überprüfung den pQEZAP-Plasmide mittels PCR-Analyse. A:** Schema des Plasmids mit eingezeichneten Restriktionsschnittstellen und Primern; **B:** Strategie der PCR-Analyse; **C:** PCR-Ansätze für mehrere Kolonien wurden auf einem 6% Polyacrylamid Gel analysiert.



Von Klonen, die in der PCR ein 200 bp-Fragment aufzeigten, wurde DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau nochmals überprüft. Die Klonierungsstelle in pQE-ZAP hat folgende Sequenz:

### Codierender Bereich am N-Terminus von pQE-ZAP

EcoRI                      NotI

ATG'AGA'GAA'TTA'CAT'CAC'CAT'CAC'CAT'CAC'GAA'TTG'AAT'TCG'GCG'  
 Met Arg Glu Leu His His His His His His Glu Phe Asn Ser Ala

XbaI              SpeI              BamHI      XhoI              ApaI              KpnI              HindIII

GCC'GCT'CTA'GAA'CTA'GTG'GAT'CCT'CGA'GGG'CCC'GGT'ACC'AAG'CTT  
 Ala Ala Leu Glu Leu Val Asp Pro Arg Gly Pro Gly Thr Lys Leu

### D-2-9 Umklonierung der *S. japonicum* Antigene in pQE-ZAP

Alle charakterisierten immunreaktiven *S. japonicum* Klone aus **Tabelle 5** wurden aus dem Phagemid-Vektor pBluescript SK in pQE-ZAP umgesetzt. Dazu wurde die Phagemid-DNA mit EcoRI und XhoI verdaut, die resultierenden Fragmente auf 1% Agarosegelen aufgetrennt, die cDNA-Inserts aus den Gel eluiert und in den ebenfalls mit EcoRI und XhoI geschnittenen Expressionsvektor ligiert. Nach Einschleusung der rekombinanten DNA in kompetente *E. coli* XL-1 Blue pREP Bakterien wurden die Ampicillin + Kanamycin-resistenten Klone durch Verdauung mit EcoRI und XhoI analysiert.

Im Anschluß an die erfolgreiche Klonierung wurde versucht, die entsprechenden rekombinanten Proteine zu exprimieren. Unglücklicherweise konnte nur das Gen aus den Klonen 9 und 26 (beide Sj22) erfolgreich exprimiert werden. Für die andere Klone mußten neue Strategien zur Expression des Antigens entwickelt werden.

#### D-2-9-1 Expression von *S. mansoni* Fimbrin (Klone 49 und 83)

Der Versuch der direkten Umklonierung der cDNA aus den Klonen 49 und 83 über die Restriktionsschnitte EcoRI und XhoI in den Expressionsvektor pQE-ZAP verlief erfolglos. Die später ermittelte DNA-Sequenz (s. **Anhang**) ergab, daß im Gen mehrere EcoRI-Schnitte vorhanden sind.

Es wurde daher versucht, das Gen aus Klon 83 (aufgrund von Sequenz- und Restriktionsanalysen konnte davon ausgegangen werden, daß die cDNA der Klone 49 und 83 nahezu identisch war) über die Restriktionsschnittstellen NotI–XhoI umzuklonieren. Das aus Klon 83 mit NotI–XhoI isolierte 2400 bp Fragment wurde in das ebenso geschnittenen Plasmid pQE-ZAP ligiert und positive Transformanten mit Hilfe einer entsprechende Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde identifiziert.

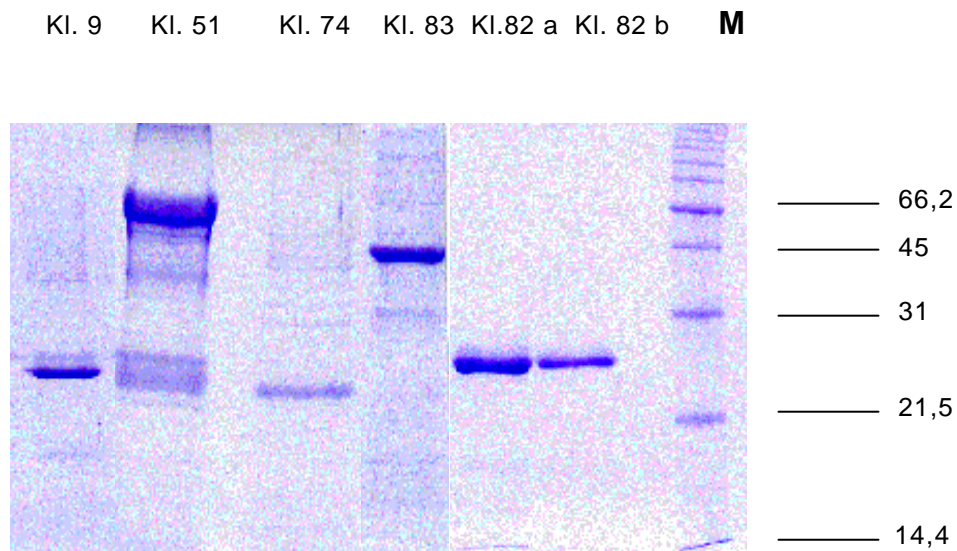
Die Expression des Proteins führte leider nicht zu einem stabilen Produkt (auf der SDS-PAGE waren viele Abbauprodukte zu sehen). Es wurde daraufhin versucht, ein verkürztes Protein zu exprimieren. Durch Verdauung mit SpeI, welches zweimal in der cDNA vorkommt, und Zurückligieren wurden ca. 1100 bp aus dem Ausgangsklon deletiert. Die Richtigkeit der Konstruktion durch DNA-Sequenzierung überprüft. Das auf diese Weise erhaltene offene Leseraster codiert für ein Protein mit einer errechneten Molekülmasse von 48 KDa, welches sich dann als stabil erwies (**Abb.17**).

#### **D-2-9-2 Expression von Klon 82 (Funktion unbekannt)**

Die Sequenzanalyse hatte ergeben, daß das offene Leseraster des 1100 bp langen cDNA-Fragments von Klon 82 nicht mit dem Raster des lacZ-Startcodons übereinstimmte. Die immunologisch positive Reaktion des Klones mußte entweder auf einen Frameshift der Ribosomen oder auf die Verwendung eines inneren Startcodons zurückzuführen sein. Um das Protein in pQE-ZAP zu exprimieren, wurde das Leseraster wie folgt korrigiert: Das Phagemid wurde zunächst mit EcoRI gespalten, die überhängenden Enden mit T4 DNA Polymerase I aufgefüllt und schließlich mit Xho I geschnitten. Der Vektor pQEZAP wurde mit Xba I gespalten, die Enden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und dann zurückligiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit Spe I gespalten, die Enden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt, dann mit XhoI nachgeschnitten. Das 1100 bp-Fragment und der geschnittene pQE-ZAP-Vektor wurden durch Gelelektrophorese isoliert und ligiert. Das auf diese Weise korrigierte offene Leseraster besteht aus 636 Nukleotiden und codiert für ein Protein von 212 Aminosäuren (errechnete Molekülmasse 28 KDa, **Abb.17**).

### D-2-9-3 Expression von Klon 51 (Funktion unbekannt)

Anhand der ermittelten Nukleotidsequenz von Klon 51 ergab sich, daß nicht das erste sondern das dritte Leseraster einen Anschluß an das lac-Z-Peptid des pQE-ZAP-Vektors erlaubte. Daher wurde das Phagemid 51 mit *SpeI* linearisiert, die Enden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und die DNA dann mit *XhoI* geschnitten. Das resultierende 1800 bp Fragment wurden in den Vektor pQE-ZAP, der mit *EcoR I* linearisiert, mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und schließlich mit *Xho I* geschnitten worden war, ligiert. Transformierte *E. coli* XI1-Blue pREP-Zellen exprimierten ein ca. 60 kDa großes Protein (**Abb. 17**).



**Abb. 17: Aufreinigung der rekombinanten Antigene.** Nach Umklonierung den cDNA-Inserts aus den Phagemide in das Expressionssystem pQE-ZAP wurden die entsprechenden Proteine exprimiert, über eine Talon-Affinitätsmatrix aufgereinigt und auf einem 12% SDS-PAGE-Minigel analysiert.

### D-2-9-5 Expression von Klon 27 als MS2-Fusionsprotein

Da das von Klon 27 codierte Protein als Histidin-Fusionsprotein nicht stabil war, wurde beschlossen, es als Fusionsprotein mit dem N-terminalen Bereich der MS2-Polymerase zu synthetisieren. Fusionen mit der MS2-Polymerase sind besonders schwer löslich und fallen daher meist als "inclusion bodies" in den Zellen an, wodurch sie vor endogenen Proteasen weitgehend geschützt sind.

Als Vektor stand das Plasmid pEX34c zur Verfügung, in dem die EcoRI-Schnittstelle als Insertionsort für die cDNA im richtigen Leseraster vorliegt.

Im Vektor pEX34c steht die Expression unter der Kontrolle des  $P_L$ -Promotors des Bakteriophagen  $\lambda$  und kann mit Hilfe eines temperatursensitiven Repressors C1-857 für den  $\lambda$   $P_L$ -Promotor reprimiert bzw. induziert werden (REMAUT et al., 1981 & 1983). Am 3' Ende des MS2-Fragments findet sich eine Polylinker-Region zur Insertion von Fremd-DNA. pEx34c ist ein Derivat des Expressionsvektors pEx31a,b,c (STREBEL et al., 1985) und unterscheidet sich von diesem nur durch die Deletion der PstI-Schnittstelle im Gen für Ampicillinresistenz, das als Selektionsmarker dient. Die Varianten pEX34a, b und c unterscheidet sich durch die relative Lage der Linkerregion zum Leseraster des MS2-Replikasegens. Das MS2-Expressionssystem zeichnet sich durch eine hohe Expressionsrate aus, und exprimierte MS2-Fusionsproteine sind mit relativ einfachen Methoden aufzureinigen. Der MS2-Fusionsanteil besteht aus 100 Aminosäuren.

Die cDNA-Inserts des Klons 27 aus Phagemid wurde über EcoRI /HindIII in die  $\alpha$ -Variante des Vektors pEx34 subkloniert. Kompetente *E. coli* W<sub>6</sub> ( $\lambda_{rex}$ ) Bakterien, die den Wildtyp des C1-Repressors des Bakteriophagen  $\lambda$  produzieren, wurden mit dem Ligaseansatz transformiert. Von den resultierenden Ampicillin-resistenten Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und damit *E. coli* 537-Zellen transformiert. Diese Zellen enthalten ein Plasmid, das eine temperatursensitive 857-Mutante des C1-Repressors und als Selektionsmarker das Kanamycinresistenzgen trägt. Das MS2-Fusionsprotein von Klon 27 wurde wie in Kapitel C-4-1 beschrieben durch differentielles Waschen aus der Membranfraktion aufgereinigt (KÜPPER et al., 1982) und in dieser Form als diagnostisches Antigen getestet.

## Teil 2: Diagnose der Bilharziose mit Hilfe rekombinanter Antigene

Nachdem alle rekombinanten Proteine in präparativem Maßstab und in reiner Form dargestellt waren, beschäftigte ich mich mit der Frage, ob diese aus verschiedenen Schistosomenarten isolierten Antigene für eine Spezies-spezifische Immundiagnose der Bilharziose geeignet sind. Die Immundiagnose sollte auf dem Nachweis Parasiten-spezifischer Antikörper im Blut bzw. im Serum von infizierten Patienten bestehen.

### D-3-1 Seren für die Immunologische Charakterisierung der Antigene

Die hierbei hauptsächlich verwendeten Infektionsseren stammen aus zwei Feldstudien, die in Zusammenarbeit mit zwei afrikanischen Arbeitsgruppen durchgeführt worden waren. Eine länger dauernde Studie wurde in den Jahren 1987-1989 in Molodo, einem Dorf nordöstlich von Bamako, der Hauptstadt Malis, durchgeführt. In dieser Region treten sowohl *S. mansoni* als auch *S. haematobium* auf. Eine Infektion mit *S. haematobium* kann über die Bestimmung der Eier im Urin durch Filtration relativ empfindlich nachgewiesen werden. Als *S. mansoni*-spezifische Seren wurden solche herangezogen, bei denen die betreffenden Patienten in Stuhluntersuchungen eindeutig Eier von *S. mansoni* aufwiesen, gleichzeitig aber frei von *S. haematobium*-Eiern im Urin waren. Reine *S. haematobium*-Seren wurden von Patienten in Nigeria gewonnen, die in einer Region lebten, wo ausschließlich *S. haematobium* auftritt. Im **Anhang** liegen Tabellen mit genaueren Daten der Infektionsseren vor.

Als negative Kontrollen wurden zum einen die Seren von deutschen Labormitarbeitern („Europäische Kontrollen“) eingesetzt, die nachweislich noch nie mit Schistosomen infiziert waren. Zum anderen kamen Seren von Labormitarbeitern aus den Endemiegebieten („Endemische Kontrollen“), die angeblich weder vor noch zum Zeitpunkt der Blutabnahme eine Schistosomeninfektion hatten, zum Einsatz.

Zum Nachweis von *S. japonicum*-Infektionen wurden von Prof. Dr. Andreas Ruppel, Universität Heidelberg, mehrere Seren von chinesischen Patienten und chinesischen gesunden Kontrollpersonen - allerdings nur in sehr kleinen Aliquots - zur Verfügung gestellt. Es konnten damit nur eine beschränkte Anzahl von Versuchen gemacht werden

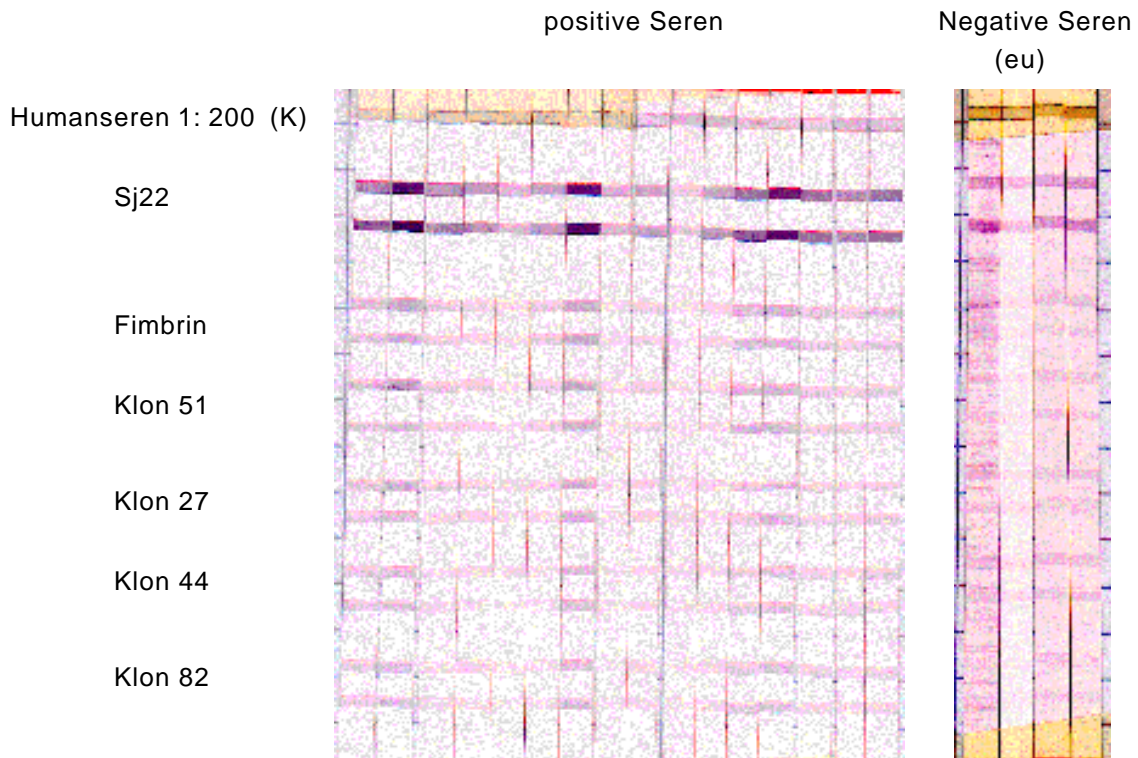
### **D-3-2 Immunreaktion der neu isolierten rekombinanten *S. japonicum*-Antigene**

Als immunologische Technik zur Untersuchung der rekombinanten Antigen mit den Patientenseren wurde das Line-Blot-Verfahren, (T. RINNERT, Diplomarbeit, Univ. Giessen, 1996) eingesetzt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen sehr empfindlichen Nachweis von parasitenspezifischen Antikörpern im Serum oder Vollblut von infizierten Personen. Die genaue Durchführung des Verfahrens ist oben unter **C-1-1-4** beschrieben. Durch Optimierung der Versuchsparameter anhand der Immunreaktivität der rekombinanten Antigenen SmE16 (Ei-Calmodulin), Sm31 (Cathepsin) B und Sm32 (Hämoglobinase) war im Labor schon vor einiger Zeit ein standardisiertes und reproduzierbares Testverfahren zum Nachweis von Schistosomen-Infektionen entwickelt worden. Eine Besonderheit dieses Testverfahrens ist der kombinierte Einsatz von verschiedenen Antigenen, der eine Steigerung der Sensitivität des immunologischen Nachweises im Vergleich zur Verwendung einzelner diagnostischen Antigene ermöglicht. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip eines indirekten ELISA. Als Trägerphase diente eine Nitrocellulosemembran, auf die Antigene mit einem Tuschestift direkt aufgetragen wurden. Durch die Verwendung bestimmter Antigen-Verdünnungspuffer und die schonende Art des Auftragens bleiben Konformationen, die für die Antigenität der Proteine verantwortlich sind, weitestgehend erhalten.

Nach dem Auftrag der Antigene und Absättigung mit Tween 20 wird die Nitrocellulosemembran mit Hilfe eines Streifenschneiders senkrecht zur Auftragsrichtung der Antigene in schmale Streifen geschnitten. Auf diese Weise können ohne viel Aufwand mehrere hundert Teststreifen für die Inkubation mit Patientenseren gleichzeitig hergestellt werden

Die zu untersuchenden Humansen (Infektionsseren und Kontrollseren) werden in 1:50 bis 1:200 Verdünnung eingesetzt und 0.5 bis 4 Stunden mit den Teststreifen in geeigneten Wannen (Acutran, Schleicher & Schuell) inkubiert. Nach einem Waschschrift folgt die Inkubation mit einem zweiten, alkalische Phosphatase konjugierten Antikörper für eine Stunde. Die Bindung des zweiten Antikörpers wird durch eine durch das konjugierte Enzym bewirkte Farbreaktion sichtbar gemacht.

Alle aus der *S. japonicum*-Genbank erfolgreich isolierten und exprimierten rekombinanten Antigene wurden nach präparativer Aufreinigung zunächst mit einer größeren Zahl von afrikanischen Patientenseren mit einer Mischinfektion von *S. mansoni* und *S. haematobium* getestet, um die Stärke der jeweiligen Immunreaktion herauszufinden (**Abb.18**).



**Abb. 18: Immunreaktion der rekombinanten *S. japonicum*-Antigene im Line-Blot**

Die gereinigten rekombinanten Antigene wurden in der links angegebenen Reihenfolge jeweils zweifach auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen, die Membran in Streifen geschnitten, jeder Streifen zunächst mit einem Infektions- oder Kontrollserum und anschließend mit einem Phosphatase-markierten zweiten Antikörper inkubiert und schließlich einer Phosphatase-spezifischen Farbreaktion unterzogen. Die Infektionsseren sind von Patienten mit einer Doppelinfektion von *S. mansoni* und *S. haematobium*.

Als positives Ergebnis dieses Tests stellte sich heraus, daß das Antigen Sj22 mit allen Infektionsseren stark reagierte, bei den Kontrollseren dagegen zu so gut wie keiner Farbreaktion führte (die Membran ist leicht überfärbt, um die Reaktion der übrigen Antigene zu dokumentieren; eine deutlichere Unterscheidung zwischen positiver und negativer Reaktion von Sj22 befindet sich auf **Abb. 20**). Sj22 wird von den meisten Patientenseren gleich gut oder sogar besser erkannt als die bisher beschrieben, für die Diagnose von Infektionen mit *S. mansoni* und *S. haematobium* hervorragend geeigneten Antigene Sm31, Sm32 und SmE16 (**s. Abb. 20**).

Als negatives Ergebnis ist anzumerken, daß alle anderen untersuchten Proteine gegenüber Sj22 nur eine unerwartet schwache Reaktivität zeigten und die Mehrzahl von ihnen nur von einem geringen Teil der Patientenseren erkannt wurde. Die schwache Reaktion war aufgrund der Vorversuche nicht erwartet worden. Allerdings gehörte außer Sj22 keines der getesteten Antigene zur Gruppe der immunologisch sehr stark reagierenden Klone, sondern eher zur Gruppe der mittelstark reagierenden Klone. Eventuell spielt auch die Konformation der rekombinanten Proteine eine Rolle. Bei der relativ geringen Expressionsrate in den Lambda-Phagen und Phagemiden konnten sich möglicherweise wichtige konformationale Epitope ausbilden, die bei der Expression in pQE-ZAP und der anschließenden denaturierenden Aufreinigung mit Guanidin-Hydrochlorid und Harnstoff verloren gingen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte aus Zeitgründen dieser Frage nicht weiter nachgegangen werden. In der vorliegenden Form waren die Antigene für das angestrebte Ziel einer zwischen *S. mansoni* und *S. haematobium* unterscheidenden Immundiagnose jedenfalls als nicht ausreichend geeignet anzusehen.

Die Stärke der Immunreaktion von Sj22 war allerdings so überzeugend, daß sich die Untersuchung für seine Verwendung zur Optimierung der allgemeinen Immundiagnose der Bilharziose als lohnend erscheinen ließ. Da dieses Antigen außerdem aus einer Genbank des asiatischen Vertreters der Parasiten stammte, konnte es möglicherweise zur Etablierung einer empfindlichen Nachweismethode für diese geographische Variante herangezogen werden, denn die bisher charakterisierten diagnostischen *S. mansoni*-Antigene eigneten sich nur bedingt für den Nachweis einer Infektion mit *S. japonicum*. Das bislang beste diagnostische *S. mansoni*-Antigen, SmE16, wird von *S. japonicum*-Patientenseren z.B. gar nicht erkannt.

Da gerade in China in der Vergangenheit der größte Fortschritt in der Bekämpfung der Bilharziose erreicht wurde, es andererseits aber kein ausreichend empfindliches Nachweisverfahren zum Aufspüren geringer Zahlen von infizierten Personen in der Bevölkerung gibt (eine Infektionsrate < 3% der Bevölkerung ist mit vorhandenen Nachweismethoden nicht erkennbar), könnte das Ergebnis für die Diagnose der Seuche im Süden Chinas und darüber hinaus im gesamten südostasiatischen Raum von großer Bedeutung sein.



Es war zu erwarten, daß das Antigen von den autologen *S. japonicum*-Seren noch besser erkannt würde als von den getesteten heterologen *S. mansoni*- und *S. haematobium*-Seren.

### **D-3-3 Sj22 als diagnostisches Antigen für die Schistosomiasis japonica**

Die Brauchbarkeit dieses neu charakterisierten Antigens für die Diagnose von *S. japonicum* konnte aufgrund des Mangels an Seren von *S. japonicum*-infizierten Patienten nicht im eigenen Labor, sondern nur in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. McManus in Brisbane/Australien herausgestellt werden. Neben Sj22 wurden in diesem Zusammenhang auch die bereits beschriebenen Antigene Sm32- und SmE16 getestet. Sie mußten zu diesem Zweck allerdings zunächst präparativ gewonnen werden. Da sowohl Sm32 als auch SmE16 als rekombinante Proteine in einer Fusion mit 6 Histidinen vorliegen, konnten sie wie Sj22 nach dem im Methodenteil beschriebene Verfahren aufgereinigt werden. Zur Durchführung des Tests wurden die mit den Antigenen beladenen Nitrocellulosestreifen an das Labor in Brisbane geschickt und die Inkubation mit den Seren und die Farbreaktion dort durchgeführt.

Ein erster Test wurde mit Seren von 54 chinesischen Bilharziose-Patienten und gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Die Seren wurden in vier Kategorien aufgeteilt:

- a) Seren aus einem nicht-endemischen Gebiet von Personen, die negativ für eine Infektion mit *S. japonicum* zu sein schienen
- b) Seren aus einem endemischen Gebiet von Personen, die aber ebenfalls negativ für eine Infektion mit *S. japonicum* zu sein schienen
- c) Seren von Patienten, bei denen zwei Jahren zuvor Eier von *S. japonicum* gefunden wurden, die aber durch eine zweijährige Nachbehandlung geheilt worden waren.
- d) Seren von Patienten, bei denen *S. japonicum*-Eier positiv nachweisbar waren.

Die für die Testserie verwendeten Seren stammten, abgesehen von den 8 Kontrollseren (Gruppe A), von einem endemischen Gebiet mit einer durchschnittlichen Infektionsrate von 15-20% der Bevölkerung.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

<b>Patienten Einteilung</b>	<b>getestete Anzahl</b>	<b>Anzahl von Positiven</b>	<b>Empfindlichkeit</b>	<b>Spezifität</b>
			<b>%</b>	<b>%</b>
A	8	2	--	75,0
B	6	2	--	67,0
C	12	6	--	50,0
D	28	20	71,4	--
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>30</b>	<b>71,4</b>	<b>61,5</b>

### **Erste vorläufige Ergebnisse des immunologischen Tests von *S. japonicum* Infektionen durch den Line-Blot.**

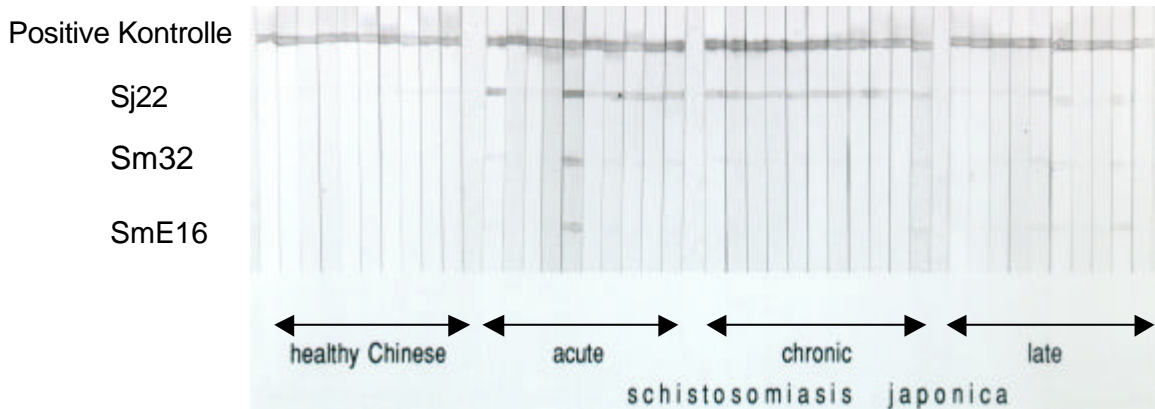
Die Spezifität (50–70%) und die Empfindlichkeit (71,4%) der Methode erschien anhand dieser Ergebnisse nicht zufriedenstellend. Da die in Gießen durchgeführten Tests mit afrikanischen Seren zu deutlich besseren Ergebnissen geführt hatten, war die in Australien ermittelte mangelnde Spezifität wohl eher auf technische Probleme bei der Durchführung des Tests zurückzuführen.

Daher wurde versucht, die Empfindlichkeit und die Spezifität des Tests durch eine verbesserte Darstellung der Antigene zu erhöhen. Um unspezifischen Hintergrundreaktionen zu verhindern, sollten die rekombinanten Proteine optimal gereinigt werden. Deshalb wurden neue Antigenpräparationen unter modifizierten Bedingungen angefertigt. Da nach der bisherigen Proteinaufreinigung mit Hilfe von Affinitätschromatographie die rekombinanten Proteine noch mit *E. coli*-Proteinen verunreinigt waren und außerdem eine hohe Menge an Harnstoff (8M) enthielten, was möglicherweise eine störende Wirkung haben konnte, wurden die Antigene durch Gel-Filtration und Dialyse vom Harnstoff und von anderen niedermolekularen Substanzen befreit.

Mit diesen gereinigten Antigenen wurde der Line-Blot in Brisbane mit den gleichen Seren und unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Studie wiederholt. Dabei stellte sich heraus, daß die Spezifität zwar verbessert wurde (90%), die Empfindlichkeit dagegen sehr niedrig geworden war (30-40%). Die beobachtete niedrige Empfindlichkeit ist am ehesten wiederum mit einer technisch unzureichenden Durchführung des Tests zu erklären, denn unter den optimalen

Laborbedingungen in Giessen waren mit afrikanischen Seren 98% Empfindlichkeit festgestellt worden. Dennoch sagte dieses Ergebnis, daß die Bedingungen für die Durchführung des Tests optimiert werden mußten, so daß sie auch unter weniger günstigen Umständen zu einem zuverlässigen Ergebnis führten.

Zur Erprobung des Verfahrens mit *S. japonicum*-Seren wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Ruppel an der Universität Heidelberg ein weiterer Versuch unternommen. Die Zusammenarbeit mit Heidelberg wurde möglich, nachdem Prof. Ruppel eine Kooperation mit der Universität Wuhan in Süd-China aufgebaut und eine größere Zahl von Patientenserum nach Heidelberg gebracht hatte. Diese Seren stammten von Schistosomiasis-Patienten aus der Hubei Provinz in Süd-China. Ersten in Heidelberg mit wenigen Seren durchgeführte Tests ergaben eine durchgehend positive Reaktion mit allen Patientenserum, die von chronischen Trägern der Krankheit stammten. Von den akuten und „späten“ Fällen reagierten einige Seren jedoch nicht. Alle Kontroll-Seren waren erwartungsgemäß negativ. (S. **Abb. 19**)



**Abb.19: Line-Blot mit Seren von *S. japonicum* Patienten.** Das Antigen S<sub>j</sub>22 wurde zusammen mit den schon beschriebenen Antigenen S<sub>m</sub>32 und S<sub>m</sub>E16 mit Seren von Patienten mit einer *S. japonicum*-Infektion getestet. Acute und chronic steht für Seren von Patienten mit der akuten und chronischen Form der Erkrankung. Late bezeichnet Seren von Personen, die nach mindestens zweijähriger Chemotherapie frei von Parasiten sind.

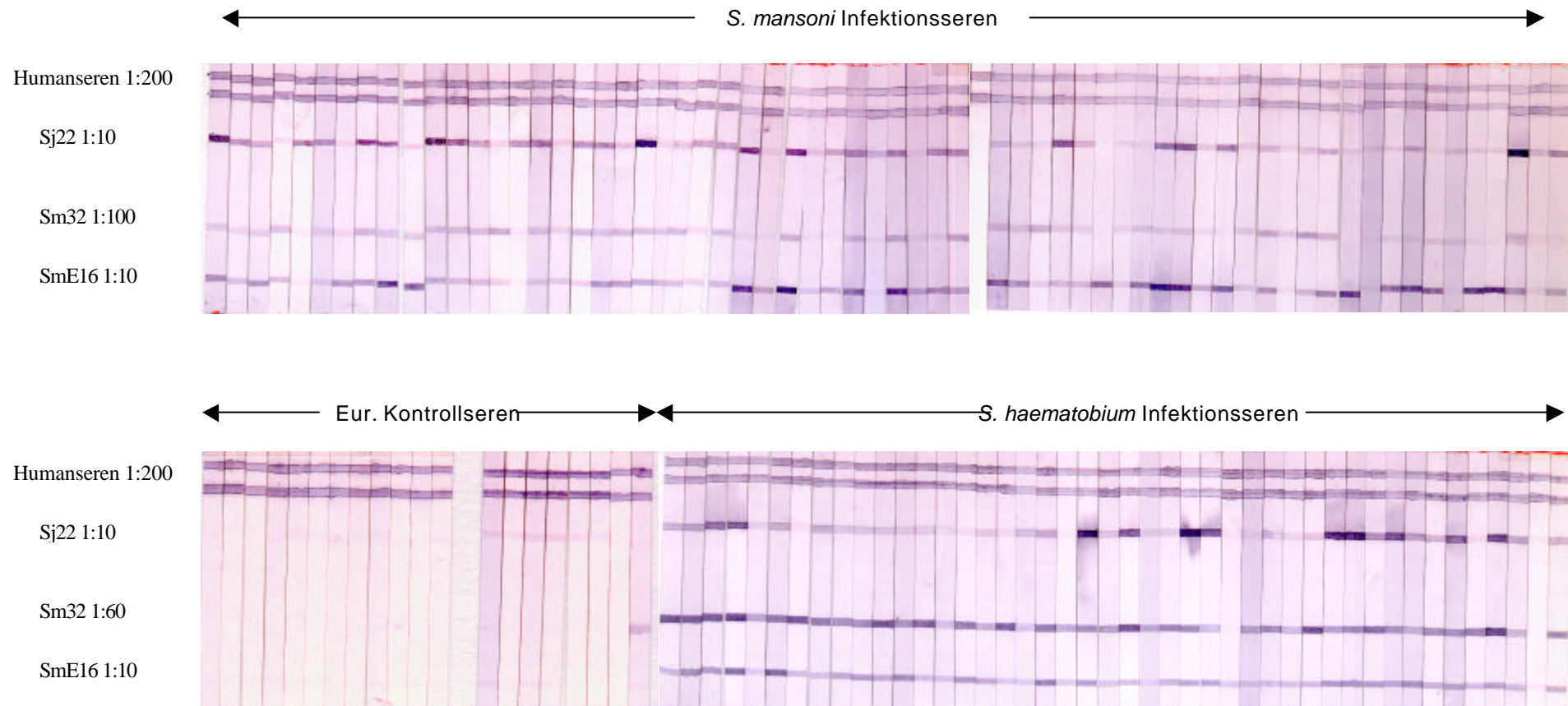
Zusammengefaßt weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß S<sub>j</sub>22 für die bisher nur unzureichend mögliche Diagnose von *S. japonicum* durchaus verwendbar ist, auch wenn der Nachweis in der frühen akuten Phase der Infektion möglicherweise nicht immer empfindlich genug ist. Wichtig ist die Diagnose der chronischen Phase, weil chronisch infizierte Patienten mit mittleren und leichten Infektionen oft keine

klinischen Symptome zeigen, aber dennoch dauernd Eier ausscheiden und so unerkannt zur Verbreitung der Seuche beitragen.

#### **D-3-4 Allgemeine Eignung von Sj22 für die Immundiagnose der Bilharziose**

Die vorläufigen Ergebnisse des Line-Blot-Verfahrens nicht nur mit *S. japonicum*-Seren, sondern auch mit den zur Identifizierung herangezogenen Seren von Patienten mit gemischten *S. mansoni*- und *S. haematobium*-Infektionen bestärken die Ansicht, daß das Antigen Sj22 ein sehr guter Kandidat für die allgemeine Immundiagnose der Bilharziose ist. Um dies objektiv beurteilen zu können, wurde eine große Zahl von gut definierten *S. mansoni*- und *S. haematobium*-Seren im Line-Blot untersucht. Auf die Teststreifen wurden zusätzlich zu Sj22 auch Sm32 und SmE16 aufgetragen (**Abb. 20**).

Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist für alle drei Antigene häufig eine positive Reaktion zu sehen. Bei den afrikanischen Patienten handelt es sich in überwiegendem Maß (> 98%) um chronische Träger der Krankheit. Sie stammen aus einer Region mit 90-100% Prävalenz der Bilharziose in der Bevölkerung. Aus diesem Test lassen sich mehrere wichtige Ergebnisse ablesen:



**Abb.20: Eignung von Sj22 für die Immundiagnose der Bilharziose.** 65 Seren von Patienten mit einer *S. mansoni*-Infektion, 44 Seren von Patienten mit einer *S. haematobium*-Infektion und 20 Seren von gesunden europäischen Personen wurden im Line-Blot mit den Antigenen Sj22, Sm32 und SmE16 getestet. Für den Blot mit den *S. haematobium*-Seren wurde das Antigen Sm32 in einer höheren Konzentration eingesetzt (1:60-Verdünnung der Stammlösung von ca. 1 mg/ml gegenüber einer 1:100-Verdünnung bei den *S. mansoni*-Seren)

1. Das Sj22-Antigen wird mit hoher Frequenz (96 %) von den Patientenseren erkannt.
2. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen *S. mansoni*- und *S. haematobium*-Patientenseren. (Die stärker erscheinende Reaktion des Antigens Sm32 mit den *S. haematobium*-Seren ist bedingt durch die höhere Konzentration des Antigens, die bei den Teststreifen für die *S. mansoni*-Seren zu niedrig war).
3. Zieht man alle drei Antigene (Sj22, Sm32 und SmE16) für die Diagnose in Betracht, gelangt man zu einer Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens von 99 %. (Eine Analyse der sehr schwach reagierenden Seren ergab, daß sie zumeist denaturiert oder sogar schon proteolytisch degradiert waren).
4. Die Kontroll-Seren waren unter den Testbedingungen erwartungsgemäß alle eindeutig negativ.

Als Beurteilung der bisher erhaltenen Ergebnisse bei der Suche nach neuen diagnostischen Antigenen in cDNA-Genbanken von *S. mansoni* und *S. japonicum* läßt sich zusammenfassen, daß mit Sj22 zumindest ein sehr guter Kandidat entdeckt wurde. Mit Hilfe dieses neuen Antigens läßt sich zumindest die allgemeine Diagnose der Bilharziose in Afrika und in Südamerika so weit optimieren, daß sich auch sehr seltene Fälle von Infektion in der Bevölkerung nachweisen lassen. Das Line-Blot-Verfahren ist gut geeignet, entsprechende Tests in großem Maßstab durchzuführen. Dies könnte zumindest in Regionen, wo die Krankheit nicht endemisch ist, aber leicht eingeschleppt werden kann (z.B. in den neu geschaffenen Bewässerungsanlagen im Norden Afrikas) von enormem Nutzen sein. Wie weiter unten noch ausgeführt werden wird, genügt für die Durchführung eines Line-Blots ein einziger tropfen Blut, der ohne invasive Maßnahmen z.B. aus der Fingerbeere gewonnen werden kann.

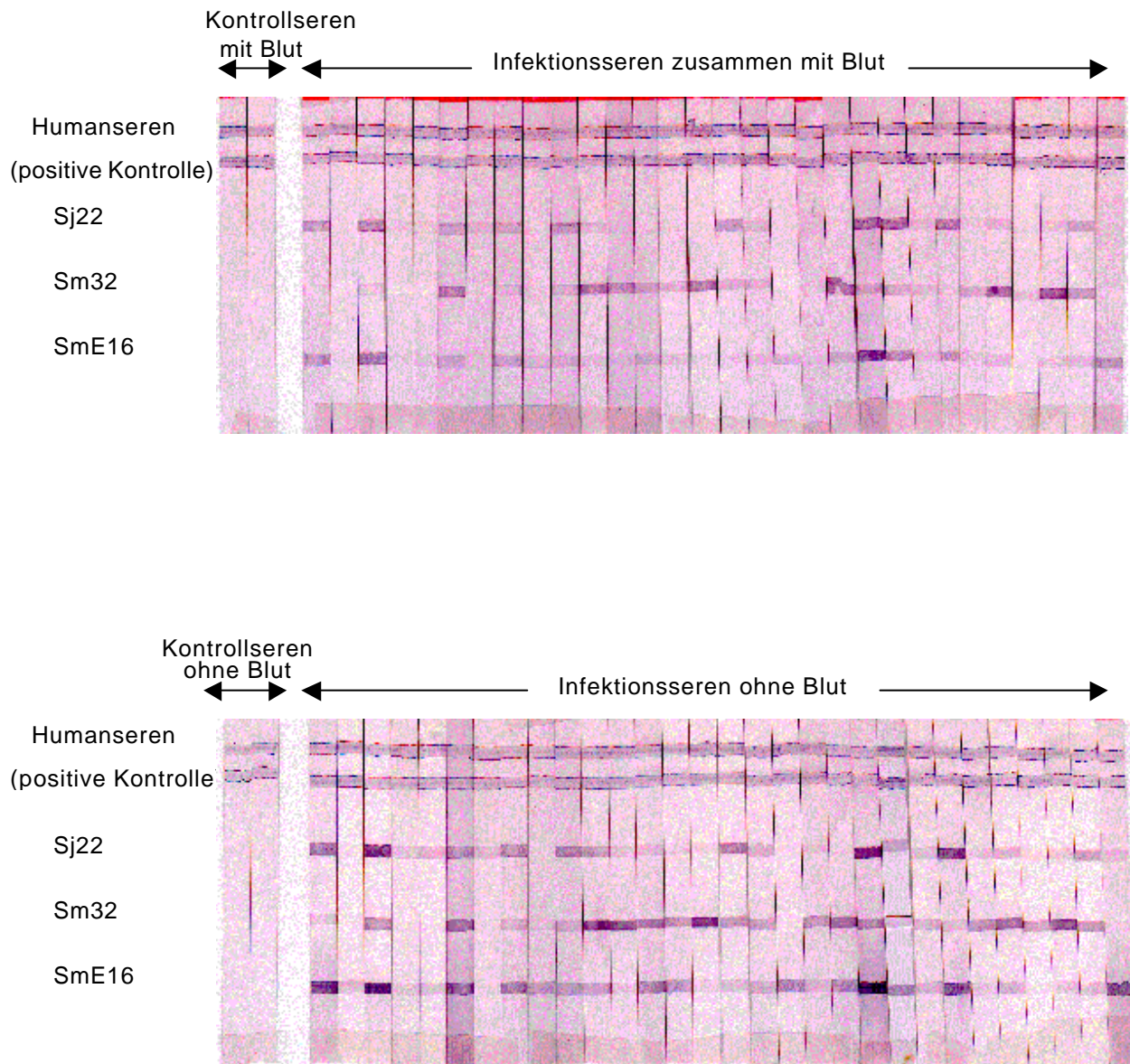
Darüberhinaus steht mit dem neuen Antigen Sj22 sehr wahrscheinlich ein hervorragendes Diagnostikum für die bisher nur unzulänglich nachweisbare Schistosomiasis japonica zu Verfügung. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse müssen allerdings noch durch umfangreichere Untersuchungen belegt werden.

### D-3-5 Ein einfacher Weg zur Serumgewinnung

Für das Line-Blot-Verfahren, wurden Patientenserum verwendet, die nach Standardverfahren aus mehreren Millilitern Blut gewonnen worden waren. Die Verwendung von Serum ist aber problematisch, denn einerseits ist die Gewinnung von Serum Zeit- und kostenaufwendig, andererseits besteht die Gefahr der Übertragung infektiöser Krankheiten durch den unsachgemäßen Umgang mit Kanülen, was in vielen Entwicklungsländern in starkem Maß zur Verbreitung von Infektionskrankheiten beiträgt. Um diese nicht zu unterschätzenden Probleme zu vermeiden, wurde versucht, Vollblut anstatt Serum für das Line-Blot-Verfahren zu verwenden. Aus Mangel an Bilharziose-Patienten in Gießen wurde ein Vorversuch mit 30 Patientenserum wie folgt durchgeführt: 10 µl heparinisiertes Vollblut (Blutgruppe O) wurden mit jeweils 10 µl Patientenserum gemischt und in zwei Portionen auf ein Stück Whatman-Papier pipettiert. Dieses Papier lagerte dann 2 Tage lang bei Raumtemperatur. Danach wurden die eingetrockneten Blutstropfen aus dem Papier ausgeschnitten, zusammen mit 0.5 ml Puffer (1 x TBST, 1% BSA und 1 mM DTT) in Eppendorfröhrchen überführt und 0.5-1 Stunde lang leicht geschüttelt. Mit dem Eluat aus dem Filterpapier wurde der Line-Blot wie gewöhnlich durchgeführt. Das in **Abb. 21** gezeigte Ergebnis demonstriert, daß Vollblut für den Line-Blot verwendbar ist. Trotz einer allgemeinen Herabsetzung der Signalstärke sind die Ergebnisse insgesamt zufriedenstellend.

Dieses Vorgehen könnte zum einen die Gewinnung der Blutproben im Feld wesentlich vereinfachen, zum anderen würde es die Gefahr der Übertragung infektiöser Krankheiten beim Umgang mit den Blutproben stark herabsetzen. Denn durch einen Einstich in die Fingerkuppe mit einem spitzen Gegenstand ohne Hohlraum könnten Blutproben in großer Zahl gewonnen und relativ risikofrei gelagert und transportiert werden.





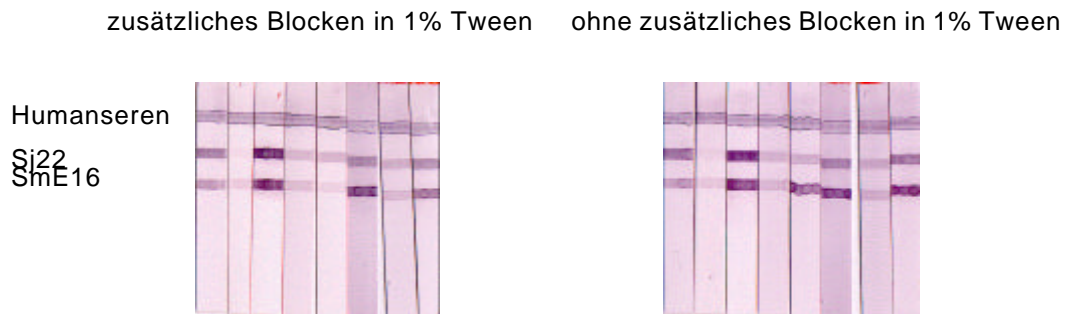
**Abb. 21: Durchführung des Line-Blots mit Blut statt Serum.**  
 Infektionsseren wurden mit Blut gemischt und auf Filterpapier eingetrocknet.  
 Mit dem rückeluierten Blut-Serum-Gemisch wurde ein Line-Blot  
 standardmäßig durchgeführt.



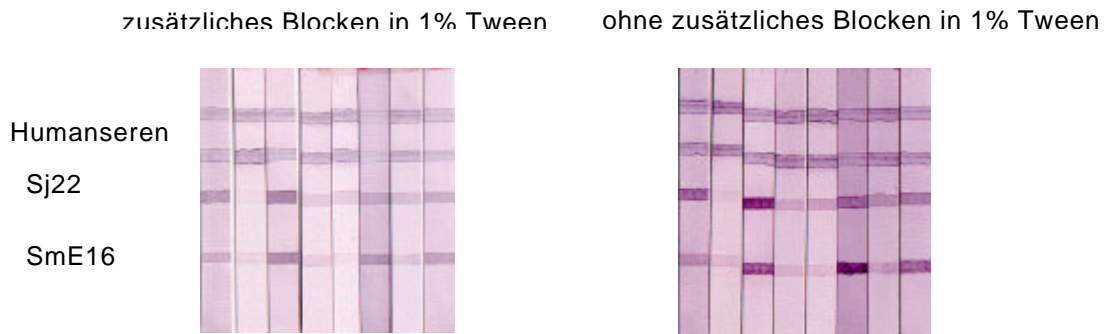
### **D-3-6 Haltbarkeit der präparierten Nitrocellulosestreifen**

Für die Durchführung der Diagnose unter Feldbedingungen ist es nötig, daß auf vorgefertigte Teststreifen zurückgegriffen werden kann. Deshalb wurde ihre Haltbarkeit unter verschiedenen Lagerbedingungen untersucht. Dabei wurde die Signalstärke als Bewertungskriterium herangezogen. Die Lagerzeit, der Einfluß der Temperatur und die Art der Lagerung wurden als Parameter untersucht. Vorgefertigte Teststreifen wurden unverpackt im trockenen Zustand für verschiedene Zeiten bei Raumtemperatur und bei 37°C gelagert und anschließend im Line-Blot getestet. Als Vergleichswert für die Signalstärke wurde jeweils ein Blot mit frisch angefertigten Teststreifen herangezogen (s. **Abb. 22 und 23**).

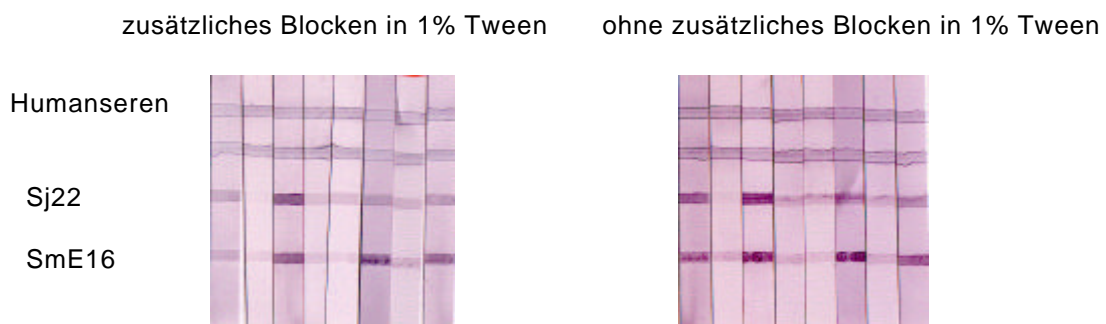
Es stellte sich heraus, daß Sj22 und SmE16 ihre Antigenität bei längerer Lagerung auch bei höheren Temperaturen nicht in signifikantem Maß verlieren. Parallel wurde untersucht, ob die gelagerten vorgefertigten Teststreifen vor der Inkubation mit dem Patientenserum zusätzlich nochmals in 1% Tween abgesättigt werden sollten oder nicht. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine zusätzliche Absättigung nicht notwendig ist.



Versuch1: Line-Blot nach 5 Tagen Lagerung der beschichteten Teststreifen bei RT

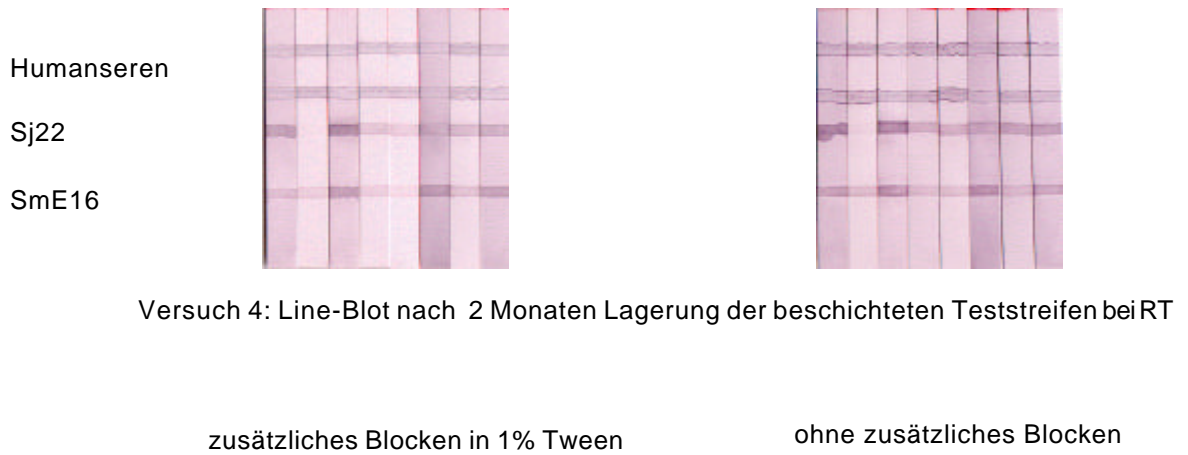
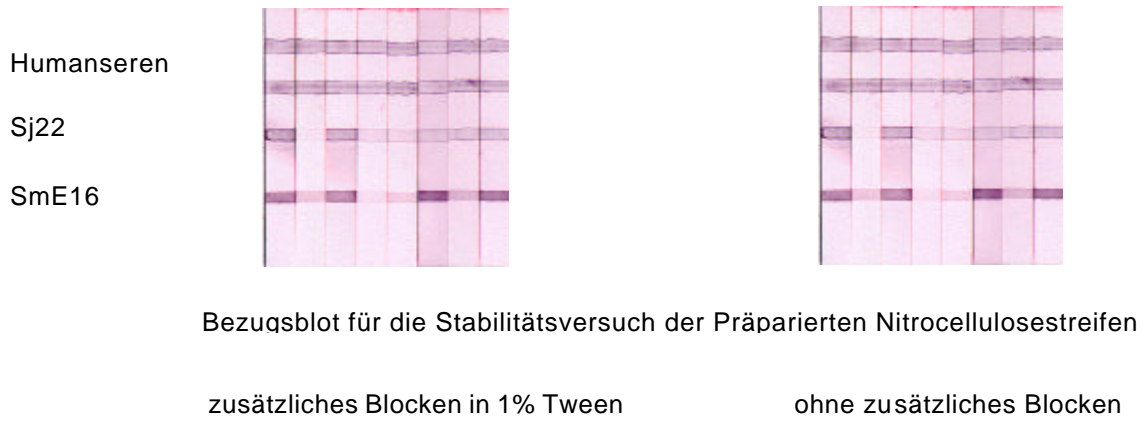


Versuch2: Line-Blot nach 2 Wochen Lagerung der beschichteten Teststreifen bei RT



Versuch3: Line-Blot nach 2 Wochen Lagerung der beschichteten Teststreifen bei 37°C

**Abb. 22: Einfluß der Lagerzeit, der Temperatur und die Art der Lagerung auf die Stabilität der vorgefertigte Teststreifen.** Line-Blot nach 5 Tagen und 2 Wochen Lagerung der Teststreifen bei Raumtemperatur und bei 37°C.



**Abb. 23: Einfluß der Lagerzeit, der Temperatur und die Art der Lagerung auf die Stabilität der vorgefertigte Teststreifen.** Line-Blot nach 2 Monaten Lagerung der Teststreifen bei Raumtemperatur und bei 37°C.

#### **D-4 Die Entwicklung eines schnelleren Diagnoseverfahrens ("Dip-Stick")**

Obwohl das im Rahmen dieser Arbeit optimierte Line-Blot-Verfahren hervorragend geeignet ist, große Zahlen von Patientenseren bzw. Blutproben mit relativ wenig Aufwand zu testen, hat es einen Nachteil, der seinen Einsatz unter Feldbedingungen einschränkt: Die Durchführung des Tests dauert ca. drei Stunden. Dies mag bei umfangreichen epidemiologischen Studien nicht stören, da viele Proben parallel getestet werden können und der größere Aufwand mit Sicherheit das Einsammeln der Blutproben ist, selbst wenn dabei nur ein wenig Blut aus einer Fingerkuppe auf Filterpapier getropft wird. In vielen Fällen muß das Resultat in kurzer Zeit und in Anwesenheit des Patienten erhältlich sein. In Ägypten, wo heute noch ca. 50 % der Bevölkerung unter Bilharziose leiden, wird der Nachweis der Erkrankung vorzugsweise mit Teststäbchen für den Nachweis von Protein im Urin, sog. "Dip-Sticks", geführt, auch wenn diese Methode nur eine geringe Spezifität besitzt. Die Methode funktioniert nur deshalb mit etwa 80 % Spezifität, weil in Ägypten die häufigste Art der Bilharziose durch den Parasiten *S. haematobium* verursacht wird, der hauptsächlich Schäden im Urogenitaltrakt anrichtet.

Das Ergebnis eines Dip-Stick-Tests ist innerhalb weniger Minuten ablesbar und ist durch wenig geschultes Personal durchzuführen. Es wurden daher überlegt, ob nicht einige Schritte des zeitaufwendigen Line-Blots durch schnellere und noch einfachere Methoden ersetzt werden könnten.

Prinzipiell konnte der Immunblot an drei Stellen verkürzt werden:

1. Die Konzentration der Antigene auf dem Teststreifen konnte erhöht werden
2. die Konzentration der Infektionsseren im Test konnte erhöht werden
3. Die indirekte Farbreaktion konnte durch eine direkte ersetzt werden

Viele Vorversuche im Labor hatten ergeben, daß die im Line-Blot standardmäßig eingesetzten Verdünnungen von Antigen und Patientenseren nicht einfach erhöht werden konnten, weil dies unweigerlich zu falsch positiven Resultaten führte. Dies hängt mit der sehr empfindlichen Phosphatase-abhängigen Färbemethode zusammen. Wenn aber eine weniger empfindliche direkte, dafür jedoch schnellere

Färbemethode verwendet würde, könnten sicher auch höhere Konzentrationen von Antigen und Infektionsserum eingesetzt werden.

#### **D-4-1 Nachweis der Bindung antigenspezifischer Antikörper durch mit kolloidalem Gold konjugierten ProteinA**

Die Konjugation mit kolloidalem Gold gilt schon seit vielen Jahren als empfindliche direkte Färbemethode von Proteinen. Kolloidales Gold ist kommerziell erhältlich und wird vor allem in der Elektronenmikroskopie zur Markierung spezifischer Antikörper benutzt. In jüngerer Zeit wird kolloidales Gold auch zur Anfärbung von Proteinen nach zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung aus komplexen Gemischen herangezogen (CHEVALLET et al, 1997).

Eine direkte Anfärbung von humanen Antikörpern im Serum erschien nicht sinnvoll, da mit kolloidalem Gold alle Proteine gefärbt werden und die Anlagerung der Proteine an kolloidales Gold technisch und zeitlich aufwendig ist. Statt dessen sollte ProteinA aus *Staphylococcus aureus* mit Goldkolloid gefärbt und mit den spezifisch an das Antigen gebundenen Immunglobulinen zur Reaktion gebracht werden. ProteinA hat eine hohe Affinität zu Immunglobulinen und in ausreichend hoher Konzentration findet die Bindung innerhalb sehr kurzer Zeit statt.

Für die Anfärbung von ProteinA mit kolloidalem Gold wurde eine Modifikation der Methode von HORISBERGER und CLERC (1985) angewendet. Dabei wird aus 0.1-0.2 % Tertachlor-Goldsäure ( $\text{HAuCl}_4$ ) unter reduzierenden Bedingungen zunächst eine Goldkolloidlösung hergestellt und mit 0.05 % Polyvinylalkohol stabilisiert. Die Größe der Gold-Partikel im Kolloid hängt von der Ausgangskonzentration des  $\text{HAuCl}_4$  ab und reicht von 5 nm bis ca. 200 nm Durchmesser. Zum Anfärben von Protein ist eine Partikelgröße von 10 bis 50 nm Durchmesser geeignet.

Zur Goldmarkierung wurde ProteinA in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  bei leicht saurem pH (pH5-6) zu dem Goldkolloid gegeben und nach 5 Minuten nochmals 0.05 % Polyvinylalkohol zur Stabilisierung des Kolloids zugesetzt. Diese Mischung wurde 40 Minuten lang in der Ultrazentrifuge (Beckman SW40 Ausschwenkrotor bei 20.000 rpm) zentrifugiert, der Überstand mit dem nicht gebundenen ProteinA

vorsichtig abgehoben und das aus dem ProteinA-Goldkolloid bestehende Sediment vorsichtig in einem neutralen Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl und 0.05 % Polyvinylalkohol) resuspendiert.

Das auf diese Weise hergestellte goldmarkierte ProteinA besaß für kurze Zeit eine hervorragende Fähigkeit, Antigen-Antikörperkomplexe sichtbar zu machen. Es gelang, mit Antigen beschichtete und anschließend mit Patientenserum inkubierte Nitrocellulose-Teststreifen mit diesem ProteinA-Goldkonjugat spezifisch anzufärben. Leider ging diese Fähigkeit des frisch präparierten ProteinA-Goldkomplexes bereits nach wenigen Stunden wieder verloren, vermutlich weil der zur Stabilisierung der Goldkolloid-Partikel zugegebene Polyvinylalkohol das ProteinA von seiner Bindungsstelle am Gold verdrängte. Versuche, Polyvinylalkohol durch andere stabilisierende Makromoleküle (BSA, PEG) zu ersetzen führten zu keinen besseren Ergebnissen. Eine Reduzierung der Menge an Stabilisator führte zur Aggregation d.h. dem Ausfallen der Goldpartikel. Ein weiterer Nachteil der Goldkolloid-Färbung von ProteinA bestand in der durch die Ultrazentrifugation bedingten limitierenden Menge an Protein-Gold-Komplexen. Daher wurde trotz der zunächst vielversprechend aussehenden Anfangserfolge dieser Ansatz wieder fallen gelassen und nach einer Alternative Ausschau gehalten.

#### **D-4-2 Herstellung von mit kolloidalem Kohlenstoff markierten ProteinA**

Alternativ zu Goldfärbung existiert ebenfalls seit langer Zeit die Methode der Tuschefärbung für auf Membranen übertragene Proteine. Die Anfärbung mit Tusche ist zwar nicht so sensitiv wie die Anfärbung mit kolloidalem Gold, beruht aber auf demselben Prinzip der Anlagerung von kolloidalen Partikeln an geladene Aminosäuren von Proteinen (die Anlagerung der Kolloide beruht auf elektrostatischen Kräften). Tusche ist ein Kolloid aus fein dispersem Kohlenstoff in einer wässrigen Lösung. Das Kohlenstoff-Kolloid wird ähnlich dem Goldkolloid durch die Zugabe von Stabilisatoren in Lösung gehalten. Die bei der Tuscheherstellung verwendete Stabilisatoren sind allerdings wenig geeignet für den Einsatz in biochemischen Reaktionen. Typische Stabilisatoren sind Säuren, Harnstoff und synthetische Polymere, die nach Eintrocknen der Tusche eine lackartige Eigenschaft

verleihen, d.h. sie vor dem Wiederauflösen in Wasser schützen. Daher kann Tusche nicht direkt zum Markieren nativer Proteine eingesetzt werden.

Für die Herstellung eines zum Anfärben von Proteine geeigneten Kohlenstoff-Kolloids waren auch unter Zuhilfenahme aller erreichbarer elektronischer Informationsquellen keine Zitate in der wissenschaftlichen Literatur zu finden. Daher mußte rein empirisch vorgegangen werden.

Zunächst mußte eine geeignete Qualität von Kohlenstoff aufgetrieben werden. Die Firma Degussa stellt über 30 verschiedene Arten von Pigmentrußen her, die in der Lack- und Reifenindustrie in großem Umfang verarbeitet werden. Es wurden uns kostenlose Proben von drei nach unterschiedlichen Herstellungsverfahren produzierten Ruß-Typen zur Verfügung gestellt: Farbruß FW 285 (mittlere Teilchengröße 11 nm), Printex U (mittlere Teilchengröße 25 nm) und Spezial Schwarz 100 (mittlere Teilchengröße 50 nm). Erste Versuche, diese Ruße in Lösung zu bringen, waren erfolglos. Nach kräftigem Schütteln von 1 % (w/v) Suspensionen setzte sich der Ruß selbst in Anwesenheit von 1 % Detergens (SDS oder Tween 20) nach wenigen Minuten wieder ab. Auch durch Zugabe von 1 % Protein (BSA oder Casein) und höheren Kochsalzkonzentrationen konnte keine kolloid-ähnliche Suspension hergestellt werden, die nicht sehr schnell wieder ausgeflockt wäre.

Schließlich gelang es, durch 15 Minuten langes Beschallen von 10 ml einer 1 % Suspension eines der Rußtypen, Spezial Schwarz 100, in Anwesenheit von 1% BSA und 0.1 % Tween 20 mit einem Ultraschall-Desintegrator bei einer Leistung von 200 Watt/cm<sup>2</sup> eine Ruß-Suspension herzustellen, die nicht sofort wieder koagulierte. Als Test wurde das Auftropfen der Suspension auf Filterpapier entwickelt: bei gewöhnlichen Suspensionen blieb der Ruß an der Auftragstelle liegen, wobei das Lösungsmittel einen größeren Fleck bildete, bei kolloidal suspendierten Lösungen verlief der schwarze Tropfen dagegen gleichmäßig.

Nachdem eine Methode zur kolloid-ähnlichen Suspendierung des Rußtyps Spezial-Schwarz 100 und ein einfacher Test zur Bestimmung der Löslichkeit des Kohlenstoffs gefunden worden war, konnte die Optimierung der Kolloid-Herstellung in Angriff genommen werden.

Dazu wurde ein Test entwickelt um zu überprüfen, ob Protein an das Kohlenstoff-Kolloid gebunden werden kann und auch stabil gebunden bleibt. Ein von der Firma Sigma kommerziell erhältliches gegen BSA gerichtetes Kaninchen-serum wurde auf eine Nitrocellulosemembran getüpfelt und nach Absättigung der Membran mit 1 % Tween 20 mit dem 1:10 verdünnten BSA-Kohlenstoff-Kolloid inkubiert. Als Kontrolle wurde ein kleiner Tropfen einer BSA-Lösung mit ähnlicher Konzentration (10 mg/ml) ebenfalls auf die Membran aufgetragen. Tatsächlich ergab sich nach 5 Minuten Inkubation und anschließendem Abwaschen des überschüssigen Kolloids eine Schwarzfärbung des anti-BSA-Serums, allerdings färbte sich der zur Kontrolle aufgetragene BSA-Fleck ebenso. Die Färbung war demnach nicht spezifisch sondern beruhte vermutlich auf der allgemeinen Affinität von Kohlenstoff zu Protein.

Die unspezifische Anfärbung der Proteinflecken auf der Membran konnte entweder durch freies Kohlenstoff-Kolloid oder durch nur unvollständig mit BSA konjugiertes Kohlenstoff-Kolloid bedingt sein. Um dies zu untersuchen, wurde die Proteinkonzentration bei der Ausbildung des BSA-Kohlenstoff-Kolloid-Komplexes variiert. Die Erhöhung der BSA-Konzentration führte zu einem Verschwinden der falsch positiven Reaktion mit dem BSA-Fleck auf der Membran, gleichzeitig verschwand aber auch die positive Reaktion mit dem anti-BSA-Serum. Ein besseres Ergebnis wurde erhalten, wenn zu der für die Farbreaktion eingesetzten 1:10-Verdünnung des Kohlenstoff-Konjugates, das nach wie vor durch Beschallung einer 1 % Kohlenstoff-Suspension in Anwesenheit von 10 mg BSA/ml erfolgte, nachträglich Casein mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml zugesetzt wurde. Unter diesen Bedingungen war ein deutlicher Unterschied zwischen der positiven Reaktion am anti-BSA-Serum und der negativen Kontrolle am BSA-Fleck zu erkennen. Dieses Ergebnis ließe sich dadurch erklären, daß das Casein die unspezifisch mit Protein reagierenden freien Stellen am Kohlenstoff-Kolloid abdeckt, zugleich aber nicht mit der Bindung am anti-BSA-Serum kompetiert. Gleichzeitig wies dieses Ergebnis darauf hin, daß BSA stabil an das Kohlenstoff-Kolloid gekoppelt war.

Nachdem die nachträgliche Zugabe von Casein zur Vermeidung falsch positiver Reaktionen als wichtiger Fortschritt erkannt worden war, wurde versucht, das optimale Verhältnis von BSA zu Kohlenstoffkolloid zu ermitteln. BSA war bisher zur Stabilisierung des Kohlenstoff-Kolloids in relativ hoher Konzentration (1 % =10mg/ml)



eingesetzt worden. Dies konnte rechnerisch nicht zu einer hohen spezifischen Anfärbung des BSA durch das Kohlenstoff-Kolloid führen, da es in großem Überschuss vorhanden war. Daher wurde versucht, die BSA-Konzentration deutlich zu erniedrigen, ohne die Stabilität des Kolloids zu gefährden. Die Reduzierung der BSA-Konzentration auf 100 µg/ml bei der Kolloidbildung mit einer 0.1% Spezial Schwarz 100-Suspension führte zu einer deutlichen Steigerung der Anfärbung des anti-BSA-Serums auf der Nitrocellulose. Die niedrigere BSA-Konzentration führte dabei nicht, wie befürchtet, zum Ausfallen des Kolloids. Vor dem Ansetzen der Färbereaktion war wiederum 2 mg/ml Casein zur Vermeidung unspezifischer Anlagerung von freien Kohlenstoff-Kolloiden an Protein zugesetzt worden.

#### **D-4-3 Etablierung eines effizienten ProteinA-Kohlenstoff-Kolloid-Komplexes**

Nach dem Nachweis eines effizienten BSA-Kohlenstoff-Komplexes unter diesen niedrigen Proteinkonzentrationen wurde versucht, einen entsprechenden Kohlenstoff-Kolloid-Komplex mit ProteinA auszubilden. Um das wertvolle ProteinA durch die Ultraschallbehandlung nicht zu zerstören, wurde versucht, eine 1% Spezial-Schwarz 100-Suspension direkt, d.h. ohne Zugabe von stabilisierendem Protein mit dem Ultraschall-Desintegrator in ein Kolloid zu überführen – was überraschenderweise gelang. Der zur Suspension der Rußpartikel verwendete Puffer enthielt auch kein Detergens, sondern bestand lediglich aus 10 mM Tris/HCl pH7.5. Offensichtlich ist zur Herstellung einer kolloidalen Kohlenstofflösung gar kein Stabilisator nötig wie bei der Herstellung von Goldkolloiden, sondern es bedarf nur der enormen Scherkräfte, die bei der Beschallung zur Anwendung kommen.

Zu 5 ml des auf diese Weise hergestellten nicht stabilisierten Kohlenstoff-Kolloids wurden 100 µg ProteinA zugesetzt und ca. 2 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen lassen, wobei sich kein sichtbares Sediment ausbildete. Dann wurde die ProteinA-Kohlenstoff-Kolloid-Lösung nach Zusatz von 2 mg/ml (Endkonzentration) Casein für eine Testreaktion eingesetzt. Für den Test war ein Streifen Nitrocellulose an einer Stelle mit einer Mischung der drei diagnostischen Schistosoma-Antigene Sj22, Sm32 und SmE16 in unverdünnter Form (ca. 1 mg Protein/ml) beschichtet und nach Blockierung der freien Bindungsstellen der Membran mit 1 % Tween 20 mit einem stark positiven Patientenserum inkubiert worden.

Als positive Kontrolle war an einer andern Stelle des Teststreifens ein Tropfen unverdünnten Serums direkt aufgetragen worden. Zur großen Enttäuschung war so gut wie keine Farbreaktion zu sehen, nicht einmal bei dem direkt aufgetragenen Serum, das große Mengen an IgG enthalten mußte.

Dieses negative Resultat konnte dadurch erklärt werden, daß nur ein geringer Teil des ProteinA an das Kohlenstoff-Kolloid gebunden hatte und ein großer Teil ungebunden vorlag und mit dem konjugierten ProteinA um die IgG-Bindungsstellen kompetierte. Daraufhin wurde versucht, das ungebundene ProteinA durch einen Waschschrift zu entfernen. Dies ließ sich relativ leicht durchführen, weil das Kohlenstoff-Kolloid sich im Gegensatz zum Gold-Kolloid relativ leicht abzentrifugieren ließ. Es sedimentierte nach 10 min in der Eppendorf-Tischzentrifuge (bei 13.000 x g) quantitativ und ließ sich nach Abheben des Überstandes leicht wieder resuspendieren. Um den Effekt des Auswaschens von ungebundenem ProteinA zu testen, wurde ein neues Konjugat unter den selben Bedingungen wie oben beschrieben gebildet, nur wurde das ProteinA statt nur 2 Stunden dieses Mal über Nacht mit dem Kohlestoff-Kolloid inkubiert. Das Konjugat wurde durch Zentrifugation wie zuvor sedimentiert und in einer Lösung von 2 mg/ml Casein in 10 mM Tris/HCl pH 7.5 resuspendiert. Mit dieser Lösung wurde der Immuntest wie zuvor durchgeführt. Erstaunlicherweise reagierte dieses Mal der Antigen/Patientenserum-Komplex positiv, der Kontrollfleck mit dem direkt aufgetragenen Serum jedoch negativ.

Um zu testen, ob die negative Reaktion des Kontrollflecks möglicherweise dadurch bedingt war, daß das ProteinA sterisch nicht mit den mit der Nitrocellulosemembran verklebten Antikörpern reagieren konnte, wurde wie beim Antigen-Patientenserum-Komplex zuerst ein rekombinantes Maul-und-Klauenseuchevirus-Protein aufgetragen und nach Blockieren des Teststreifens mit Tween 20 mit einem passenden Kaninchenserum überschichtet. Nach kurzem Waschen wurde der Teststreifen mit dem neu präparierten ProteinA-Kohlenstoff-Konjugat inkubiert, und jetzt wurde tatsächlich an beiden Stellen eine deutlich positive Reaktion beobachtet.

Nachdem nun Bedingungen erreicht worden waren unter denen die Effizienz eines Dip-Stick erprobt werden konnte, wurde eine größere Zahl Teststreifen unter

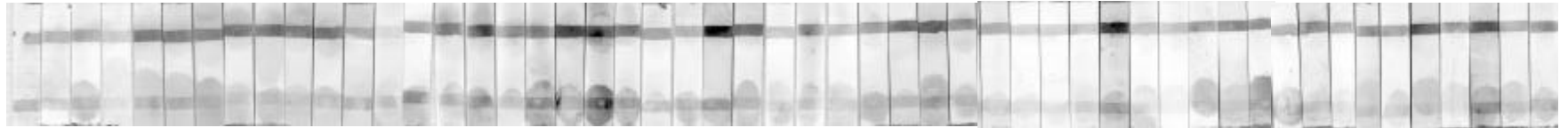
ähnlichen Bedingungen wie beim Line-Blot durch Auftragen der Antigene mit einem Tuschestift hergestellt. Die diagnostischen Antigene wurden wie oben beschrieben als Mischung aufgetragen, als Kontrollspur diente wieder das Maul-und-Klauenseuchevirusprotein. Nach Abblocken der Membran in 1 % Tween 20 wurde die Membran senkrecht zur Auftragsrichtung der Proteine in Streifen geschnitten und die untere Hälfte der noch feuchten Streifen mit jeweils 1  $\mu$ l Patientenserum und die obere Hälfte mit jeweils 1  $\mu$ l entsprechendem Kaninchenserum überschichtet. Nach 5 min wurden die Streifen kurz in einer Waschlösung (1 x PBS) geschwenkt und dann mit dem ProteinA-Kohlenstoff-Kolloid-Komplex inkubiert. Bei den meisten Streifen war nach 5 min deutlich die Kontrollspur zu erkennen und mehr oder weniger stark ausgeprägt auch eine Reaktion an der Antigenspur (**Abb. 24**). Teststreifen, die mit Kontrollseren inkubiert worden waren, blieben dagegen eindeutig negativ.

Das Ergebnis ist sicher noch provisorisch und die Methode muß technisch optimiert werden. Die Streifen müssen z.B. nach Auftrag des Patientenserums besser gewaschen oder zuvor effizienter abgeblockt werden, damit nicht, wie bei vielen Streifen zu erkennen, die Auftragsstelle des Patientenserums durchscheint. Anhand der teilweise sehr schwach gefärbten Kontrollstreifen zeigte sich auch, daß die Fähigkeit der ProteinA-Kohlenstoff-Kolloidlösung zur Anfärbung schnell erschöpft war. Dies könnte durch die Verwendung einer höheren Konzentration der Färbelösung oder durch eine Verbesserung der Bindung des ProteinA an das Kolloid erreicht werden. Die Arbeit mußte an dieser Stelle aus Zeitgründen leider abgebrochen werden. Das Ergebnis zeigt aber klar an, daß es prinzipiell möglich ist, einen schnellen „Dip.Stick“-Test für die Diagnose der Bilharziose zu entwickeln.

*S. mansoni* Infektionsseren

positive Kontrolle

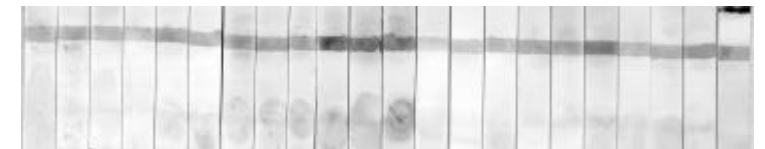
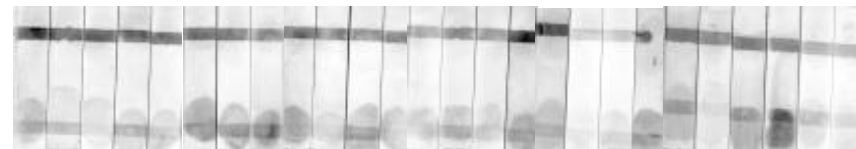
Antigen-Mix

*S. mansoni* Infektionsseren

## Kontrollseren

positive Kontrolle

Antigen-Mix



**Abb. 24: Immunologischer Nachweis der Biharziose mit Hilfe eines "Dip-Stick"** Die drei diagnostischen Antigene Sj22, Sm32 und SmE16 wurden als Mischung gemeinsam auf Nitrocellulose-Teststreifen aufgetragen, die entsprechende Stelle anschließend jeweils 5 min lang mit einem kleinen Tropfen Patientenserum (*S. mansoni*-infiziert) überschichtet und gebundene Antikörper durch 5 min Eintauchen in eine ProteinA-Kohlenstoff-Kolloid-Lösung sichtbar gemacht. Als Kontrollspur dient ein Immunkomplex aus einem rekombinanten MKS-Virus-Protein mit einem entsprechenden Kaninchen-Antiserum.

## **E- SCHLUSSBETRACHTUNG**

Da es gegen die Bilhaziose auf absehbare Zeit keinen Impfstoff geben wird, kann die Krankheit in den nächsten Jahren nur durch Medikamente bekämpft werden. Die Verwendung von Medikamenten hängt jedoch von einer ausreichend guten Möglichkeit zur Diagnose ab. Die hier beschriebene serologische Diagnose mittels rekombinanter Antigene ist wegen ihrer einfachen Durchführung und niedrigen Kosten ein wichtiger Meilenstein für Bekämpfung der Krankheit in der Zukunft.

Das wichtigste Ergebnis meiner Arbeit ist die Erkenntnis, daß das Antigen Sj22 in hervorragender Weise für die Diagnose der Schistosomiase eingesetzt werden kann, insbesondere für die Diagnose der asiatischen Form der Krankheit, für die es bisher noch kein ausreichend empfindliches Nachweisverfahren gibt. Zur Diagnose der Bilharziose steht mit dem Line-Blot mit rekombinanten Antigenen ein hervorragendes Verfahren zur Verfügung, das auf große Bevölkerungsgruppen angewendet werden kann. Teststreifen können in einem großen Umfang mit geringen Mitteln angefertigt und auch lange gelagert werden. Die Möglichkeit, Vollblut anstatt Serum zu verwenden, erlaubt das Sammeln von Blut in geringsten Mengen direkt auf Filterpapier. Somit ist das Infektionsrisiko sowohl für das medizinische Personal als auch für die betroffene Bevölkerung im Vergleich mit der üblichen Serumgewinnung beträchtlich herabgesetzt.

Allerdings ist die Line-Blot-Methode für den Feldeinsatz wegen der Langwierigkeit ihrer Durchführung nicht immer geeignet. Durch die Weiterentwicklung des in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Dip-Sticks mit Kohlenstoff-markiertem Protein A könnte diese wichtige Lücke in der Diagnose der Bilharziose geschlossen werden.

## F- LITERATUR

BACTOR, F.N., STEK, M.J., PETER, J.P. & KAMAL, R. (1987). Simplification and standardization of dot-ELISA for human schistosomiasis mansoni. *J. Parasit.* **73**: 589-592

BATTEIGER, B., NEWHALL, W.J & JONES, R.B. (1982). The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. of Immunol. Meth.* **55**: 297-307

BUJARD, H., GENTZ, R., LANZER, M., STÜBER, D., MÜLLER, M., IBRAHIMI, I., HAEUPTLE, M.-T., DOBBERSTEIN, B. (1987). A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods in Enzymology* **155**: 416-433

BERGQUIST, N.R. (1990). Immundiagnosis of Schistosomiasis. In: Immundiagnostic Approaches in Schistosomiasis (ed. BERGQUIST, N. R.). John Wiley & Sons, Chichester, 2-8

BERGQUIST, N.R. (1995). Controlling Schistosomiasis by vaccination: A realistic option?. *Parasit. Today* **11**: 191-194

BUTTERWORTH, A.E., BENSTED-SMITH, R., CAPRON, A., CAPRON, M., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., GRZYCH, J.M., KARIUKI, H.C., KHALIFE, J., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., SIONGOK, T.K. and STURROCK, R.F. (1987). Immunity in human schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology* **94**: 281-300

CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., OUMA, J.H. & BUTTERWORTH, A.E (1987). Immunity to schistosomes : progress towards vaccine. *Science* **238**: 1065

CORREA-OLIVEIRA, R., PEARCE, E.J., OLIVEIRA, G.C., GOLGNER, D.B., KATZ, N., BAHIA, L.G., CARVALHO, O.S., GAZZINELLI, G., SHER, A. (1989). The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**: 798-804

DEELDER, A.M., DE JONGE, N., BOERMAN, O.C., Y.E., FILLIE, Y.E., HILBERATH, G.W., ROTMANS, J.P., GERRITSE, M. J. & SCHUT, D.W.O.L. (1989). Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Im. J. Trop. Med. Hyg.* **40**: 268-272

DE VALS, S.J. & GRYSEELS, B. (1992). Underestimation of *Schistosoma mansoni* Prevalences. *Parasit. Today*. **8**: 274-27

DOENHOFF, M.J. et al., (1990). Seroepidemiology of *Schistosomiasis mansoni* in Kenya using crude and Purified *Schistosoma mansoni* Egg Antigens: Result of a Field Trial. In: Immunodiagnostic Approaches in Schistosomiasis (ed. BERGQUIST, N.R.). John Wiley & Sons, Chichester, 50-57

DOENHOFF, M.J., BUTTERWORTH, A.E., HAYES, R.J., STURROCK, R.F., OUMA, J.H., KOECH, D. & PRENTICE, M. (1993). Seroepidemiology and serodiagnosis of Schistosomiasis in Kenya using crude and Purified egg Antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 42-48

DUNNE D.W., BUTTERWORTH, A.E., FULFORD, A.J.C., KARIUKI, H.C., LANGLEY, J.G, OUMA, J.H., CAPRON, A., PIERCE, R.J. & STURROCK, R.F. (1992). Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.* **22**: 1483

FELDMEIERS, H. (1993). Diagnosis. In: Human Schistosomiasis (ed. JORDAN, P., WEBBE, G., & STURROCK, R.F.). CAB International. 87-137

FENWICK, A. (1987). The Role of Molluscicides in Schistosomiasis Control. *Parasit. Today*. **3**: 70-73

GOTTESMANN, S., HALPERN, E., TRISLER, P. (1981). Role of *sulA* and *sulB* in Filamentation by Lon Mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **148**: 265-275

GRYSEELS, B., NKULIKYINKA, L. & ENGELS, D. (1991). Repeated community-based chemotherapy for the control of *Schistosoma mansoni*: effect to screening and selective treatment on prevalences and intensities of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**: 509

GUNDERSEN, S.G., HAAGENSEN, I., JONASSEN, T.O., FIGENSCHAU, K.J., DE JONGE, N. & DEELDER, A.M. (1992). Quantitative detection of schistosomal circulating anodic antigen by magnetic bead antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay (MBAC-EIA) before and after mass chemotherapy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**: 175-178

HAKANGARD, C., DEELDER, A.M., GABONE, R. M. NILSSON, L. A. and OUCHTERLONY, O. (1996) A comparative study on specific antibodies and circulating antigen (CAA) in serum and parasitological findings for diagnosis of *schistosomiasis mansoni* in an endemic area in Tanzania. *Acta Tropica* **61**: 213-222

ISMAIL, M., METWALLY, A., FARGHALY, A., BRUCE, J., TAO, L.F and BENNETT, J.L. (1996). Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villages that tolerate high doses of praziquantel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**: 214-218

JANITSCHKE, K., REINHOLD, A. & BODE, L. (1987). Nitrocellulose dot-ELISA for serodiagnosis of schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 956-958

JEFFS, S.A., HAGAN, P., ALLEN, R., CORREA-OLIVEIRA, R., SMITHERS, S.R., SIMPSON, A.J. (1991). Molecular cloning and characterisation of the 22-kilodalton adult *Schistosoma mansoni* antigen recognised by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**: 159-167

JORDAN, P. & WEBBE, G. (1993). Epidemiology. In: Human Schistosomiasis (ed. JORDAN, P., WEBBE & STURROCK, R.F.). CAB International. 87-137

KATZ, N. (1972). A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* **14**: 397-400

KIEßLING-PARR, S. (1994). Versuch der nativen Darstellung des diagnostischen Antigens Hämoglobinase des Parasiten *Schistosoma mansoni* mit rekombinanten Mitteln. Diplomarbeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

KLINKERT, M.Q., RUPPEL, A. and BECK, E. (1987). Cloning of diagnostic 31/32 kilodalton antigens of *Schistosomiasis mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **25**: 247-255

KLINKERT, M.Q., FELLEISEN, R., LINK, G., RUPPEL, A., BECK, E. (1989). Primary structures Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identifications as proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**: 113-122

KLINKERT, M.Q., BOMMERT, K., MOSER, D., FELLEISEN, R., LINK, G., DOUMBO, O., BECK, E. (1991). Immunological analysis of cloned *Schistosoma mansoni* antigens Sm31 and Sm32 with sera of schistosomiasis patients. *Trop. Med. Parasitol.* **42**: 319-324

KLINKERT, M.Q., BOMMERT, K., FELLEISEN, R., MOSER, D., LINK, G., DOUMBO, O. and BECK, E. (1992). Immundiagnostic Approaches in Schistosomiasis (ed. BERGQUIST, N.R.). John Wiley & Sons, Chichester.

KOLBERG, R. (1994). Finding "sustainable" ways to prevent parasitic diseases. *Science* **264**: 1859-1861



- KÜPPER, H., DELAMARTER, J., OTTO, B., SCHALLER, H. (1982). Expression of major foot and mouth disease antigen in *E. coli*. Proceedings of the IVth Int. Symp. On Genetics of Industrial Microorganisms, 222-226
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature **227**: 680-685
- LANAR, D., PEARCE, E.J., JAMES, S.L., SHER, A. (1986). Identification of paramyosin as the schistosoma antigen recognized by intradermally vaccinated mice. Science **234**: 593-596
- LIESE, B. (1987). The organisation of schistosomiasis control programmes. Parasit. Today **2**: 331-345
- LIPPS, G., FÜLLKRUG, R. and BECK, E. (1996). Cathepsin B of *Schistosoma mansoni*: purification and activation of the recombinant proenzyme secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **271**: 1717-1725
- MERCKELBACH, A., ESCHLBECK, A., RUPPEL, A. (1994). unveröffentlichte Daten
- MOSER, D., DOEHOF, M. J., and KLINKERT, M.Q., (1992 ). A stage-specific calcium-binding protein expressed in eggs of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. **51**: 229-238
- MOSER, D. (1988). Klonierung und Charakterisierung von *Schistosoma mansoni*-Antigenen für die Immundiagnose. Diplomarbeit, Universität Heidelberg
- QIAN, Z.L., & DEELDER, A.M. (1993). Dot immunoassay with biotinylated antigen for determination of antibodies against the circulating cathodic antigen (CCA) in schistosomiasis japonicum. Im. J. Trop. Med. Hyg. **49**: 777-782
- REMAUT, E., STANSSENS, P., FIERS, W. (1981). Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the P1 promotor of coliphage Lambda. Gene **15**: 81-93
- REMAUT, E., TSAO, H., FIERS, W. (1983). Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and temperature-regulated runaway replication. Gene **22**: 103-113
- RINNERT, T, (1996). Immundiagnose der Bilharziose mit rekombinante Antigenen: Optimierung der Nachweisempfindlichkeit im Line-Blot. Diplomarbeit, Universität Gießen
- ROLLINSON, D. & SIMPSON, A.J.G. (1987). The biology of schistosomes. From genes to latrines. Academic Press

ROSSI, C.L., TSANG, V.C.W. & PILCHER, J.B. (1991). Rapid, low-technology field- and laboratory-applicable enzyme-linked immunosorbent assays for immundiagnosis of *Schistosoma mansoni*. J. Clin. Microbio. **29**: 1836-1841

ROTH, B. (1993). Rekombinante Darstellung des Calcium-bindenden Proteins SmE16 von *Schistosoma mansoni* in nativer Konformation und Untersuchung seiner Eignung für die Immundiagnose der Schistosomiasis. Diplomarbeit, Universität Gießen.

RUPPEL, A., ROTHER, U., & DIESFELD, H.J. (1985a). Immunoblot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. Clin. exp. Immunol. **62**: 499-506

RUPPEL, A., ROTHER, U., VONGERICHTEN, H., LUCIUS, R. & DIESFELD, H.J. (1985b). *Schistosoma mansoni*: Immunoblot analysis of Adult Worm Proteins. Experimental Parasitology. **60**: 195-206

RUPPEL, A., SHI, Y.E, WIE, D.X., & DIESFELD, H.J. (1987a). Sera of *Schistosoma japonicum*-infected patients cross-react with diagnostic 31/32 kD proteins of *S. mansoni*. Clin. exp. Immunol. **69**: 291-298

SABER, M.A., ABDEL-HEMID, H., ROMEIH, M., AHMED, H. and HARISON, R. (1994): unveröffentlichte Daten

SAMBROOK, J., FRISCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press

SANGER, F., MICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. **74**: 5463-5467

SHER, A., JAMES, S.L., CORREA-OLIVEIRA, R., HIENY, S., PEARCE, E.J. (1989). Schistosome vaccines: current progress and future prospects. In: Vaccines and Vaccination Strategies, McLaren, D.J. (Editor). Symposia of the British Society for Parasitology, no. 26. Parasitology **97**

STELMA, F.F., TALLA, I., SOW, S., KONGS, A., NIANG, M., POLMAN, K., DEELDER, A.M., and GRYSEELS, B. (1995). Efficacy and side effects of praziquantel in an endemic focus of *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **53**: 167-170

SMITHERS, S.R. (1987) Vaccination against schistosomes and other systemic helminths. Int J Parasitol. **17**:31-42

STREBEL, K., BECK, E., STROHMAIER, K., SCHALLER, H. (1985). Characterization of Foot- and Mouth disease Virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.* **57**: 983-991

STÜBER, D., MATILE, H. & GAROTTA, G. (1990). System for high level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis. in: *Immunol. Methods*, ed.: LEFKOVITS & PERRIS. Academic Press

THOMAS, H. (1981). Bilharziose, eine Seuche und ihre Bekämpfung. *Spektrum der Wissenschaft.* **6**: 26-36

TRAORÉ, M. (1994). A study of the epidemiology of schistosomiasis. Dissertation University of London.

VAN ETTEN, L., FOLMAN, C.C., EGGELTE, T.A., KREMSNER, P.G. & DEELDER, A.M. (1994). Rapid Diagnosis of Schistosomiasis by Antigen Detection in Urine with a Reagent Strip. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2404-2406

WEISS, N. & JUNGHANSS, T. (1990). Serological Techniques for Diagnosing Schistosomiasis in the individual. In: *Immunodiagnostic Approaches in Schistosomiasis* (ed. BERGQUIST, N. R.). John Wiley & Sons, Chichester, 18-27

WHO (1996). The control of schistosomiasis. Report of a WHO expert committee. Fact Sheet Nr. 115.

YANG, W., WAINE, G.J., SCULLEY, D.G., LIU, X., McMANUS, D.P. (1992). Cloning and partial nucleotide sequence of *Schistosoma japonicum* paramyosin: a potential vaccine candidate against schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.* **22** : 1187-1191

YOUNG, R.A., DAVIS, R.W. (1983a). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1194-1199

YOUNG, R.A., DAVIS, R.W. (1983b). Yeast RNA Polymerase II Genes: Isolation with antibody probes. *Science* **222**: 778-782

**G – ANHANG**

**Daten der afrikanische Infektionsseren:**

***S. mansoni* Infektionsseren**

Nummer	Angaben zur Person		
	Serum	Geschlecht	Alter
305	m	12	40
306	m	13	2800
307	m	13	1200
308	f	14	60
309	m	12	9880
310	f	12	720
311	f	14	580
312	m	14	1600
314	m	12	80
318	m	13	1800
320	m	13	440
322	f	16	1600
325	m	14	680
402	m	11	400
405	m	11	1160
406	m	14	60
407	f	12	520
409	m	12	3200
415	m	11	760
416	m	12	1000
418	m	11	280
420	f	12	2000
421	f	12	700
423	m	13	560
425	m	12	1240
428	m	13	920
429	m	11	2540
431	m	13	520
435	f	11	200
436	m	11	300
437	m	11	800
438	m	11	12000
442	f	14	800
445	m	14	1480
449	m	13	400

**Daten der afrikanische Infektionsseren:**

***S. mansoni* Infektionsseren**

Nummer	Angaben zur Person		
	Serum	Geschlecht	Alter
450	m	14	320
451	m	12	1640
452	m	11	120
502	f	12	7300
511	f	11	120
516	f	11	1800
520	f	11	1600
527	m	11	320
530	f	12	120
532	m	11	200
534	m	11	1200
535	m	11	120
536	f	12	520
538	m	11	1480
539	f	11	3100
540	m	11	1040
543	m	11	320
544	m	12	1480
546	m	11	960
547	f	12	960
548	m	11	240
552	m	11	2400
553	m	11	680
557	m	11	80
560	f	11	400
571	f	11	960
573	f	11	800
576	m	11	1280
578	m	12	40
579	m	13	2840
582	f	13	800
583	m	12	40
615	f	11	320
633	f	11	80
647	f	11	240

**Daten der afrikanische Infektionsseren:**

***S. haematobium* Infektionsseren**

Nummer Serum	Angaben zur Person		
	Geschlecht	Alter	<i>S. haematobium</i> Eier / 10 ml Urin
A69	m	13	2
A80	f	13	16
A90	m	12	10
A98	m	13	86
A96	m	13	1
A88	m	12	1
A56	m	13	21
A75	m	14	2
59	m	13	35
A64	m	13	17
A71	m	12	3
A52	m	13	44
A109	m	14	2
A62	m	14	4
A104	f	14	1
A81	f	13	10
A103	f	14	1
A119	m	14	1
A120	m	14	12
A121	m	13	9
A117	m	13	2
A118	m	14	2
A50	m	12	2
A49	m	13	1
A47	m	13	4
A39	m	17	1
A34	m	16	4
A27	m	16	2
A25	m	14	27
A01	m	16	3
A06	m	16	3
A10	m	16	2

## Daten der afrikanische Infektionsseren:

### *S. haematobium* Infektionsseren

Nummer	Angaben zur Person		
	Serum	Geschlecht	Alter
A101	f	13	13
A92	m	12	2
A91	m	15	20
A72	m	11	13
A65	m	12	2
<b>Kontroll Seren (negative Seren)</b>			
A89	m	12	
A67	f	13	
A57	m	13	
A84	m	13	
A83	m	14	

## DNA-Sequenzen der wichtigsten untersuchten Klone

### Klon 9 (Sj22)

```

1  GGATCCCCGG GCTGCAGGAA TTCGGCACGA GTTTTGTTTT ACCCAACGGT
51  TCCAGTGAAT TCTGATCGGA CAACCAATGT TTTCGGCAA TTATGATGGT
101 TGTGAGTCTG ACAGTAGTTC TTCCAGTGAT ATGAGATATG AAGGAATCAG
151 TGCAAACATC ACCGAAACCT CTAAAGCTAA AGCTCTGGAG TTTGAAGAAC
201 TAATGGACAA AGAACTTGAT TTAAGTGTTA ATAGTATTTA CGAAAAATCA
251 ACATATGCAA ATAAAGAGAA TAAGCAAAAT AAAAACTTA GGGTACAATT
301 TAAGACAGAT GACAGTTATG GTAAGTTGCT TGTTGATGAA GACCCTCTTT
351 GCGATTATAA AGAGGATGAA GCCAATTCGA AATGGGTACG GGAGAATTTA
401 CCTGGAGGAC AGTGCACGGA ATCAGATGCC ATTCTTAACT GTCCTGGATG
451 TATGTCTGTG TTATCTTTAA ATAGTCACAG ACAACCACAT TTTAAGGCAC
501 AATATTATAC AGAATATCCT ATCAATTGTC TTGTGGACGA AACAAAAATT
551 ACATCTCGAA CTGTCTCAAG ACCAAAAACG AAAAAaTCTT CCGTAGAAAA
601 CAGTTTAATA CCAAGCAGAA CCACCATGAA AGAATACCAC CCAGTCAACT

```

651 GTAAAGTATG TGGAAATCCA GTCGGATGTA AAGAAGTCAG GACTAATGTG  
 701 ATATGTTTCA GT

### Klon 14 (Fimbrin)

1 GCNCGAATTA NCCTCACTAA AGGGANCAAA AGCTGGAGCT CCACCGCGGT  
 51 GGC GGCCGCT CTAGA ACTAG TGGATCCCC GGGCTGCAGG AATTCGGCAC  
 101 GAGCGTGAAT CAAATAATAT TGCATGGAGT GATCTAAAAC GTGCATTAGA  
 151 AATAGTTGGT GTATCTGTAG CTGGACATGA AATAAGAGAT TTAGTTGGAC  
 201 AACCACGTAA TTGGCTTAAT TTAGCTGAAT TCAATGATTT ATATATGAGA  
 251 GCTAAAGATA TGAAAGATAC AACAAAAGCA ATACGTAAAG CATTACTATT  
 301 GANACATTCT GAAGATGTTA AGTCGTTTAC TGTTGGCAAA AATGATACTG  
 351 ATACACGACA TTCAGTTAGT AAAGCTGAAG AAAGAGGCTT TACACTATGG  
 401 ATTAATAAAC GTTTAGGTCA TGATACAGAA TTACAAAATG AAATATTACC  
 451 AATTGATCCA TCAATTGATG GTCAATTATA TCAACGATGC AAAAATGGNA  
 501 ATATTATTAT GTAAACTTGT CAATGTTGCT AGTCCAGATA CTATTGATGA  
 551 ACGGANGTAT AAATCGAGGA GCTGCTTTAA AAAANNGTTT TCCAAGGTNC  
 601 ANGGAAAATT TGGACATTAG CNGNGAATTC AGCTGGCANC AATTGGGGANG  
 651 TTGN GTTG T AANANNGGTC CAGAAGNTTN TNTGCAAGGC AAACGACNNN  
 701 TTNTTTTAGG NTNATNNGGC ATTAATTCGC GNGGNCNAGT GATACATTAC  
 751 TTGGATAAAC TGGTGAANGT TAGCTTATAC TGATGGTGAA ATGNNGAGAT  
 801 TAGCGCATGA ACCGAGATTT TATGCGTGGG TAATAACNTT ACACNGCCGG  
 851 T

### Klon 27

1 TAACCTCACT AAAGGGANCA AAAGCTGGAG CTCCACCGCG NGTGGCGGCC  
 51 GCTCTAGAAC TAGTGGATCC CCNGGNCTGC AGGTAATCTA AAAC TTAATT  
 101 GTTTAGCTCT TGATGCNGTT AGTTTAAGAC GACTTACTTC TACTGATCAA  
 151 ATACCACCAC TTTTACATG GGAGCTACGT TCATCTATTG GTGGTCAACT  
 201 TTTACCTTAT ACTGAACAAG CCAGTGGTTC TATAATAATA AAACAACCAA  
 251 CAAAAGATCC TAAATTAGCT GNAGAAGTTG GTGT TAGTAC AATGGAATTA  
 301 GAGACTTTAC GATTACCTGT TGATGCTCCA TCTGGTGCAT GGAGTCGTTG  
 351 TGTTGTACAA ATTGCC AAC AAGTATTCAC TTCANCATAT TTCCATATTC



401 AATTACAAAA AGANACTACA ATGGNAAACT TATTCACCAT TGCCGANATC  
 451 TCATTGGNAG TGATGATAAA AGTATTGNAA TGATTGTCAA AAGTTTAGAT  
 501 TCAGAAGGGA ATAAAANTNG TTCAAGAAAG TGNAATGTT GAGTTAACAT  
 551 GTGAAGCACG NTATGCTG

### Klon 28 (Paramyosin)

1 NACCTCACTA AAGGNAACAA AAGCTGGAGC TCCACCGCGN GTGGCGGCCG  
 51 CTCTAGAACT AGTGGATCCC CNGGGCTGCA GGAATTCGGC ACGAGTCGAG  
 101 TTTTTTTGTA TTTATTNCTT AGCTAACTTA TTTCACTGTT TAATCAGACG  
 151 TTATAATTGT TATCTTCTAA TCATCATTTA ATCATTATGA TGAATCACGA  
 201 TACAGAATCT CATGTGAAAA TTTCGAGAAC AATTTATCGT GGAGTATCAC  
 251 CAAGTACAAC AAGACTTGAG AGTCGAGTTC GTGAATTAGA AGATATTTTG  
 301 GATTTAGAAC GTGATGCAAG AGTTCGAGCT GAACGACATG CTGCTGATTT  
 351 AAGTNATCAA GTTGATGCCC TTTCGGAACG TTTAGATGAA GCTGGTGGAT  
 401 CTACAACCTCA AACTCAAGAA TTATTGANAC GTCGTGAAAT GGAAATTAAC  
 451 AAATTACGTA AAGATTTAGA GAATGCCAAT GCATCACTTG AATTAGCTGA  
 501 ANCATCAATG AGACGTCGAC ATCAAACAGC ATTAAATGAA TTATCATTGG  
 551 AGGTGGAAAA TTTACAAAAN CNAANGGA AAGCAGAGAN AGACAAAAGC  
 601 CATCTGATCA TGGAAGTAGA TAATGTTCTA AGGACAGTTA GATGGTGCAC  
 651 TTAAAGCTAA GCNATCAGCT GGAATCAAAA TTAGAAGGAT TGGATAGTCA  
 701 ATTGAATCGA TTGAAAACGT TAACAGATGA TCTACAAAGA CAATTAAGTG  
 751 GAATTGAACA ATGC

### Klon 44

1 GAGANATTAA CTATGAGAGA ATTACATCAC CATCACCATC ACGAATTGAA  
 51 TTCGGCACGA GGGGATCTCT AAAACGTGGT GCTCCTCCGT GGCTAAGGCT  
 101 TATAGCAGCT CACGTTTTTA ATCATGTCTA AAAGCGAGTT AGCTTGTGTG  
 151 TACGCTGCAT TAATGTTAGC TGATGATGAC ATCGACGTGA CAGCCGACAA  
 201 AATCAATACC ATTTTGAAGG CTGCAAATAT CAAGTTCGTC GAATCATAAC  
 251 TCCCAATCT TTTCGCGACA TCTTTAAATG GTAAGAATGT GAAGGATCTA  
 301 CTAATGTCCA TGGGTTCCACC TGCACCTTCA GCTGCAGTAA CGTCGGCAGT  
 351 TCCAACAGCA GCGTCAGCTA CCAGTTGCTG CTGCTGAGAA GCCAAAGGAA

401 GCTGTGAAGG AGGAAAAGAA GGTTGTCTNG GATGACGATT CTTGATGAGT  
 451 CCATCGGCTT TGGCTTGTTT GATTAATTGC ACTATATGTA CAGTTTAAAT  
 501 TGGAAAAAAA AAAAAAAAAA ACTCGANGGC CCCGGTCCAA GCTTAATTAG  
 551 CTGAGCTTGG ACTCCTGTTN GNTAGATNCA GTAATGGACC TCAGAACTCC  
 601 CNTNTGGATT TGTTCAANAAC GCTCCGGTTG CCCNCCCGGC CGTTTTTTTTT  
 651 TNGGTNGNGA ATTCAANGCT TGCTTTGGCG GGANTT

### Klon 45

1 CCTCACTATA GGGAACAAAG CTGGAGCTCC ACCGCGGTGG CGGCGCTCTA  
 51 GAACTAGTGG ATCCCCGGG CTGCAGGAAT TCGGCACGAG TTTTACTCTT  
 101 GTGATTTGTT GCATGACTAT CTACTAACGA GGAGAAAATC TACACTGGCG  
 151 ATCAAATTTT TTCTAATGTG ACGTCATCGT TGAAAATGGG TGGACATGTT  
 201 AGTCGTGGTC GAGATAATCA GTCGCTCATT GATGAACTGC TTAGAAACGG  
 251 TCTTACATTA GACCCGGAGG TTGAGCGTGC TCTTCGTTTA GTTGACAGAG  
 301 GTCACTATGT CAGTGAAAAA GGCCCGCGAG CTTATATGGA TATGGCATGG  
 351 AGGTCTGGTT CCCTGCACCT TTCGGCGCCC AGTATCTATA TTGTTGCTCT  
 401 AAAAAACCTC GATATCCAGC CTGGAAATCG CTTTTTGAAT GTTGGTAGTG  
 451 GAACAGGATA CCTTAGTACT GTCATTGGTT GTTGCTAGGG TATAATGGTG  
 501 TTAACCATGG TATTGAGGTT AATGATTTTA ACGTCAATTT CTCACGTGAA  
 551 CATTTAGTAA CATTGATGTC TGAATGTGAT GCACCTTTTG AACGGTCGTT  
 601 TTGTCCTCCA GTTTTCTTAC ATGGAAATAT TCTAGATTTA GTCATCCCCT  
 651 CAGACCATCA GGAAAATATT ACTGACAGAC CAATGTTTTT CAAAGCCTCT  
 701 GGAAGTGGTT CGAGGATATC CTAT

### Klon 48 (Paramyosin)

1 AACCTCACTA AAGGGACAAA AGCTGGAGCT CCACCGCGNG TGGCGGCCGC  
 51 TCTAGAACTA GTGGATCCCC NNGGCTGCAG GAATTCGGCA CGAGAGATAA  
 101 TGTTCTAGGA CAGTTAGATG GTGCACTTAA AGCTAAGCNA TCAGCTGAAT  
 151 CAAAATTAGA AGGATTGGAT AGTCAATTGA ATCGATTGNN AACGTTAACA  
 201 GATGATCTAC AAAGACAATT AACTGAATTG AACAAATGCTA AATCGAGATT  
 251 AACATCAGAG AATTTTGAAC TTTTACACAT AAATCAAGAT TATGAGGCCG

VIII

301 AAATTTTGAA TTATTCTAAA GCAAAATCAT CACTTGAAAG TCAAGTAGAT  
 351 GATTTAAAAC GATCATTAGA TGATGAATCT AGAAATCGTT TCAATCTCCA  
 401 AGCTCAACTT ACATCACTTC AAATGGATTA TGATAATTTA CAGGCTAAAT  
 451 ACGATGAAGA AAGTGAAGAA GCTAGTAATT TAAGANACCA AGTATCTAAG  
 501 TTTAACGCTG ATATTGCTGC ATTAAAATCA AAATTTGAAC GTGAACTTAT  
 551 GAGTNAACA GAGGAATTCG AAGAAATGAA GCGAAAATTG ACAATGAGAA  
 601 TCACTGAACT TGAAGATGTT GCAGAGAGAG ACGATTAANA GCGGTATCAT  
 651 TAGAAAANCT CAAAACAAAA TTACCACTGG GAATTAAG

**Klon 49 (Fimbrin)**

1 CAWATTTACK SGATBATATV ATCAATVAGA TGCYATTCAA TATTTACATT  
 51 TTAACATTAG TAACTATGAC AACAATAGAG TCATTGACTC AAGAACAATG  
 101 GGATGATCTA TTTCATAATT TTGAATCATT ACGTGAATCA AATAATATTG  
 151 CATGGAGTGA TCTAAAACGT GCATTAGAAA TAGTTGGTGT ATCTGTAGCT  
 201 GGACATGAAA TAAGAGATTT AGTTGGACAA CCACGTAATT GGCTTAATTT  
 251 AGCTGAATTC AATGATTTAT ATATGAGAGC TAAAGATATG AWAGATACAA  
 301 CAAAAGCAAT ACGTAAAGCA TTACTATTGA AACATTCTGA AGATGTTAAG  
 351 TCGTTTACTG TTGGCAAAAA TGATACTGAT ACACGACATT CAGTTAGTAA  
 401 AGCTGAAGAA AGAGGCTTTA CACTATGGAT TAATAAACGT TTAGGTCATG  
 451 ATACAGAATT ACAAATGAA ATATTACCAA TTGATCCATC AATTGATGGT  
 501 CAATTATATC AACGATGCAA AAATGGAATA TTATTATGTA AACTTGTCAA  
 551 TGTTGCTAGT CCAGATACTA TTGATGAACG AGTATAAATC GAGGAGCTGC  
 601 TTTAAAAAaT GKTTTCAATG TTCATGAAAA TTTGACATTA GCTGTGAATT  
 651 CAGCTGCATC AATTGGATGG TGTGGTGTGA AACTGGTCC AGAAGATATA  
 701 TGCAAGGCAA ACGACATATT GTTTT



**Klon 68**

1 CATATCAGCN GAAATACCCT CACTAAAGGG AACAAAGCTG GAGCTCCACC  
 51 GCGGTGGCGG CGCTCTAGAA CTAGTGGATC CCCCgggCTG CAGGAATTCTG  
 101 GCACGAGCAA AAGCCATCTG ATCATGGAAG TAGATAATGT TCTAGGACAG  
 151 TTAGATGGTG CACTTAAAGC TAAGCAATCA GCTGAATCAA AATTAGAAGG  
 201 ATGGATAGTC AATTGAATCG ATTGAAAACG TTAACAGATG ATCTACAAAG  
 251 ACAATTAACT GAATTGAACA ATGCTAAATC GAGATTAACA TCAGAGAATT  
 301 TTGAACTTTT ACACATAAAT CAAGATTATG AGGCGCAAAT TTTGAATTAT  
 351 TCTAAAGCAA AATCATCACT TGAAAGTCAA GTAGATGATT TAAAACGATC  
 401 ATTAGATGAT GAATCTAGAA ATCGTTTCAA TCTCCAAGCT CAACTTACAT  
 451 CATTCAAATG GATTATGATA ATTTACAGGC TAAATACGAT GAAGAAAGTG  
 501 AAGAAGCTAG TAATTTAAGA AACCAAGTAT CTAAGTTTAA CGCTGATATT  
 551 GCTGCATTAA AATCAAAATT TGAACGTGAA CTTATGAGTA AAACAGAGGA  
 601 ATTGAAGAA ATGAAGCGAA AATTGACAAT GAGAATCACT GAACTTGAAG  
 651 ATGTTGCAGA GAGAGAACGA TTAAAAGCGG CATCCTAGAA AATCAAANCA  
 701 ACCTTACCCC TGGNCACTAC AGATCCTAAC GGCNGGAATA NAAAGCTCCC  
 751 NCGCANAGGG GATACCGCNG NGCNCACAAG GGGACACAAC ACGGCCAACC  
 801 CGGCGTACAC CACACCACCG ACCCACCCGC TCNCAACCCA CNACCNCGCN  
 851 NACGACAAGT NCACCCCCAA CGACCGACCC ACACACAAAC ACGCCCCACG  
 901 CNCCAACACA CTTCCNTATC NCAAGTCCNA TCGTCACGCA CCA

**Klon 74**

1 CTAGAACTAG TGGATCCCC GGGCTGCAGG AATTCGGCAC GAGCAAAAAGC  
 51 CATCTGATCA TGGAAGTAGA TAATGTTCTA GGACAGTTAG ATGGTGCACCT  
 101 TAAAGCTAAG CAATCAGCTG AATCCAAACA TTCAGCACAG GCATTGGCAT  
 151 CAGTCCAATT GCACATCCGC ATTGCAACAA CGTTAACAGC ATGCATCCTC  
 201 ACCAACAGGA CCAATTCAAC TGCAATTGCA CACCAATGCT CACAATCCGC  
 251 AGCATTCAAC CATCCAGCAG CACATTTTGC AACCTTTTCA CCACCATACA  
 301 CATCCAAGCA TTCATGCAGG CGCCAACATT TTGCACATTC ATTCTCAAC  
 351 AGCGAANAAT CCATCCACTC TGGCAACAGT CNAAGGTCAG CATGCATTTTC  
 401 ACAACACGGC ATCCCATTCA GCATGCATGC ACATCCTAAG AAAACATCGT  
 451 ATATNCAATC TCCCAAGCTC AACTTCACAT CCATTCCANA ATNGGCATTN

501 ATGCATCAAA TATTCACAGG CCTAACATCC GCATGCAAAG CACAAGTAGC  
 551 ANGCACAGCT CAGTAATCTT CAAAGCAAAA CCCAAGGTCA TCCTCAAGGT  
 601 TTCAACGCCT TGCATATTGC GTTGCCATTC ANCACATCCC AACAATTNGG  
 651 GACACCGTGG CACTTCATGC AGTCAACNCA GNAGGCAATC CGCAAAGGCA  
 701 ACATGCACAC CGNAAACACT GGACCCCATG ACGCAATTCA CGGACACCTA  
 751 GCACCGACTG GTGCCCGCGC AGACGCANGG AATAAAAAAAG CNGGGACNTC  
 801 AATCAGAACA CAACACCAAA ACACAACCAT AAAAACACGG AAAATTAAGG  
 851 ACCACAGGCC CGGCACCTAG CAAGGCCCCC CACTAAACGC ACAGGGNGCC

**Klon 83**

1 GAATTAACCT CACTAAAGGG AaCAAAAGCT GGAGCTCCAC CGCGGTGGCG  
 51 GCCGCTCTAG AACTAGTGGA TCCCCGGGCT GCAGGAATTC GGCACGAGAG  
 101 TBAATCAACA TTCATTTGAA CTCATCAACA TATTTACTGA TATATATCAA  
 151 TAGATCTATT CAATATTTAC ATTTTAAACAT TAGTAACTAT GACAACAATA  
 201 GAGTCATTGA CTCAAGAACC ACGGGATGAT CTATTTCATA ATTTTGAATC  
 251 ATTACGTGAA TCAAATAATA TTGCATGGGA GTGATCTAAA ACGTGCATTA  
 301 GAAATAGTTG GTGTATCTGT AGCTGGACAT GAAATAAGAG ATTTAGTTGG  
 351 ACAACCACGT AATTGGCYTA ATTTAGCTGA ATTCMATGAT TTATATATGA  
 401 GAGCYAAAGA TATGAAAGAT ACAACAMAAA GCMVATACGT GAAAGCATTa  
 451 CTATTGAAAC ATTCTGRAGA TDGTTAAGTC GKTTACHGTG TGGCSMAAAa  
 501 WKKATACBTG ATACACKGTT TTtCAGWTAG TRAAAGCTGW AAGAAAGAGG  
 551 CGTTACACBA TRGGXKTAAC ARAACGBGTY AGTGGCRHGG RTACABARRT  
 601 TWCAHAATGT GATATTTWCC MMWTGRKMCA CCWMTTGXAT GGGKCAMTAT  
 651 tATTCMACGA TGYCMAAAAT GGGAGAATCA WKWTGTCRTA CTGTGTGMCA  
 701 CDGTGGTGAG ACCMCRKAC MATAGTGBAG TCYg

**KLon 88**

1 GATACAGCTC GAAATACCCT CATAAAGGGA ACAAAGCTG GAGCTCCACC  
 51 GCGGTGGCGG CGCTCTAGAA CTAGTGGATC CCCCgggCTG CAGGAATTCG  
 101 GCACGAGCAA AAGCCATCTG ATCATGGAAG TAGATAATGT TCTAGGACAG  
 151 TTAGATGGTG CACTTAAAGC TAAGCAATCA GCTGAATCAA AATTAGAAGG  
 201 ATTGGATAGT CAATTGAATC GATGAAAACG TTAACAGATG ATCTACAAAG

251 ACAATTAACT GAATGAACAA GCTAAATCGA GATTAACATC AGAGAATTTT  
301 GAACTTTTAC ACATAAATCA AGATTATGAG GCGCAAATTT TGAATTATTC  
351 TAAAGCAAAA TCATCACTTG AAAGTCAAGT AGATGATTTA AAACGATCAT  
401 TAGATGATGA ATCTAGAAAT CGTTTCAATC TCCAAGCTCA ACTTACATCA  
451 CTTCAAATGG ATTATGATAA TTTACAGGCT AAATACGATG AAGAAAGTGA  
501 AGAAGCTAGT AATTTAAGAA ACCAAGTATC TAAGTTTAAAC GCTGATATTG  
551 CTGCATTAAA ATCAAAATTT GAACGTGAAC TTATGAGTAA AACAGAGGAA  
601 TTCGAAGAAA TGAAGCGAAA ATGAAATGAG AATCACTGAA CTTGGAAGAT  
651 GTTTGCNCGA GCAGAGAACC GATTAAAAGG CGGTATCNTT TAGAAAAACT  
701 CCAAACAANA AATTTAAACT GGAATTAAG GATCTANGGC TGGAATNGAA  
751 AGGCTTTCAT AGAGAAAGGG GAATAAGNCG GNGGGGAAA ATNGGGAANC  
801 NTAGATNTGG AACAAAGTGG GTATATATGA AGTGACAAGN GAAAAAACG  
851 AAGGAAGGAG AANCAAAGAG GAANGGCGAA TAGAATAACT GCTTGTCCCTG  
901 TNCGTNTNAT CTTTTCTTTT TTTTCTNTGT TGNTGTAA