

**Etablierung eines Gentransfersystems für *Schistosoma*  
*mansoni* und Ansätze zur Immortalisierung von  
*Schistosoma*-Zellen**

**Inaugural - Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Volker Wippersteg  
aus Essen

Düsseldorf 2002

---

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: HD Dr. C.G. Grevelding

Korreferent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2002

1. EINLEITUNG	7
2. MATERIAL & METHODEN	16
<b>2.1 Material</b>	<b>16</b>
❖ 2.1.1 Lösungen und Puffer	16
❖ 2.1.2 Medien und Zusätze	17
❖ 2.1.3 Enzyme und Molekulargewichtsstandards	18
❖ 2.1.4 Primer	18
❖ 2.1.5 Plasmide	20
❖ 2.1.6 Antikörper	20
❖ 2.1.7 Bakterien, Zelllinien	20
❖ 2.1.8 Computersoftware und Internetprogramme	21
<b>2.2 Methoden</b>	<b>21</b>
❖ 2.2.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	21
❖ 2.2.2 Isolation von Nucleinsäuren	21
◆ 2.2.2.1 Extraktion genomischer DNA aus <i>S. mansoni</i>	21
◆ 2.2.2.2 Extraktion von Total-RNA aus <i>S. mansoni</i>	22
◆ 2.2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien durch alkalische Lyse	22
◆ 2.2.2.4 Säulen-Präparation von Plasmid-DNA	22
❖ 2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	22
❖ 2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren	23
◆ 2.2.4.1 DNA-Gelelektrophorese	23
◆ 2.2.4.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	23
❖ 2.2.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen	23
❖ 2.2.6 Enzymatische Reaktionen an DNA	23
❖ 2.2.7 Sequenzierung	23
❖ 2.2.8 DNA Transfer auf Nylonmembran (Southern Blot)	24
❖ 2.2.9 Radioaktive Markierung von DNA über „random priming“	24
❖ 2.2.10 Hybridisierung und Detektion	24
❖ 2.2.11 Reverse Transkription (RT)	24
❖ 2.2.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	25
❖ 2.2.13 Isolation von Gesamt-Protein aus <i>S. mansoni</i>	25
❖ 2.2.14 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-Page)	25
❖ 2.2.15 Proteintransfer auf Membranen (Western Blot)	26
❖ 2.2.16 Immunoblot	26
❖ 2.2.17 Laborzyklus und Zucht von <i>S. mansoni</i>	26
◆ 2.2.17.1 Endwirtinfektion und Isolation adulter Schistosomen	26

◆	2.2.17.2 Gewinnung von Larvenstadien	26
❖	2.2.18 <i>Schistosoma in-vitro</i> Kultur	27
◆	2.2.18.1 Adulte Schistosomen	27
◆	2.2.18.2 <i>In-vitro</i> Generierung und Kultivierung primärer Muttersporozysten	27
❖	2.2.19 Particle Bombardment von <i>S. mansoni</i> mit der Helios Gene Gun©	28
❖	2.2.20 Particle Bombardment mit der PDS 1000©	28
◆	2.2.20.1 „DNA coating“	28
◆	2.2.20.2 Particle Bombardment Prozedur	28
❖	2.2.21 Zellkultur	29
◆	2.2.21.1 COS-7 und CHO Zellen	29
◆	2.2.21.2 <i>Bge</i> -Zellen	29
❖	2.2.22 Transfektion von Zellen	30
❖	2.2.23 Reportergennachweis	30
◆	2.2.23.1 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	30
◆	2.2.23.2 $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Assay im Lysat	30
❖	2.2.24 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	31

### 3. ERGEBNISSE 32

#### 3.1 Etablierung eines Gentransfersystems für *Schistosoma mansoni* 32

❖	3.1.1 Transformationsvektoren	32
◆	3.1.1.1 Einsatz verschiedener Reportergene	32
◆	3.1.1.2 Vorhandene Transformationsvektoren	33
❖	3.1.2 Klonierung neuer Transformationsvektoren und deren Funktionalitätstests im heterologen System	34
◆	3.1.2.1 Die Transkription der Cystein Protease ER60 in verschiedenen Stadien	34
◆	3.1.2.2 Klonierung von ER60-GFP-ER60 und Funktionalitätstest	35
◆	3.1.2.3 Klonierung von Act-GFP-Act und Funktionalitätstest	37
◆	3.1.2.4 Klonierung von p14-GUS-p14	38
❖	3.1.3 Particle Bombardment (Helios Gene Gun vs. PDS 1000)	40
❖	3.1.4 Gentransferexperimente mit der Helios Gene Gun	41
❖	3.1.5 Gentransferexperimente mit der PDS 1000	42
❖	3.1.6 Transformation adulter Schistosomen Männchen mit dem Vektor hsp70-GFP-hsp70	44
◆	3.1.6.1 Molekularbiologische Analyse	44
◆	3.1.6.2 Mikroskopische Analyse	46
❖	3.1.7 Transformation <i>in-vitro</i> generierter Sporozysten mit dem Vektor hsp70-GFP-hsp70	48
◆	3.1.7.1 Molekularbiologische Analyse	48
◆	3.1.7.2 Mikroskopische Analyse	49
❖	3.1.8 Transformation adulter Schistosomen Männchen mit dem Vektor ER60-GFP-ER60	50
❖	3.1.9 Transformation von Sporozysten mit dem Vektor ER60-GFP-ER60	51

◆	3.1.9.1 Molekularbiologische Analyse	51
◆	3.1.9.2 Mikroskopische Analyse	52
❖	3.1.10 Transformation adulter Schistosomen Männchen mit dem Vektor Act-GFP-Act	54
❖	3.1.11 Ansätze zum Gentransfer über die Mikroinjektion	55
❖	3.1.12 Auf dem Weg zu einer stabilen Transformation	55
❖	3.1.13 Erste Experimente zur funktionellen Analyse eines <i>Schistosoma</i> -Promotors im homologen System	58
◆	3.1.13.1 Konstruktion von hsp70 Promotordeletionsklonen und deren Funktion im heterologen System	58
◆	3.1.13.2 Transformation adulter Schistosomen mit den Deletionsplasmiden	60
❖	3.1.14 Quantitative Promotoranalyse mittels des Luciferasesystems	61
◆	3.1.14.1 Luciferase als Reportergen	61
◆	3.1.14.2 Klonierung des Luciferasegens in die bereits vorhandenen Deletionsklone	61
<b>3.2 Ansätze zur Immortalisierung von <i>Schistosoma</i>-Zellen</b>		<b>63</b>
❖	3.2.1 Zielgerichtete Punktmutation des ras-Homologs aus <i>S. mansoni</i>	63
❖	3.2.2 Klonierung von ras 18/210	65
❖	3.2.3 Funktionalitätstest zur Transformationspotenz der mutierten Ras-Moleküle	66
❖	3.2.4 Klonierung von Plasmiden zur Immortalisierung	69
◆	3.2.4.1 hsp70-ras 18/210 (wt, G12V, Q61L) und ER60-ras 18/210 (wt, G12V, Q61L)	69
◆	3.2.4.2 ER60-ras(wt, G12V, Q61L)-ER60	70
❖	3.2.5 Isolation von Zellen aus adulten und larvalen Schistosomen	71
❖	3.2.6 Transformation adulter Schistosomen mit mutierten GFP-Ras Fusionsproteinen	71
◆	3.2.6.1 Klonierung der Transformationsvektoren mit dem GFP-Ras(G12V/Q61L) Fusionsprotein	72
◆	3.2.6.2 Gentransferexperimente mit dem Transformationsvektor ER60-FSP-ER60	73
❖	3.2.7 Klonierung des LargeT Antigen von SV40	74
<b>4. DISKUSSION</b>		<b>76</b>
<b>4.1 Etablierung eines Gentransfersystems</b>		<b>76</b>
❖	4.1.1 Hsp70-induzierte GFP-Expression in Schistosomen	77
❖	4.1.2 Charakterisierung des hsp70-Promotors aus <i>S. mansoni</i> .	78
❖	4.1.3 ER60-induzierte GFP-Expression in Larven und adulten Schistosomen	80
❖	4.1.4 Aktin-induzierte GFP-Expression in adulten Schistosomen	82
❖	4.1.5 Transiente oder stabile Transformation	84
❖	4.1.6 Zukünftige Arbeiten	86
<b>4.2 Ansätze zur Immortalisierung von <i>Schistosoma</i>-Zellen</b>		<b>87</b>
❖	4.2.1 Transformationspotenz des mutierten Sm-Ras	88

---

❖	4.2.2 Transfektion isolierter <i>Schistosoma</i> -Zellen	88
❖	4.2.3 Gewebeveränderung in transformierten Schistosomen	89
	<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
	<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>102</b>
	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>104</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>105</b>
	Eidesstattliche Erklärung	106

## 1. EINLEITUNG

Schistosomen gehören innerhalb der Plathelminthen zu den Trematoden und zeichnen sich durch einen komplexen Lebenszyklus mit zwei unterschiedlichen freilebenden Larvenstadien sowie einem in dieser Klasse einzigartigen Geschlechtsdimorphismus aus (Abb.1).

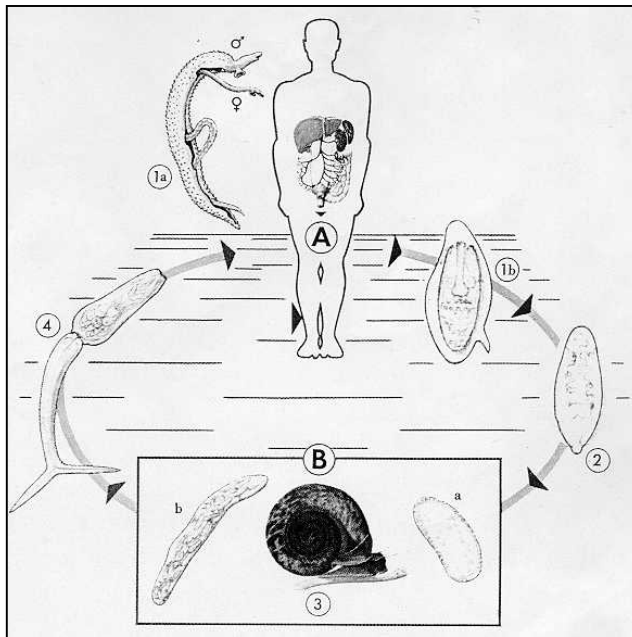


Abb. 1: Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni*

A: Endwirt, B: Zwischenwirt  
 1a: Pärchen, 1b: Ei, 2: Miracidium, 3: Schnecke, 3a: Muttersporozyste, 3b: Tochtersporozyste, 4: Cercarie  
 (aus Piekarski, 1973)

Die vom Endwirt über den Urin oder Stuhl ausgeschiedenen Eier gelangen ins Wasser. Dort schlüpfen die Larven (Miracidien), die je nach Art eine andere, spezifische Süßwasserschnecke als Zwischenwirt infizieren. Über Metamorphose entwickeln sich innerhalb von 6 Wochen die für den Endwirt infektiösen Cercarien. Diese verlassen aktiv die Schnecke und dringen infolge eines Kontaktes mit dem Endwirt (Bsp. Mensch) durch die Haut in den Körper ein und entwickeln sich dort zu adulten Individuen. Über das Blutgefäßsystem gelangen sie in die Pfortader, wo es zur Paarung der Würmer kommt. Ein aus entwicklungsbiologischer Sicht einzigartiger Mechanismus führt dazu, dass die Weibchen erst nach der Paarung mit den Männchen die Geschlechtsreife erlangen (Popiel, 1986). Im Anschluss an die Paarbildung begeben sie sich gemeinsam auf den Weg in den Mesenterialkomplex des Darms (u.a. *S. mansoni*) oder die Blutgefäße des Urogenitaltrakts (*S. haematobium*), in denen die Eiablage beginnt. Über den Darm bzw. die Blase gelangen die Embryonen ins Freie. Die Menge an produzierten Eiern ist so hoch (ca. 400 Eier/Tag u. Weibchen) (Loker, 1983), dass es auch zu einer Verschleppung der Eier im Blutkreislauf kommt. Dort bleiben sie in den Kapillaren lebenswichtiger Organe (Leber, Milz etc.) stek-

ken und rufen Entzündungen (Granulome) hervor, die schließlich zu fibrös-zirrhothischen Veränderungen des Gewebes führen (Hepatosplenomegalie) (Kayser et al., 1989).

Schistosomen sind weltweit von großer medizinischer und ökonomischer Bedeutung. Sie verursachen die Bilharziose (Schistosomiasis), die häufigste durch einen Parasiten ausgelöste Tropenkrankheit nach der Malaria (Savioli et al., 1997). Neben den für den Menschen relevanten Arten gibt es noch weitere, die bevorzugt Haus- und Hoftiere befallen (DeBont & Vercruysse, 1998).

Aufgrund der Bedeutung der Bilharziose und anderer Tropenkrankheiten ist im Rahmen der Bekämpfung von Parasitosen unter der Federführung der WHO u.a. ein Genomprojekt für Schistosomen ins Leben gerufen worden. Informationen über Parasiten-Genome sind essentiell für die Forschung und werden zum Grundverständnis und somit zur Kontrolle von bedeutenden parasitären Erkrankungen beitragen (Rollinson & Johnston, 1999; Gutierrez, 2000). Wie sich bereits bei der Erforschung der Genome pathogener Bakterien herausgestellt hat, bieten die erhaltenen Daten Möglichkeiten bei der Entwicklung von neuen Therapeutika oder Impfstoffen (Rollinson & Blackwell, 1999). Dies wird besonders im Hinblick auf die vermehrt auftretenden Resistenzen immer dringlicher (Sangster, 1999), speziell beim dem bislang wirksamen Medikament gegen Schistosomen Praziquantel<sup>C</sup> (Kusel & Hagan, 1999).

Mit Hilfe von Sequenzdaten ist man in der Lage, neue Gene zu identifizieren, deren Charakterisierung und funktionelle Analyse dazu beitragen können, wichtige, noch offene Frage zu beantworten: (a) Welche Gene und/oder Mechanismen sind für die Entwicklung des Parasiten essentiell? (b) Wie entgeht der Parasit dem Immunsystem seines Wirtes? (c) Gibt es Mechanismen (z.B. Signaltransduktionswege), die für diesen Organismus einzigartig sind? (d) Welche Moleküle könnten die Basis für die Entwicklung von Medikamenten oder Vakzinen darstellen? (Johnston et al., 1999; Colley et al., 2001).

Während der letzten 15 Jahre sind im Rahmen der molekularen Forschung an Schistosomen eine Reihe von Genen und deren regulatorische Elemente auf konventionelle Weise identifiziert und charakterisiert worden (Köster et al., 1988; Schüssler et al., 1995; Ramachandran et al., 1996; Davies et al., 1998; Freebern et al., 1999; Valle et al., 1999; Inal & Sim, 2000; Salter et al., 2000). Diese Gene sind an unterschiedlichsten Prozessen beteiligt, wie der Entwicklung des Organismus, der Männchen-Weibchen-Interaktion oder der Wechselwirkung zwischen Wirt und Parasit.

Um Gene jedoch umfassend studieren zu können, ist es wichtig, genaue Daten über ihre Funktion und Steuerung zu gewinnen. Arbeiten auf dem Gebiet der "post genomics"



leisten dazu einen großen Beitrag. Sie umfassen u.a. die funktionelle Genetik, die mit Hilfe von Transformationssystemen Funktionsanalysen von Genen im homologen Organismus erlaubt.

Seit einigen Jahren sind speziell für protozoische Parasiten Transformationsprotokolle verfügbar, die dazu beigetragen haben, entscheidende Prozesse dieser Organismengruppe aufzuklären (LeBrowitz et al., 1991; Soldati & Boothroyd, 1993; Horrocks et al., 1998; Kelleher et al. 1998; Teixeira, 1998, Adamson et al., 2001). Bis heute gibt es jedoch noch kein etabliertes Gentransfersystem für Schistosomen und andere parasitische Helminthen, das reproduzierbar angewandt worden ist.

Im Gegensatz zu den Protozoen sind multizelluläre Parasiten weit davon entfernt, ideale Forschungsobjekte zu sein, da ihre Haltung und Kultivierung sehr aufwendig ist und spezielle Voraussetzungen erfordern. Besonders die lange Generationszeit parasitischer Helminthen und der obligate Wirtswechsel erschweren die Aufrechterhaltung des Entwicklungszyklus (Colley et al., 2001). Die funktionelle Analyse klonierter Gene aus multizellulären Parasiten war bislang darauf beschränkt, anhand von Sequenzvergleichen mit bekannten Genen anderer Organismen auf deren Funktion zu schließen. Weitere Hinweise konnten durch die Transformation heterologer Systeme, wie z.B. *C. elegans* oder mammalischer Zelllinien, gewonnen werden (Grant, 1992; Britton et al., 1999; Hashmi et al., 2001; Nabhan et al., 2001).

Die Hauptaufgabe im Rahmen dieser Promotiosarbeit war, ein Protokoll für den Gentransfer in *S. mansoni* zu entwickeln, um auch bei diesem Organismus die funktionelle Charakterisierung von Genen und deren Produkten im homologen System zu ermöglichen. Vorangegangene Arbeiten in den Arbeitsgruppen von PD Christoph G. Grevelding und Prof. Werner Kunz haben gezeigt, dass bereits etablierte Methoden wie die Lipofektion, Kalzium-Phosphat-Präzipitation oder die Elektroporation nicht zum gewünschten Erfolg geführt hatten. Allerdings gab es auch erste Hinweise, dass der Einsatz des „Particle Bombardments“ erfolgreich sein könnte. Parallel zu dieser Arbeit wurde dies durch die Arbeiten von Davis et al. (1999) und Jackstadt et al. (1999) untermauert, die zeigten, dass die Transformation über den ballistischen Gentransfer sowohl von *Ascaris*, *Litomosoides* und *C. elegans* möglich ist. Zudem gab es erste Anhaltspunkte für Anwendbarkeit dieses Systems für Schistosomen.

Das Particle Bombardment ist eine physikalischen Methode deren Prinzip auf der Beschleunigung Nukleinsäure-beladener Mikroprojekte beruht, die in der Lage sind, ein Ziel (Organismus, Gewebe, Zellen etc.) zu penetrieren (Abb.2) und daraufhin die DNA oder

RNA freizugeben (Sanford et al., 1993). Die ersten Versuche, Makromoleküle mit Hilfe von hoher Geschwindigkeit in einen Organismus zu transferieren, wurden in den 60er Jahren unternommen, als MacKenzie et al. (1966) den Gentransfer in Pflanzen mit dieser Technik beschrieben. Es dauerte allerdings noch mehr als zwei Jahrzehnte, bis die Methode, die damals auch „particle gun method“ genannt wurde, ihren Durchbruch schaffte. Sanford et al. (1987) beschrieben den universellen Einsatz des Particle Bombardments, um verschiedenste Moleküle (Nukleinsäuren, Proteine etc.) in lebende Organismen einzubringen. Heute ist die Technik weiter verbreitet, und es gibt inzwischen eine Vielzahl von Publikationen, in denen die Anwendbarkeit des Particle Bombardments zur Transformation verschiedener Organismen beschrieben worden ist (Wang et al., 1988; Williams et al., 1991; Schiedelmeier et al., 1994; Hara et al., 2002).

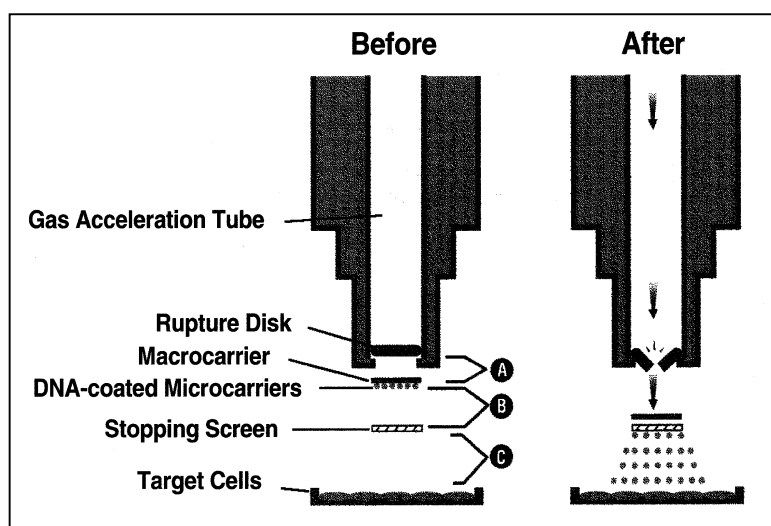


Abb.2: Schematische Darstellung des Particle Bombardments mit der PDS 1000© (aus „technical manual“, Bio-Rad).

A-C: variable Distanzen zwischen den einzelnen Komponenten innerhalb des Gerätes.

Neben der Technik selbst müssen weitere Voraussetzungen für eine erfolgreiche Etablierung geschaffen sein: zum einen spielt die Verfügbarkeit und Kultivierung von entsprechenden Stadien des zu untersuchenden Organismus eine entscheidende Rolle. Zum anderen müssen geeignete Transformationsvektoren kloniert werden, die in den Organismus eingebracht werden sollen. Die *in-vitro* Kultur adulter Schistosomen ist in den Arbeitsgruppen Grevelding/Kunz seit Langem etabliert. Katja Kapp (2000) konnte sie weiterentwickeln und um die Kultivierung von Sporozysten ergänzen. In ihrer Arbeit sind ferner erste Transformationsvektoren für den Gentransfer kloniert worden, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung gefunden haben. Dazu gehört das Konstrukt hsp70-GFP-hsp70, welches Promotor- und Terminator-Sequenzen des Hitzeschock-Proteins 70 (hsp70) enthält. Diese stammen aus dem Liberianischen Stamm von *S. mansoni* und wurden über PCR an-

hand existierender Sequenzen eines hsp70-Gens des Puerto-Ricanischen Stammes (Neumann et al., 1992) kloniert. Die Sequenzierung von hsp70-Homologes aus dem Liberianischen Stamm offenbarte nur geringfügige Abweichungen (Kapp, 2000).

Bei hsp70 handelt es sich um einen sehr gut charakterisiertes Gen aus Schistosomen, das in Adulten über Hitze-Stress induziert wird, in verschiedenen Larvenstadien dagegen konstitutiv exprimiert wird (Neumann et al., 1993). Die Sequenz des klonierten Promotors umfasst ca. 530 bp der 5'UTR und enthält neben einer TATA-Box und 3 CAAT-Boxen zwei putative „heat shock response elements“ (HSE). Der Aufbau des Promotors ist im folgenden schematisch dargestellt (Abb.:3).



Abb.3: Aufbau des hsp70-Promotors.

Die Reihenfolge der regulatorischen Einheiten innerhalb der 5'UTR sind mit ihrer Sequenz angegeben, die Abstände untereinander sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben.

Die Aktivität und Hitzeinduzierbarkeit des Promotors aus dem Puerto-Ricanischen Stamm wurde von Levy-Holtzmann und Schechter (1995) im heterologen System gezeigt, als sie CHO Zellen mit einem hsp70-CAT Konstrukt transfizierten und entsprechende Enzymaktivitäten nur nach Hitzeschock nachweisen konnten.

Für die vorliegende Arbeit sollten auf der Basis bakterieller Plasmide weitere Reporter-genkonstrukte hergestellt und zunächst auf ihre Funktionalität im heterologen Zellkultursystem getestet werden. Im Anschluss sollte sie dann für das Particle Bombardment von Schistosomen eingesetzt werden. Diese Vektoren sollten regulatorische Elemente einiger Gene aus *S. mansoni* umfassen, die z.B. gewebespezifisch (ER60), konstitutiv (Aktin) oder geschlechtsspezifisch (p14) exprimiert werden.

Bei ER60 handelt es sich um ein Gen aus *S. mansoni*, das für eine Cystein-Protease kodiert. Während der Entwicklung von Schistosomen werden immer wieder Proteinasen synthetisiert, um eine Vielzahl von verschiedenen Aufgaben zu erfüllen (Trap & Boreau, 2000). In Miracidien z.B. spielen sie eine Rolle bei der Invasion in den Zwischenwirt (Yoshino et al., 1993), der Migration innerhalb des Schnecke (Pan,1980) und bei der Transformation zu Muttersporozysten (Lodes & Yoshino, 1989). Weitere Prozesse, an denen Proteinase beteiligt sind, umfassen die Penetration von Cercarien in den Endwirt

(Dalton et al., 1997; Salter et al., 2000), die Aufnahme von Nahrung in Adulten (Zerda et al., 1988; Brindley et al., 1997) und die Bewegung der Eier durch das Gewebe des Endwirtes (McKerrow & Doenhoff, 1988). Jeder dieser Prozesse ist für die Erhaltung des Lebenszyklus des Parasiten essentiell, weshalb Proteinasen vielversprechende Ziele bei der Entwicklung von antiparasitären Medikamenten und Vakzinierungsstrategien sind (McKerrow, 1999).

Aus dem bereits vorgestellten Entwicklungszyklus des Parasiten geht hervor, dass die freilebenden Larven ihren Wirt durch aktive Penetration infizieren. Dieser Prozess ist bislang nur unzureichend verstanden. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass bei der Invasion in den Zwischen-/Endwirt exkretorisch-sekretorische (ES) Moleküle beteiligt sind (Pino-Heiss et al., 1985; Yoshino et al., 1993; Salter et al., 2000). Die Charakterisierung einzelner Gene, die daran beteiligt sind, ist noch nicht sehr weit fortgeschritten. Lokalisationsstudien haben jedoch schon gezeigt, dass ES Moleküle in den lateralen "gland cells" von Miracidien exprimiert werden (Dresden et al., 1986). Daraus wurde geschlossen, dass diese Proteine an der Penetration der Larven in den Zwischenwirt beteiligt sind.

Auf der Suche nach regulatorischen Einheiten eines Gen, dass in allen Geweben konstitutiv exprimiert wird, fiel die Wahl auf Aktin. Dieses Protein ist Bestandteil des Zytoskeletts von eukaryontischen Zellen und hoch konserviert. Etwa 10% der gesamten Zellproteinmasse besteht aus Aktin (Stryer, 1994). Es ist an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, angefangen bei der amöboiden Bewegung von Protozoen und Leukozyten bis hin zur Muskelkontraktion (Steinmetz et al., 1997; Welch et al., 1997; Amann und Pollard, 2001). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit der Bereitstellung immer neuer Aktinmoleküle, die entweder aus dem Abbau vorhandener Filamente stammen oder über Transkription und Translation der Aktinogene neu synthetisiert werden müssen. Während man bei höheren Eukaryonten mehrere Isoformen gefunden hat, die in einer großen Familie von Aktinogenen codiert sind, gibt es bspw. bei der Hefe nur ein Gen (Alberts, 1995). Bei Schistosomen sind zur Zeit zwei Aktin-Gene bekannt (Oliveira & Kemp, 1995), die sich in ihrem Aufbau nur geringfügig unterscheiden. Über die Regulation und die genaue Funktion in Schistosomen ist bislang jedoch nichts bekannt.

Das Eischalenvorläuferprotein-Gen p14 aus *S. mansoni* wurde 1988 von Köster et al. isoliert und charakterisiert. *In-situ* Daten zeigten, dass dieses Gen in den Vitellarien von Weibchen transkribiert wird. Es handelt sich demnach um ein weibchen-spezifisch exprimiertes Gen, das zudem durch den Kontakt mit dem Männchen reguliert wird (Grevelding et al., 1997).

Die regulatorischen Einheiten der vorgestellten Gene sollten mit verschiedenen Reporter genen kombiniert wurden. Die Verwendung des grün fluoreszierende Proteins (GFP) aus *Äquoria victoria* ermöglicht hierbei einen direkten Nachweis der Genexpression im lebenden Organismus (Chalfie et al., 1994). Der Einsatz der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) aus *Escherichia coli* (Jefferson et al., 1986) hat den Vorteil, dass sich dieses Enzym sowohl im Lysat, als auch am fixierten Objekt nachweisen lässt. Eine endogene Aktivität beider Gene konnte in Schistosomen nicht gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob die Methode des Particle Bombardments dazu geeignet ist, adulte und larvale *Schistosoma*-Stadien mit den klonierten Plasmiden zu transformieren. Die Überprüfung eines erfolgreichen Gentransfers sollte molekularbiologisch über den Nachweis der Transkription und der Translation der verwendeten Reportergene erfolgen. Mit Hilfe der Mikroskopie sollte weiterhin festgestellt werden, ob gewebespezifische Expression der Transgene nachweisbar ist.

Eine weitere Möglichkeit der funktionellen Analyse von Genen besteht durch die Transfektion einer primären und/oder immortalisierten Zelllinie des zu untersuchenden Organismus (Rocheffort et al., 1990; Razin & Chedar, 1991; Kern et al., 1994; Picard, 1994; Waller et al., 1998).

Zellen lassen sich in der Regel nur einen begrenzten Zeitraum in Kultur halten, bevor sie absterben (Celis, 1998). Es wird angenommen, dass diese begrenzte Lebensspanne in Verbindung mit der Lebensdauer des Organismus steht, aus der sie isoliert wurden (Hay et al., 1988). Gelegentlich kommt es in der Kultur jedoch zu Mutationen, die aus einer mortalen eine immortale, sich dauerhaft teilende Zelllinie machen. Isolierte Zellen aus Tumoren haben hingegen häufig schon die Potenz zur dauerhaften Teilung in Kultur (McLean, 1993; Rubin, 2001), wobei sich ihr Wachstumsverhalten in der Kultur von einer primären Zelllinie unterscheidet (Jha et al., 1998).

Auch wenn permanente Zelllinien den Nachteil haben, in der Kultur ihr Genom im Vergleich mit dem Wildtyp-Genom häufig zu verändern (Duncan & Reddel, 1997; Tainsky et al., 1995), so sind sie doch ein wichtiges Werkzeug in der Molekularbiologie, nicht zuletzt, da sie sich normalerweise ohne großen Aufwand kultivieren und vermehren lassen. Sie stehen somit im Gegensatz zu vielen Vertebraten fast ständig zur Verfügung. Erkenntnisse, die mit Hilfe von isolierten Zellen gewonnen werden, lassen in gewissem Rahmen Rückschlüsse auf Vorgänge *in vivo* zu.

Permanente Zellkulturen sind bislang weder von Trematoden, noch von anderen Parasiten beschrieben. Neben den etablierten Zelllinien aus Vertebraten und Arthropoden (vgl. <http://www.ATCC.org>) gibt es wenige Zelllinien von anderen Invertebraten (Hansen, 1976) inkl. der helmithischen Zellkulturen aus *Ecchinococcus* (Fiori et al., 1988; Furuya, 1991). Die kontinuierliche Kultivierung von Zellen aus Trematoden und vielen anderen Invertebraten blieb bislang jedoch erfolglos (Weeler & Wheeldon, 1982; Hobbs et al., 1993; Bayne et al., 1994; Bayne, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun erste Versuche durchgeführt werden, eine dauerhafte Kultur schistosomaler Zellen aufzubauen. In der Vergangenheit ist es bei verschiedenen Organismen gelungen, differenzierte Zellen durch den Einsatz von mutierten ras-Genen und dem LargeT-Antigen von SV40 zur erneuten Teilung anzuregen (Land et al., 1983; Ruley, 1983; Amsterdam et al., 1988). Auf der Grundlage des von Andreas Kampkötter (1999) isolierten ras-Homologes aus *S. mansoni* war die Möglichkeit gegeben, einen solchen Ansatz auch zur Immortalisierung von *Schistosoma*-Zellen durchzuführen.

Ras, aufgrund seiner Größe auch p21<sup>Ras</sup> genannt, ist ein Molekül, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt und entscheidende Funktionen bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse übernimmt, inklusive des Zellwachstums, der Differenzierung und der Apoptose (Lowy & Willumsen, 1993; McCormick, 1996; Hall, 1998).

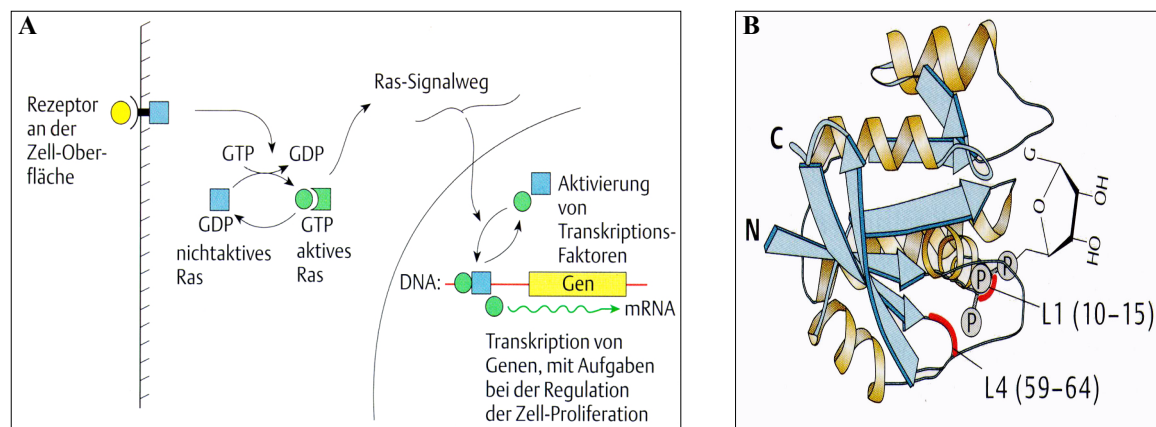


Abb.4: Schematische Darstellung des Ras-Signalweges (A) und der dreidimensionalen Struktur des Proteins (B). L1/L4= „GTP binding domains“. (aus Knippers, 1997)

Es ist bekannt, dass Ras als ein GTPase-Schalter funktioniert, der von vielen extrazellulären Stimuli angeregt werden kann und daraufhin den cytoplasmatischen Raf-MEK-ERK Signaltransduktionsweg aktiviert (Shields et al., 2000). Eine schematische Darstellung des Ras-Signalweges ist in Abb.4A gezeigt. Auf einen äußeren Stimulus hin wird Ras durch die Aufnahme eines GTP in seinen aktiven Zustand versetzt und ist so in der Lage,

weitere Moleküle einer Signalkaskade über Phosphorylierungen zu aktivieren (Lowy & Willumsen, 1993). Durch die nachfolgende Hydrolyse des Nukleotids wird Ras unter Mit Hilfe anderer Moleküle (z.B. GAP, GTPase activating protein) wieder in seinen inaktiven Zustand zurückversetzt. Zu der großen Familie der 21 kDa Ras-Moleküle gehören u.a. H-/K-/N-Ras, sowie andere homologe Proteine: R-/M-Ras oder TC21, Rap und Ral (Ayllon & Rebollo, 2000). Mutierte ras-Gene spielen bei der Cancerogenese vieler spontan auftretender Tumore eine entscheidende Rolle (Bos, 1989; Chin et al., 1999). Hierbei hat sich herausgestellt, dass bei verschiedenen Tumoren immer wieder Punktmutationen an den Aminosäurepositionen 12, 13 und 61 auftreten (Barbacid, 1987). Betrachtet man die Struktur des Proteins (Abb.4B), so stellt man fest, dass diese Aminosäuren an der Bindung des Nukleotids (GTP) beteiligt sind. Unter dem Einfluss einer solchen Mutation kommt es zu einer verminderten GTP Hydrolyse, so dass Ras in seinem aktiven Zustand verbleibt und es letztlich zu einem dauerhaften Proliferationssignal für die Zelle kommt (de Vries et al., 1996).

Im Gegensatz zum eukaryontischen ras ist das LargeT-Antigen ein virales Gen. Die Transformationseigenschaft dieses Moleküls beruht u.a. auf der Fähigkeit, die Tumorsuppressorgene p53 und pRB zu binden und sie somit zu inaktivieren (Srinivasan et al., 1989; Zalvide & DeCaprio, 1995). Das LargeT-Antigen wurde bereits mehrfach genutzt, um Zellen zu transformieren, wobei es zum Einsatz dieses Gens alleine (Hofmann et al., 1992; Cavender et al., 1995) oder in Kombination mit anderen genetischen Elementen kam (Amsterdam et al., 1988; Hahn et al., 1999). Dass die Interaktion mit den Tumorsuppressorgenen jedoch nicht ausreicht, um Zellen zu undifferenziertem Wachstum anzuregen, haben Versuche mit E6/E7 aus einem humanen Pappilomavirus gezeigt, die die gleiche Bindungsaffinität an p53/pRB besitzen, allerdings nicht zur Transformation von Fibroblasten führten (Morales et al., 1999). Inzwischen sind eine Reihe von Domänen innerhalb des LargeT-Proteins und dessen Bindungspartner in der Zelle identifiziert worden (DeCaprio, 1999), welche für die Transformation einer Zelle verantwortlich sein können.

Die in dieser Arbeit verfolgten Ansätze zur Immortalisierung von *Schistosoma*-Zellen umfassten zunächst die Mutation des ras-Homologs an zwei Aminosäurepositionen (G12V und Q61L). Anschließend sollten Konstrukte kloniert werden, die den ORF des Wildtyp (Wt)- oder eines mutierten ras und/oder des LargeT-Gens beinhalten. Isolierte Zellen aus verschiedenen Stadien wären dann die Grundlage für Transfektionsexperimente mit den beschriebenen Vektoren, um schließlich eine dauerhafte Zelllinie zu erhalten.

## 2. MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Material

#### ❖ 2.1.1 Lösungen und Puffer

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

Acrylamidlösung (30%, PAA):	290 g Acrylamid, 10 g N,N'-Methylenbisacrylamid, 600 ml dH <sub>2</sub> O, bei 37°C lösen, dH <sub>2</sub> O ad 1 l, filtrieren
Anodenpuffer:	200 mM Trisbase pH 10.4, 20% MeOH
Antikörperblockierungslösung:	3-7% BSA in 1x PBST
Antikörperlösung:	1% BSA in 1x PBST
Antikörperwaschlösung (1x PBST):	1x PBS, 0.05% Tween 20
Assay Puffer (2x):	200 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7.3), 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM β-Mercaptoethanol, 1.33 mg/ml para-Nitrophenol-β-D-Glucuronid
ATV:	0.025% (w/v) N-acetyliertes Trypsin, 0.05% (w/v) EDTA in PBS <sub>def</sub> (s.u.), sterilfiltriert
Bradford-Reagenz:	50 mg Coomassiblau (Serva Blau G) in 25 ml 96% Ethanol lösen, 50 ml 85% Phosphorsäure, mit dH <sub>2</sub> O ad 100 ml (Lagerung bei -20°C)
BSS-Lösung:	50 mM NaCl, 2mM KCL, 0.5 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O, 1.8 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 3.6 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 0.6 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0.1% Glucose
DNA-Blaumarker:	50% Glycerin, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylen Cyanol FF in 1x TAE
DNA-Extraktionspuffer:	20 mM Tris/HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 500 µg/ml Proteinase K
dH <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> :	0.1% Diethylpyrocarbonat in dH <sub>2</sub> O, 1-12 h rühren, anschließend autoklavieren
Hybridisierungslösung:	6x SSPE, 0.5% SDS, 100 µg/ml denaturierte Heringsperma-DNA, 5x Denhardt's (Prähybridisierung) in dH <sub>2</sub> O



Kathodenpuffer:	40 mM $\epsilon$ -Aminocaprönsäure, 25 mM Trisbase pH 9.4, 20% MeOH
10x MOPS:	0.2 M 3-(N-Morpholino)propane-Sulfonsäure, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O (pH 7.0)
10x PBS:	1.37 M NaCl, 27 mM KCL, 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in dH <sub>2</sub> O (pH 7.1)
PBS <sub>def</sub> :	1x PBS mit 100.000 U Penicillin G und 100 mg Streptomycinsulfat/l
10x Ponceau Rot S:	2% Ponceau Rot S, 30% Sulfosalizylsäure 30% Trichloressigsäure in dH <sub>2</sub> O
RNA-Blaumarker:	900 $\mu$ l deionisiertes Formamid, 100 $\mu$ l 10x MOPS, 161 $\mu$ l 37% Formaldehyd, 20 $\mu$ l Bromphenolblau, 20 $\mu$ l Xylen Cyanol FF, 10 $\mu$ l EtBr (10 mg/ml)
4x Sammelgelpuffer:	0.5 M Trisbase pH 6.8, 0.4% SDS in dH <sub>2</sub> O
10x SDS-Puffer:	144.6 g Glycin, 30 g Trisbase, dH <sub>2</sub> O ad 1 l
1x SDS-Laufpuffer:	200 ml SDS-Puffer, 20 ml SDS (10%), dH <sub>2</sub> O ad 2 l
SDS-Blaumarker:	1% Bromphenolblau in 1x SDS-Laufpuffer
SDS-Probenpuffer:	8 ml Glycerin, 4 ml $\beta$ -Mercaptoethanol, 12 ml SDS (20%), 16 ml 4x Sammelgelpuffer
20x SSPE:	3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat in dH <sub>2</sub> O (pH 7.1)
50x TAE:	242 g Trisbase, 57.1 ml Eisessig, 100 ml EDTA (0.5M, pH 8.0), dH <sub>2</sub> O ad 1 l
TEEL-Puffer:	50 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA (pH 7-8 mit Essigsäure einstellen)
4x Trenngelpuffer:	1.5 M Trisbase (pH 8.8), 0.4% SDS in dH <sub>2</sub> O

#### ❖ 2.1.2 Medien und Zusätze

LB-Medium:	1.0% (w/v) Bacto Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 0.5 (w/v) NaCl, pH 7.5, autoklaviert
LB-Agar:	1.8% (w/v) Bactoagar in LB-Medium, autoklaviert und gegossen
Ampicillin:	Stammlösung 100 mg/ml, Endkonz. 100 $\mu$ g/ml
Tetracyclin:	Stammlösung 12.5 mg/ml, Endkonz. 12.5 $\mu$ g/ml

M199:	10 g M199 (Gibco BRL), 20 ml Tris/HCl (pH 7.4, 0.5 M), 1 g Glucose, 2.2 g NaHCO <sub>3</sub> , dH <sub>2</sub> O ad 1 l; sterilfiltriert
D-MEM:	10 g D-MEM (Gibco BRL, #31600), 3.5 g Glucose, 3.7 g NaHCO <sub>3</sub> , 100.000 U Penicillin G, 100 mg Streptomycinsulfat, pH 7.2, dH <sub>2</sub> O ad 1 l; sterilfiltriert; 10% FCS zugeben
<i>Bge</i> -Medium:	55 ml Schneiders <i>Drosophila</i> Medium (Gibco BRL), 6.7 ml Lactalbumin (50x, Hydrolysat), 325 mg Galactose, ABAM (1:1000), 10% FCS (s.u.), dH <sub>2</sub> O ad 250 ml, sterilfiltriert
<i>S.m.</i> -Kulturmedium:	M199 mit 1% HEPES (pH 7.4, 1M), 1% ABAM, 10% NCS/FCS
SM-Medium:	<i>Schistosoma</i> Zellkulturmedium nach Hobbs et al. (1993)
Pen/Strep:	10.000 U/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycinsulfat
ABAM:	Antibiotikum/Antimycotikum (Sigma)
NCS/FCS:	neugeborenen/fötales Kälberserum (Gibco BRL/Invitrogen/Sigma); FCS für <i>Bge</i> -Medium: hitzeinaktiviert (Sigma # F-2442)

### ❖ 2.1.3 Enzyme und Molekulargewichtsstandards

Enzyme: Alkalische Phosphatase, Proteinase K, Restriktionsendonukleasen, *Taq*. Polymerasen und weitere modifizierende Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen und nach Angaben der Hersteller eingesetzt: Appligene, Boehringer, Fermentas, Genecraft, Gibco BRL, Invotrogen, MBE, New England Biolabs, Novagene, PeqLab, Pharmacia, Promega, Roche, Sigma, Stratagene

Molekulargewichtsstandards: 1 kb-Leiter (Gibco BRL), 10 kDa-Leiter (Gibco BRL)

### ❖ 2.1.4 Primer

Die im Folgenden angegeben synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen BioTez und MWG hergestellt. Die Sequenzen sind jeweils in 5' - 3' Orientierung angegeben.

GFP-spez5:	tag atg gtg atg tta atg ggc
GFP-spez3 ( <i>GFP4</i> ):	cat gcc atg tgt aat ccc ag
hsp70-GFP3:	tag gttagt cga cct cct cc
60-GFP-5:	act cta gac cat ggg taa agg aga aga ac

60-GFP-3 (*GFP3*): acc tgc aga tcc tta ttt gta tag ttc atc c  
 GFP5: ggg aac tac aag aca cgt gc  
 60-GFP-Bam3: ctg gat cct tat ttg tat agt tc  
 GUS-5: gtt ctg cga cgc tca cac c  
 ER60-GUS: caa cta aaa gtt gaa ata cat cac  
 GUS-spez5: gag tat tgc caa cga acc gg  
 GUS-spez3: agt tca tgc cag tcc agc g  
 839-Ksp5: cac cgc gga agc ttt ttc ttc agg ttg c  
 839-Xba3: cct cta gaa taa ggg act gac cac cc  
 ER60-1750-5: cca aca gac gac tct agt gc  
 Eco-Act3/5: cgg aat tca ttt act gaa att gct tat cc  
 Kpn-Act3/3: cgg gta cct ggt aaa tat atg cat tta ttg  
 Actin/Ksp5: acc gcg gct ggg caa aca gcc  
 Actin/Xba3: atc tag aga tga tga gac act tg  
 Nco-GUS-5: acc atg gat gtt acg tcc tgt aga acc c  
 GUS-3-Bam: cgg atc ctt gat tca ttg ttt gcc tcc c  
 HSE 2 Del 5: cgt ctg atg gtt gag tgt g  
 HSE Del 3: tct aga aga acc ctt cca cg  
 HSE ½ Del 5: gta cgt tct acg tga aaa gg  
 HSE 1 Del 3: gac caa tgg cct gtc gac  
 Luci-5: agc cac cat gga aga cgc c  
 Luci-3-Bam: cgg gat cct tac acg gcg atc ttt ccg c  
 Mut 124: gtt gga gct gtt gga gtt ggc  
 Mut 123: gcc aac acc aac agc tcc aac  
 Mut 614: act gct ggt cta gag gaa tac  
 Mut 613: cta ttc ctc tag acc agc ag  
 Ras-60-5: cct cta gaa tga ctg agt aca agt tag ttg  
 Ras-60-3: ccg gat cca ttc att gta tac aac att ttc g  
 Ras-5: atg act gag tac aag tta gtt g  
 Ras-3: ttc att gta tac aac att ttc g  
 GFP-ras-5: cag gaa tcc gtg atc gag c  
 GFP-ras-3: ttt gta tag ttc atc cat gcc  
 Ras-TQ5: ccg gta ccg caa tag ttt ctt atg act gag  
 Ras-TQ3kurz: ccg aat tcc tca ttg tat aca aca ttt teg ttt gc

Ras-TQ3lang:        ggg aat tcc tca tga taa aac aca ttt tgg ttt gcg ctt ttt acg  
SV40 ORF-5:        tat cta gaa tgg ata aag ttt taa aca gag  
SV40 ORF-3:        agg atc ctt tat gtt tca ggt tca ggg  
M13:                gta aaa cag cgg cca gt  
M13 rev:            aac agc tat gac cat g  
T3:                 aat taa ccc tca cta aag gg  
T7:                 taa tac gac tca cta tag gg

#### ❖ 2.1.5 Plasmide

pBluescript SK- (Fa. Stratagene)

pUC 18 (Pharmacia)

pSTBlue 1 (Fa. Novagene)

pGEM Teasy (Fa. Promega)

#839: ER60 Promotor (*Hinc* II/*Hind* III Fragment aus gN11)

#923: ER60 3'UTR in pSTBlue 1

#944: hsp70 Promotor in pUC18

#959: pSVT7-GFP

#972: p14-GFP-p14

#974: hsp70-GFP-hsp70

#975: GFP-hsp70

#981: hsp70-GUS-hsp70

#982: ER60-GUS-ER60

ras 18/2

ras 18/10

#### ❖ 2.1.6 Antikörper

Maus-anti-GFP (IgG, Chemicon)

Ziege-anti-Maus (gesamtes Molekül, Fc spezifisch), AP gekoppelt (IgG, Sigma)

#### ❖ 2.1.7 Bakterien, Zelllinien

Bakterienstämme: DH5 $\alpha$  : *E.coli*-Stamm nach Hanahan (1983)

XL1-Blue: *E.coli*-Stamm nach Bullock et al. (1987)

Superkompetente XL1 Blue ( $>10^9$  cfu/ $\mu$ g): Fa. Stratagene

NovaBlue: Fa. Novagene

Zelllinien: CHO: epitheliale Zelllinie, isoliert aus dem Ovar von *Cricetulus griseus*; ATCC CCL-61  
 COS-7: Fibroblasten-ähnliche Zelllinie, isoliert aus der Niere von *Cercopithecus aethiops*; ATCC: CRL-1651  
 Bge: embryonale Zelllinie aus *Biomphalaria glabrata*; ATCC: CRL-1494

#### ❖ 2.1.8 Computersoftware und Internetprogramme

Software: Adobe (Acrobat 4.0, Photoshop 5.5), Excel 97, PC-Clone, PowerPoint 2000, Word 97

Internet: PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>  
 SIT: <http://www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html>  
 Alignmen by T. Downs: <http://prodes.toulouse.inra.fr./multalin/multalin.html>  
 ExPasy: <http://www.expasy.ch/sprot/>

## 2.2 Methoden

### ❖ 2.2.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Die Herstellung und/oder Transformation kompetenter Bakterien wird wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben (DH5 $\alpha$ , XL1 Blue) durchgeführt, oder nach Anleitung des Herstellers (Superkompetente Zellen, NovaBlue).

### ❖ 2.2.2 Isolation von Nukleinsäuren

#### ◆ 2.2.2.1 Extraktion genomischer DNA aus *S. mansoni*

Für die Isolation genomischer DNA aus Adulten oder aus Larven wird das Gewebe mit Hilfe des „ULTRA TURRAX T8“ (IKA Labortechnik) in ca. 360  $\mu$ l Extraktionspuffer aufgeschlossen. Nach Zugabe von 40  $\mu$ l SDS (10%) findet eine Inkubation für 3-4 h bei 37°C statt. Die Aufreinigung der DNA erfolgt über Phenol- und Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung der DNA durch 7.5 M NH<sub>4</sub>Ac und eiskaltem EtOH (96%) für mindestens 20 min bei -20°C. Die nachfolgende Zentrifugation (20 min, 13.000 rpm) sollte bei 4°C durchgeführt werden. Das DNA-Pellet wird danach mit 70% EtOH gewa-

schen (10 min, 13.000 rpm, 4°C) und im Anschluss getrocknet, bevor es in dH<sub>2</sub>O oder 5 mM Tris (pH 8.0) resuspendiert wird.

Die Präparation genomischer DNA aus dem Durchfluss der für die RNA-Extraktion verwendeten Säulen beginnt mit der Zugabe von 500 µl EtOH (96%) und einer Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C. Das entstandene Pellet wird getrocknet und in 400 µl 1x PBS resuspendiert, bevor 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben werden und der Ansatz für 3-4 h bei 37°C inkubiert wird. Die anschließende Aufreinigung erfolgt wie oben beschrieben.

#### ◆ 2.2.2.2 Extraktion von Total-RNA aus *S. mansoni*

Die Isolation der gesamten RNA aus Adulten und Larven erfolgt mit Hilfe der Kits RNeasy (Qiagen) oder RNA II (Macherey & Nagel) nach Angaben der Hersteller.

#### ◆ 2.2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien durch alkalische Lyse

Diese Methode der Isolation von Plasmiden aus Bakterien ist bei Sambrook et al. (1989) beschrieben und wird entsprechend durchgeführt. Abweichend werden nach dem Resuspendieren des Pellets 0.5 µl RnaseA (10 mg/ml) zugegeben.

#### ◆ 2.2.2.4 Säulen-Präparation von Plasmid-DNA

Bei diesem Verfahren handelt es sich um kommerziell erhältliche Kits verschiedener Anbieter zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien. Die Isolation der Plasmide erfolgt jeweils nach den Angaben der Hersteller

#### ❖ 2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Unter Anwendung des Lambert Beer'schen Gesetzes ( $C = E \times \varepsilon^{-1} \times d^{-1}$ , C: Konz., E: Extinktion,  $\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient, d: Schichtdicke (1 cm)) wird die Konzentrationen nach photometrischer Messung bei 260 nm bestimmt. Hierbei werden folgende Näherungswerte von  $\varepsilon$  eingesetzt:

ds DNA: 1 OD<sub>260</sub> = 50 µg/ml

RNA: 1 OD<sub>260</sub> = 40 µg/ml

Oligonukleotide: 1 OD<sub>260</sub> = 33 µg/ml

#### ❖ 2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

##### ◆ 2.2.4.1 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von verschiedenen DNA Fragmenten erfolgt durch horizontale Agarosegele in 1x TAE, wobei die Konzentration der Agarose zwischen 0.7 und 2.0% in 1x TAE liegt. Zur späteren Visualisierung unter UV-Licht, wird EtBr in einer Konzentration von 0.5 µg/ml hinzugegeben. Die Elektrophorese wird bei 0.5 – 5 V/cm durchgeführt. Die Gele werden mit Hilfe einer Video-Dokumentationsanlage oder einer Plaroidkamera dokumentiert.

##### ◆ 2.2.4.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Um eine korrekte Größendarstellung der RNA im Gel zu erreichen, werden die Proben zu Beginn erhitzt, damit Sekundärstrukturen aufgehoben werden. Die denaturierenden Gele werden in der Regel 1.2%ig in 1x MOPS mit 37% Formaldehyd hergestellt. Als Laufpuffer wird 1x MOPS verwendet. Die Anfärbung der Proben erfolgte mit EtBr, welches sich im Blaumarker befindet, der den Proben vorher zugegeben wird (1 Vol.). Die weitere Vorgehensweise ist oben beschrieben (s. 2.2.4.1).

#### ❖ 2.2.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Das Ausschneiden der gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wird mit einem sauberen Skalpell so selektiv wie möglich durchgeführt. Die anschließende Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgt mit den kommerziell erhältlichen Kits der Firmen Qia-gen, Invitex oder Macherey & Nagel unter Beachtung der Herstellerangaben.

#### ❖ 2.2.6 Enzymatische Reaktionen an DNA

Restriktionsverdau, (De-)Phosphorylierung und Ligation von genomischer DNA und DNA-Fragmenten, sowie das Auffüllen einzelsträngiger DNA-Überhänge, um glatte Enden zu erhalten, werden mit den unter 2.1.3 angegebenen Enzymen durchgeführt. Dabei werden die Angaben des Herstellers beachtet oder Protokolle aus Sambrook et al. (1989) bei der Durchführung berücksichtigt.

#### ❖ 2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt nach der Methode von Sanger mit Hilfe des „T7 Sequencing Kits“ von Pharmacia. Die Herstellung der Sequenzgele und die Durchführung sind bei Kapp (2000) beschrieben.

Alternativ werden Sequenzierungen automatisiert am BMFZ der HHU Düsseldorf durch Fr. Dr. Scheuring mit dem ABI (Applied Biosystems) durchgeführt.

#### ❖ 2.2.8 DNA Transfer auf Nylonmembran (Southern Blot)

Als Vorlage für diese Experimente dient das von Sambrook et al. (1989) beschriebene Protokoll. Zunächst wird das Agarosegel mit der zu transferierenden DNA für 10 min depuriniert (0.2 M HCl), anschließend erst 2x 15 min denaturiert (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) und danach 2x 15 min neutralisiert (1 M Tris/HCl (pH 7-8), 1.5 M NaCl). Der Kapillarttransfer erfolgt auf eine Nylonmembran (Hybond N) mit 10x SSPE als Transferpuffer. Nach 12-16 h wird die Membran kurz getrocknet und die DNA durch backen bei 80°C (30 min) und/oder „cross-linken“ (UV-Behandlung) auf dieser fixiert.

#### ❖ 2.2.9 Radioaktive Markierung von DNA über „random priming“

Die Markierung wird mit Hilfe des „random primed DNA labeling Kit“ der Fa. Boehringer und 5 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP (50 µCi, 3000 Ci/mmol) nach Anleitung des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Aufreinigung der Sonde erfolgt über eine Sephadex G50 Säule und die Bestimmung der Aktivität ( $>10^7$  cpm) mittels eines Szintillationszählers.

#### ❖ 2.2.10 Hybridisierung und Detektion

Die markierte Probe und die filtergebundene DNA werden zur Hybridisierung ü.N. bei 42°C in entsprechendem Puffer mit Formamid inkubiert (Sambrook et al., 1989). Die nachfolgenden Waschungen werden unter stringenten Bedingungen durchgeführt (hier: letzte Inkubation bei 60°C und 0.5x SSC/0.025% SDS). Die Detektion der spezifischen Signale erfolgt über die Autoradiographie.

#### ❖ 2.2.11 Reverse Transkription (RT)

Bei der RT wird mRNA entweder aus Total-RNA (250-1000 ng) oder PolyA-RNA (50 ng) durch die reverse Transcriptase (bspw. MMLV/AMV) in Anwesenheit eines Oligo dT- oder eines spezifischen Primer in cDNA umgeschrieben (Sambrook et al., 1989).

Für die RT Reaktion zur Detektion der GFP Transkripte in transgenen Schistosomen werden 250-500 ng Total-RNA mit 2 µl spez. 3`Primer (GFP3, 1 µM) für 5 min bei 70°C inkubiert. Die Zugabe der nachfolgenden Komponenten erfolgt auf Eis: 5 µl 5x Reaktionspuffer, 2.5 µl DTT (0.1 M), 2.5 µl dNTP (10 mM), 1 µl RNasin (Promega), 2 µl 50% Glycerin, 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript II, Gibco BRL; 200 U) ad 25 µl mit



dH<sub>2</sub>O. Danach wird der Ansatz für 60 min bei 50°C zur cDNA-Synthese inkubiert und am Schluss 10 min bei 70°C denaturiert. 2.5-5 µl der Reaktion wird dann in die anschließende PCR eingesetzt (s. 2.2.12).

#### ❖ 2.2.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen werden in einem 25 µl Ansatz folgende Komponenten zusammenpipettiert und mit 40 µl Mineralöl überschichtet: 0.1-50 ng DNA oder 1-2/10 der RT-Reaktion (Template), je 2 µl spez. Primer (10 µM), 2.5 µl 10x Reaktionspuffer (inkl. MgCl<sub>2</sub>), 2.5 µl dNTP (je 2mM) ad 24.5 µl mit dH<sub>2</sub>O. Nach einer Inkubation des Ansatzes für 3 min bei 95°C und 1 min auf Eis werden 0.5 µl Enzym (2.5 U *Taq* Polymerase) zugegeben. Die Vervielfältigung der spezifischen DNA erfolgt im Thermocycler (Biozym) mit 30-35 Zyklen und folgendem Temperaturprofil: 45 sec 93°C, 45-60 sec Primer-Annealing, 30 sec-10 min 72°C. Die Annealing-Temperatur der Primer errechnet sich nach der Formel  $T_m = 4(A/T) + 2(G/C)$  und ist nur als Näherungswert zu verstehen. Am Ende der Amplifikation erfolgt die Überprüfung durch ein Agarosegel.

Bei der (RT-)PCR zur Detektion der GFP Transkripte wird eine „touch down“ PCR mit den Primern GFP5/GFP3 und folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 2x: 45 sec 93°C, 60 sec 68°C, 45 sec 72°C; 2x: 45 sec 93°C, 60 sec 67°C, 45 sec 72°C; 2x: 45 sec 93°C, 60 sec 66°C, 45 sec 72°C; 29x: 45 sec 93°C, 60 sec 65°C, 45 sec 72°C; 5 min 72°C.

#### ❖ 2.2.13 Isolation von Gesamt-Protein aus *S. mansoni*

Die Präparation von Total-Protein aus Schistosomen erfolgt durch den Aufschluss des Materials mit dem ULTRA-TURRAX (3x 15 sec) in SDS-Probenpuffer (inkl. 10% Complete Mini, Roche; 1% PMSF, Clontech). Danach werden die Proben 2x mit Ultraschall (ca. 100 W) für 15 sec behandelt und anschließend 10 min gekocht, bevor die Proteine durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, 4°C) von den Zellresten getrennt werden. Die Proben können dann entweder bei -70°C eingefroren oder direkt zur SDS-Gelelektrophorese eingesetzt werden.

#### ❖ 2.2.14 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-Page)

Die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wird wie bei Lämmli (1970) beschrieben durchgeführt. Die Konzentration des Sammelgels liegt bei 4.5% PAA, die des Trenngels bei 10-15% PAA. Die Auftrennung erfolgt entweder bei 150 V für 1-4 h oder bei 30 V ü.N..

### ❖ 2.2.15 Proteintransfer auf Membranen (Western Blot)

Der Western Blot wurde im „semi dry blot“-Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984) bei 0.8 mA/cm<sup>2</sup> für 1-3 h durchgeführt. Im Anschluss können die Proteine mit Hilfe einer Ponceau-Färbung (Färben: 2-4 min mit 1x Ponceau Rot S, Entfärben: dH<sub>2</sub>O) sichtbar gemacht und der Transfer kontrolliert werden.

### ❖ 2.2.16 Immunoblot

Die Inkubation der Membran mit der Antikörperlösung (1:2000 Anti-GFP Erstantikörper) wird nach 1 h Blockierungsreaktion (3-7% BSA in PBST) begonnen und erfolgt ü.N. bei 4°C. Danach wird der Filter 3x mit 1x PBST für 15 min gewaschen und mit dem Zweitantikörper (1:20.000 Ziege-anti-Maus) für 2 h bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (2x PBST, 1x PBS) werden spezifische Signale mit Hilfe des Chemilumineszenz-Verfahrens (CDP-Star, Amersham) detektiert.

### ❖ 2.2.17 Laborzyklus und Zucht von *S. mansoni*

#### ◆ 2.2.17.1 Endwirtinfektion und Isolation adulter Schistosomen

Als Endwirte werden syrische Goldhamster (aus der zentralen Tierversuchsanstalt der HHU) verwendet und durch Baden in cercarienhaltigem Wasser (2000 Cercarien/Wirt) für 45 min bei 32°C infiziert (Dettmann et al., 1989). Die Entwicklung der Adulten erfolgt innerhalb der nächsten 42-49 Tage. Danach werden die Würmer über Perfusion aus den Hamstern gewonnen und zur *in vitro* Kultur eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### ◆ 2.2.17.2 Gewinnung von Larvenstadien

##### A: Miracidien

Die Lebern infizierter Hamster werden zunächst mit einer Schere in 1x PBS grob zerkleinert und anschließend mit einem Mixer homogenisiert. Der Ansatz wird für 15 min bei 5000 g zentrifugiert und das Pellet danach mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9%) gewaschen. Im Anschluss an eine erneute Zentrifugation (s.o.) wird das Pellet in eine abgedunkelte Schlupfflasche (Erlenmeyerkolben mit seitlichem Steigrohr) überführt und diese mit warmem Leitungswasser gefüllt. Die nun schlüpfenden Miracidien bewegen sich phototaktisch in Richtung einer Lichtquelle, die zuvor auf das Ende des Steigrohrs gerichtet wurde. Dort können die Larven gesammelt werden und zur Infektion des Zwischenwirtes oder zur Generierung von Muttersporozysten verwendet werden.

## B: Cercarien

Infizierte Schnecken werden 3-4 Wochen nach der Penetration der Miracidien unter abgedunkelten Bedingungen gehalten und nach 5-6 Wochen einzeln in 12-well Platten illuminiert. Innerhalb der ersten 3-4 h verlassen die Cercarien phototaktisch gesteuert die Schnecke und können gesammelt und für die Endwirtinfektion verwendet werden.

### ❖ 2.2.18 Schistosoma in-vitro Kultur

#### ◆ 2.2.18.1 Adulte Schistosomen

Die aus der Perfusion der Hamster gewonnen Würmer werden mit Hilfe einer Federstahlpinzette unter dem Binokular nach Geschlechtern getrennt und jeweils 25-30 Einzeltiere oder Paare in eine 60mm Petrischale mit sterilem Medium M199 (inkl. FCS, ABAM und HEPES) überführt. Die Würmer werden dann für ca. 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die nachfolgende Waschung erfolgt durch Umsetzen der Würmer in eine neue, sterile Schale mit frischem, vorgewärmten Medium. Es schließt sich eine erneute Inkubtion für 1h bei gleichen Bedingungen an. Diese Waschprozedur wird dann noch einmal durchgeführt und die Würmer anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Bei Langzeitkulturexperimenten (bis zu 6 Wochen) werden die Würmer alle 2-3 Tage auf Kontamination überprüft. Tote Tiere werden entfernt und das Medium einmal pro Woche erneuert.

#### ◆ 2.2.18.2 *In-vitro* Generierung und Kultivierung primärer Muttersporozysten

Die Generierung der Sporozysten erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von Coustau et al. (1997). Zu diesem Zweck werden Miracidien aus dem Hals der Schlupfflasche in ein 15 ml Falcon überführt und das Gefäß mit BSS (inkl. ABAM 1:50) aufgefüllt. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert, während dessen die Miracidien auf den Grund des Falcons sinken. Der Überstand wird abgenommen und durch frisches BSS/ABAM ersetzt. Nach weiteren 30 min auf Eis wird diese Prozedur 2x wiederholt. Bei der letzten Waschung wird auf das ABAM verzichtet. Anschließend wird der Überstand bis auf 400-800 µl entfernt und der Miracidien-Titer bestimmt. Zum Schluss werden 2000-4000 Individuen unter der Sterilbank in 5 ml „Bgecell-konditioniertem Medium“ (inkl. ABAM 1:1000) aufgenommen und in einem sterilen 50 ml Falcon bei 25°C bis zur weiteren Verwendung inkubiert. Innerhalb von 12-16 h verlieren die Miracidien als Folge der Transformation zu Muttersporozysten ihr Wimpernepithel. Die so erzeugten Larven können unter diesen Be-

dingungen etwa 1 Woche kultiviert werden, wobei das Medium alle 2-3 Tage erneuert werden sollte.

❖ 2.2.19 Particle Bombardment von *S. mansoni* mit der Helios Gene Gun©

Die Experimente mit der Gene Gun wurden an der Universität Gießen in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Jackstadt durchgeführt und sind unter 3.1.4 beschrieben.

❖ 2.2.20 Particle Bombardment mit der PDS 1000©

◆ 2.2.20.1 „DNA coating“

Die Vorbereitung der Goldsuspension erfolgt nach Angaben des Herstellers und wird auf 60 mg Au/ml 50% Glycerin eingestellt.

Zur Beladung der Goldpartikel mit Plasmid-DNA wird die Goldsuspension für 5 min auf höchster Stufe gevortext. Bei niedriger Geschwindigkeit erfolgt die Zugabe von 5-25 µg DNA (0.5-1 µg/µl), 50 µl CaCl<sub>2</sub> (2.5M) und 20 µl Spermidin (0.1/0.05 M). Anschließend wird das Gemisch erneut für 5 min auf höchster Stufe gevortext. Danach wird die Munition für 1 min bei RT inkubiert und kurz zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Goldpellet 2x mit 100% EtOH (wasserfrei) gewaschen: kurz vortexen, sedimentieren lassen und zentrifugieren). Zum Schluß wird das Pellet in 50 µl 100% EtOH vollständig resuspendiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Dieser Ansatz reicht für 5 Bombardmentexperimente (10 µl Suspension pro Beschuss).

◆ 2.2.20.2 Particle Bombardment Prozedur

Nach der Installation des Gerätes unter der Sterilbank, wird die Munition vorbereitet, indem 10 µl des DNA/Goldgemisches auf einen „Macrocarrier“ pipettiert werden. Ist der EtOH verflogen, kann die Munition in das Gerät wie im Handbuch des Herstellers beschrieben eingebracht werden.

Für den Beschuss adulter Würmer wird zunächst das Medium zu 80% entfernt und die Tiere mit Hilfe einer Federstahlpinzette in der Mitte der Petrischale gesammelt. Sind alle Würmer positioniert, wird das restliche Medium komplett abgesaugt. Die Schale wird dann in der Vakuumkammer auf Stufe 1 zentral fixiert und die Kammer geschlossen. Nachdem das Vakuum angelegt wurde, erfolgt der Einstrom des Heliumgases, bis es zum Zerplatzen der „rupture disc“ kommt. Das Vakuum wird entlassen, die Schale mit den Würmern entnommen und 5-6 ml Medium hinzu gegeben. Die Verteilung der Goldpartikel kann nun unter mikroskopischer Kontrolle begutachtet werden. Etwa 1 h nach dem Bombardment

werden die beschossenen Tiere durch Überführen in steriles Medium gewaschen und unter Standardbedingungen bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

Für den Beschuss von Larven werden diese mit einer Pasteurpipette in die Mitte einer kleinen Petrischale überführt und dann im Gerät positioniert. Nach dem Bombardment wird konditioniertes *Bge*-Medium zugegeben und die Larven bis zur weiteren Verwendung bei 25°C inkubiert oder zur Infektion von Schnecken eingesetzt.

#### ❖ 2.2.21 Zellkultur

##### ◆ 2.2.21.1 COS-7 und CHO Zellen

Die Kultivierung dieser mammalischen Zelllinien erfolgt in „Dulbecco`s modified eagle`s medium“ (D-MEM) mit 10% FCS und 25/75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Beide Zelllinien wachsen adherent und müssen zum Passagieren trypsinisiert werden. Dazu wird der konvluente Monolayer mit 1x PBS<sub>def</sub> gewaschen, und die Zellen werden durch die Zugabe von 400 µl/1.3 ml ATV und für 5-10 min bei 37°C vom Boden der Flasche gelöst. Im Anschluss werden 5-10 ml Medium hinzu gegeben und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Die Zelldichte für die weitere Kultivierung sollte dabei zwischen 1x und 3x 10<sup>5</sup> liegen. Daraus resultieren 4-7 Tage zwischen den einzelnen Passagen, wobei die Zellen nicht häufiger als 15 mal umgesetzt werden sollten.

Zur Erhaltung der Zelllinien werden diese nach der 10.-12. Passage eingefroren und bei Bedarf revitalisiert. Für die Kryo-Konservierung werden die Zellen (2x 10<sup>6</sup>/ml) in Einfriermedium (40% FCS, 40% DMSO, 20% Medium; Angaben in v/v) überführt und zunächst bei -70°C und anschließend in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert. Die Revitalisierung erfolgt durch Auftauen bei 37°C. Danach werden die Zellen gewaschen (Zugabe von 10 ml Medium ohne FCS, Zentrifugation 800 rpm 5 min) und in 5 ml Medium inkl. FCS resuspendiert, bevor sie in eine 25 cm<sup>2</sup> Flasche gegeben und unter Standardbedingungen inkubiert werden. 24 h später wird dann ein Mediumwechsel vorgenommen, um verbliebene DMSO-Reste zu entfernen.

##### ◆ 2.2.21.2 *Bge*-Zellen

Diese Invertebraten-Zelllinie wird bei 25°C in *Bge*-Medium (s. 2.1.2) kultiviert. Auch diese Zellen wachsen adherent, müssen jedoch nicht trypsinisiert werden, sondern lassen sich mit Hilfe einer Pipette vom Boden der Kulturflasche herunterspülen. Zum Passagieren (nach 12-18 Tagen) wird die Zellsuspension im Verhältnis 1:3 oder 1:5 mit frischem Medium verdünnt und in eine neue Kulturflasche gegeben. Im Gegensatz zu den COS-

7/CHO-Zellen ist dies eine permanente Zelllinie, die nicht eingefroren und wieder aufgetaut werden kann.

Zur Gewinnung von *Bge*-konditioniertem Medium wird das Medium alle 2-3 Tage gesammelt und durch frisches ersetzt. Danach wird es kurz zentrifugiert (1600 rpm, 5 min) und der Überstand bei 4°C für max. 6 Wochen gelagert.

#### ❖ 2.2.22 Transfektion von Zellen

Die Transfektion der mammalischen Zellen wird mit Hilfe der Lipofektion durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Komplexierung der DNA mit unilamellaren Liposomen und anschließender Fusion dieser mit der Zellmembran. Die eingesetzten Reagenzien stammen von den Firmen Roche (FuGene 6) und Promega (Transfast) und werden nach Herstellerangaben verwendet. Der Nachweis der transienten Reporterexpression erfolgt 24-72 h nach Zugabe des Transfektionsreagenzes, wobei nach ca. 16 h ein Mediumwechsel stattfindet, um eventuelle Zytotoxizität der Liposomen zu verhindern.

#### ❖ 2.2.23 Reportergennachweis

##### ◆ 2.2.23.1 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

Die Expression des Reportergens wird mit dem konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS NT) detektiert. Hierzu werden die zu untersuchenden Objekte mit Hilfe eines Deckglases auf einem Objektträger fixiert und dann bei 488 nm vom Laser angeregt. Die Emission von GFP liegt bei ca. 520 nm und kann mit einem entsprechenden Bandpassfilter beobachtet werden.

##### ◆ 2.2.23.2 $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Assay im Lysat

Für den Nachweis der Enzymaktivität müssen die Zellen/Würmer zunächst mit 400  $\mu$ l 1x Reporter Lysis-Puffer (Promega) aufgeschlossen werden (15 min RT), wobei die Würmer zusätzlich noch 3x 15 sec mit dem ULTRA TURRAX homogenisiert und die Zellen zuvor 2x mit PBS gewaschen werden. Das Lysat wird 2-3 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -70°C eingefroren oder direkt zur Detektion verwendet. Dazu werden 150  $\mu$ l Probe mit 150  $\mu$ l 2x Assay Puffer durch Vortexen gemischt und der Ansatz bei 37°C für 1-16 h je nach Enzymaktivität inkubiert, bis sich eine deutliche Gelbfärbung ergibt. Die Reaktion wird dann mit 500  $\mu$ l 1 M NaHCO<sub>3</sub> abgestoppt und die Intensität bei 420 nm im Photometer gemessen. Die Enzymaktivität wird zuletzt mit der Gesamtproteinmenge abgeglichen.

❖ 2.2.24 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Für die Proteinbestimmung werden 10 µl der Probe mit 790 µl dH<sub>2</sub>O verdünnt. Bei hohem Proteingehalt sollten die Proben entsprechend verdünnt werden. Zu den 800 µl Ansatz werden 200 µl Bradford-Reagenz gegeben, gemischt, und die Absorption nach 15-30 min bei 595 nm im Photometer gemessen.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde eine Eichkurve mit einer BSA-Standardlösung (0,2 mg/ml) erstellt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Etablierung eines Gentransfersystems für *Schistosoma mansoni*

In diesem Teil der Promotionsarbeit werden zunächst verschiedene Transformationsvektoren vorgestellt, die zum Gentransfer unterschiedlicher Schistosomenstadien eingesetzt wurden. Einige dieser Plasmide waren bereits kloniert, andere wurden neu konstruiert und auf ihre Funktionalität im heterologen System getestet. Im Anschluss wird die Methode des Particle Bombardment eingeführt und zwei unterschiedliche Geräte mit einander verglichen. Molekulare und mikroskopische Resultate werden präsentiert, die den Gentransfer sowohl in Adulte, als auch in Larvalstadien von Schistosomen dokumentieren. Abschließend werden noch Ansätze zur Mikroinjektion und die ersten Versuche einer Promotoranalyse im homologen System beschrieben.

##### ❖ 3.1.1 Transformationsvektoren

###### ◆ 3.1.1.1 Einsatz verschiedener Reportergene

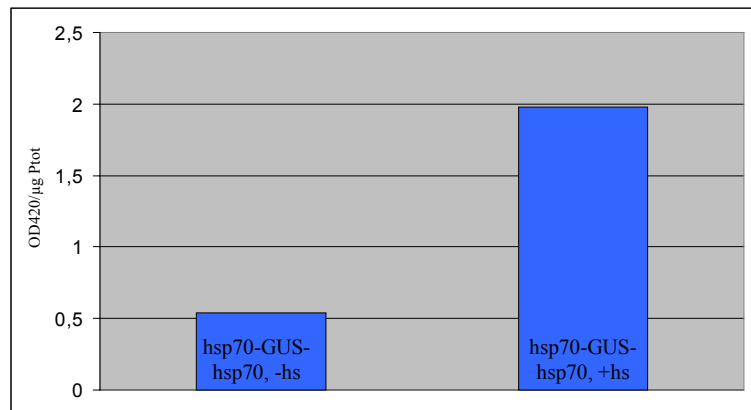
Die in dieser Arbeit zur Klonierung von Transformationsvektoren hauptsächlich verwendeten Reportergene kodieren für das grün-fluoreszierende Protein (GFP), ursprünglich aus *Aequoria victoria* (Chalfie et al., 1994) und die  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) aus *Escherichia coli* (Jefferson et al., 1986). Bei der Auswahl der Reportergene waren zwei Kriterien entscheidend: zum einen sollten sie leicht nachweisbar sein, zum anderen sollte es in dem zu transformierenden Organismus keine endogene Aktivität geben. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf GFP gelegt, da es sich hierbei um ein Protein handelt, das Eigenfluoreszenz besitzt und kein Substrat für seinen Nachweis benötigt (Chalfie et al., 1994). Das in dieser Arbeit verwendete GFP-Gen war eine freundliche Gabe von Dr. Christoph Reichel (MPI, Köln) und zeichnet sich durch verschiedene Modifikationen im Vergleich zum Ursprungsgen aus (Reichel et al., 1996). So ist es an vier Stellen mutiert worden, um eine stärkere Fluoreszenz zu erlangen. Der Nachweis zur Verwendbarkeit dieses Reportergens im mammalischen Zellkultursystem wurde in der Arbeit von Kapp (2000) erbracht, da es bislang nur zur Transformation von Pflanzen eingesetzt worden war. Dies ließ den Rückschluss zu, dass es sich auch für den Einsatz in Schistosomen eignen könnte.

Neben GFP wurde auch GUS für die Konstruktion von Transformationsvektoren eingesetzt. Eine endogene GUS-Aktivität konnte in *Schistosoma mansoni* nicht nachgewiesen werden (Gohr, 1995). Dieses Reportergen hat den Vorteil, dass es sowohl histochemisch, als auch im Lysat nachgewiesen werden kann (Olesen et al., 1997). Der histochemische Nachweis in der Zellkultur wurde bereits durch die Transfektion von etablierten Zelllinien



mit dem Konstrukt ER60-GUS-ER60 erbracht (Kapp, 2000). Die Entwicklung eines Enzymaktivitätsassays im Lysat stand noch aus und basierte auf einem etablierten Protokoll zum Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase. Die Durchführung dieses Test ist unter 2.2.23.2 beschrieben. Die Funktionalität des Tests wurde über die Transfektion von COS-7 Zellen mit dem hsp70-GUS-hsp70 Konstrukt bewiesen. Die Abb.5 zeigt das Ergebnis der Enzymaktivitätsmessung nach photometrischen Auswertung.

Abb.5: GUS-Assay im Lysat transfizierter COS Zellen mit dem Plasmid hsp70-GFP-hsp70 (s.u.). Vergleich der OD bei 420 nm im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge. (hs= Hitzeschock)



◆ 3.1.1.2 Vorhandene Transformationsvektoren

Die Abb.6 zeigt die bereits vorhandenen Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen und von Kapp (2000) kloniert und sequenziert wurden.

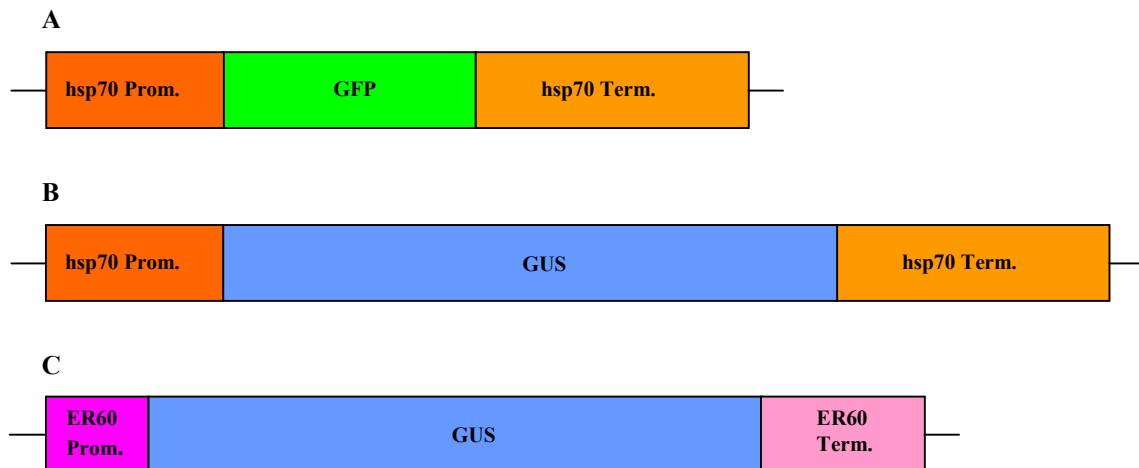


Abb.6: Schematische und maßstabgerechte Darstellung der bereits vorhandenen Transformationsvektoren. **A:** hsp70-GFP-hsp70, **B:** hsp70-GUS-hsp70, **C:** ER60-GUS-ER60. ER60= Cysteinprotease aus *S. mansoni*, GFP= grün fluoreszierendes Protein, GUS=  $\beta$ -Glucuronidase, hsp70= Hitzeschockprotein 70 aus *S. mansoni*, Prom.= Promotor, Term.= Terminator.

Die Funktionalität dieser Vektoren konnte über die Transfektion von etablierten Zelllinien nachgewiesen werden (Resultat nicht gezeigt).

❖ 3.1.2 Klonierung neuer Transfektionsvektoren und deren Funktionalitätstests im heterologen System

◆ 3.1.2.1 Die Transkription der Cystein Protease ER60 in verschiedenen Stadien

Bei ER60 handelt es sich um ein Gen aus *Schistosoma mansoni*, das für eine Cystein-Protease kodiert und von Finken-Eigen & Kunz (1997) veröffentlicht wurde. Anhand der Sequenz wurde diesem Molekül eine Rolle im endoplasmatischen Reticulum zugesprochen. Die Charakterisierung umfasste den Nachweis der Transkription in beiden Geschlechtern adulter Würmer über Northern-Blot-Experimente. Desweiteren konnte mit Hilfe von *in-situ*-Hybridisierungen und Immunlokalisation festgestellt werden, dass ER60 hauptsächlich in Geweben exprimiert wird, die am exkretorischen-sekretorischen (ES) System von Schistosomen beteiligt sind, wie den Protonephridien, der Gastrodermis und den Sustentacular-Zellen der Testes (Finken-Eigen & Kunz, 1997).

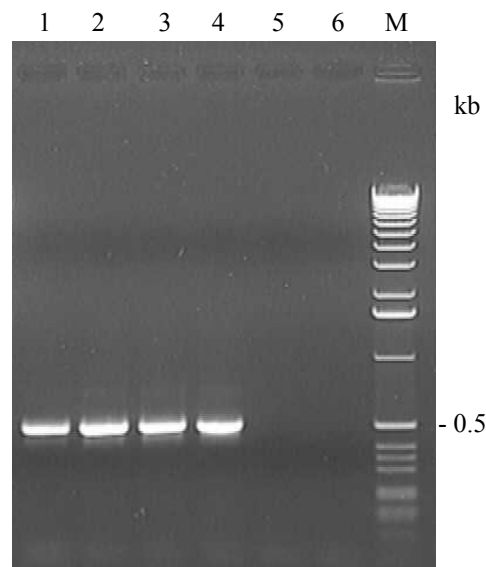


Abb.7: Nachweis von ER60-Transkripten in verschiedenen Stadien via RT-PCR. Für die reverse Transkription wurden ca. 250 ng Total-RNA eingesetzt. Der ER60-spezifische Primer ER60-GUS) wurde zur Erststrang-Synthese verwendet. Anschließend wurde die PCR mit beiden ER60-spezifischen Primern ER60-GUS und ER60-1750-5' durchgeführt. 1: Miracidien, 2: *in vitro* generierte Muttersporozysten, 3: Cercarien, 4: Adulte, 5: RT<sup>-</sup> Kontrolle (Ansatz ohne reverse Transkriptase), 6: Negativ-Kontrolle (Ansatz ohne Template), (M: 1 kb Leiter)

Die bisherigen Daten über ER60 zeigten die Expression in Adulten. Um festzustellen, ob dieses Gen auch in anderen Entwicklungsstadien transkribiert wird, erfolgte mit Hilfe einer RT-PCR die Überprüfung der Transkription von ER60 in Larvalstadien von *Schistosoma mansoni* (Abb.7).

Die erwarteten Amplifikationsprodukte von ca. 500 bp demonstrieren, dass die Cystein-Protease ER60 während des gesamten Lebenszyklus des Parasiten transkribiert wird. Eine Reporterexpression unter der Kontrolle des Promotors/Terminators von ER60 sollte sich somit nach erfolgtem Gentransfer in sämtlichen Stadien nachweisen lassen.

#### ◆ 3.1.2.2 Klonierung von ER60-GFP-ER60 und Funktionalitätstest

Der im Folgenden vorgestellte Vektor umfasst die regulatorischen Elemente des Cystein-Protease Gens ER60 aus *Schistosoma mansoni*. Der Promotorbereich von 290 bp (*HincII/Hind III*- Fragment aus gN11, #839), sowie der Terminator (480 bp, #923) wurden in vorangegangenen Arbeiten bereits identifiziert und kloniert (Finken-Eigen & Kunz, 1997; Kapp, 2000). Diese Sequenzen und das in 3.1.1.1 vorgestellte GFP waren die Basis zur Klonierung eines neuen Transformationsvektors.

Zu Beginn wurde der Terminator mit Hilfe der Enzyme *Eco* RI und *Kpn* I aus dem Ausgangsplasmid herausgeschnitten und in ein ebenfalls *Eco* RI/*Kpn* I geschnittenes Plasmid (pBluescript SK<sup>-</sup>) kloniert. Anschließend wurde der neugeschaffene Vektor mit *Ksp* I und *Xba* I geöffnet und der Promotor, welcher mittels PCR (#839 als Template, Primer: 839-*Ksp*-5/839-*Xba*-3) amplifiziert und danach restringiert wurde, hineinligiert. Das resultierende Konstrukt wurde 60-60 genannt. Zu Beginn der finalen Klonierung des GFP-ORF in diesen Vektor wurde das Reportergen mit den Primern 60-GFP-5 und 60-GFP-3 in einer PCR vervielfältigt. Da an die homologen Sequenzen der Primer Schnittstellen für *Xba* I (5'Primer) und *Bam* HI (3'Primer) angehängt worden waren, konnte das PCR-Produkt mit diesen Enzymen direkt geschnitten und in das mit den gleichen Enzymen geöffnete 60-60 Plasmid ligiert werden. Die erfolgreiche Klonierung dieses neu geschaffenen Transformationsvektors (ER60-GFP-ER60) wurde über einen analytischen Restriktionsverdau und anschließende Sequenzierung verifiziert. Er ist in Abb.8A schematisch dargestellt, wobei die flankierenden Schnittstellen die Begrenzung des Inserts darstellen und identisch mit den Schnittstellen aus der MCS von pBluescript sind.

Um die später möglicherweise auftretende Fluoreszenzen beim Einsatz des ER60-GFP-ER60-Vektors auf die Aktivität des ER60-Promotors zurückführen zu können, wurde zusätzlich ein Kontrollplasmid kloniert. Hierzu wurde die 5'UTR nachträglich aus ER60-

GFP-ER60 mit Hilfe der Schnittstellen für *Ksp* I und *Xba* I entfernt. Die überhängenden, einzelsträngigen Enden des Plasmids wurden in einer „fill in“-Reaktion durch das Klenow-Fragment wieder aufgefüllt und der Vektor einer Religation unterzogen. Das Plasmid GFP-ER60 ist ebenfalls in Abb.8B dargestellt.

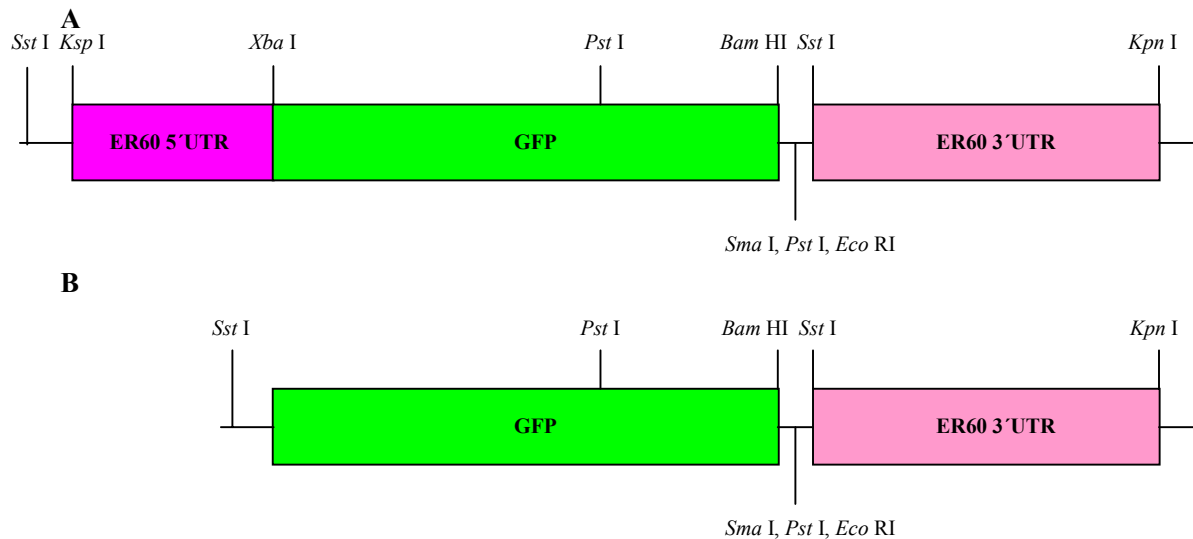


Abb.8: Die Transformationsvektoren ER60-GFP-ER60 (A) und GFP-ER60 (B) Schematische Darstellung der maßstabgerechten Größenverhältnisse (ER60 5'UTR: 290 bp, GFP: 730 bp, ER60 3'UTR: 480 bp) des Inserts, welches sich in pBluescript SK<sup>-</sup> befindet. Die für die Klonierung relevanten Schnittstellen sind angegeben.

Im Anschluss an die Klonierung wurden ER60-GFP-ER60 und GFP-ER60 für die Transfektion von COS-7 Zellen verwendet. 48h nach der Transfektion konnte Fluoreszenz mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops in verschiedenen Zellen detektiert werden (Abb.9).

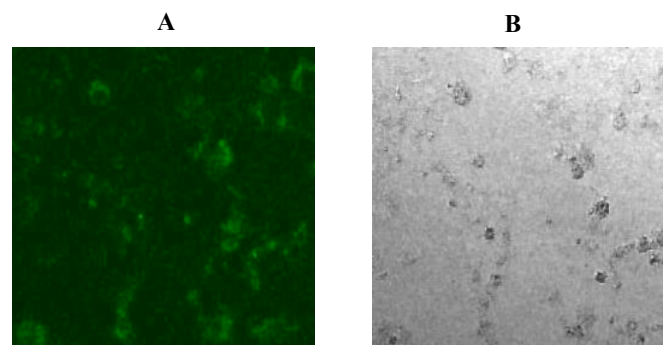


Abb.9: Transfektion von COS-7 Zellen mit dem Konstrukt ER60-GFP-ER60 Die Detektion der GFP-induzierten Fluoreszenz erfolgte 48 h post Transfektion mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie. A: Fluoreszenz, B: Hellfeld

Diese GFP Expression in den Zellen ist auf die Aktivität des ER60-Promotors zurückzuführen, da entsprechende Kontrollen, mit dem Konstrukt GFP-60 oder mit dem Transfektionsreagenz alleine, keine fluoreszierende Zellen hervorbrachten (Resultat nicht gezeigt).

Das Ergebnis beweist zum einen, dass es sich bei den 290 bp 5'UTR wirklich um einen Promotor handelt, zum anderen die Funktionalität des gesamten Konstrukts im heterologen System.

◆ 3.1.2.3 Klonierung von Act-GFP-Act und Funktionalitätstest

Mit Hilfe der bekannten Sequenzen von Sm-Act1 sollte nun ein Vektor kloniert werden, der transformierte Zellen zur konstitutiven Expression der eingebrachten Gene veranlasst, angefangen mit einem GFP-Reportergenkonstrukt.

Die Konstruktion des Transformationsvektors Act-GFP-Act erfolgte über die Amplifikation der regulatorischen Elemente der Act 1 Gens aus *S.mansoni* und anschließender Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pGEM Teasy (Promega). Die für die PCR eingesetzten Primer wurden anhand der bereits veröffentlichten Sequenzen für das Gen konstruiert, wobei die 5'UTR ca. 170 bp und die 3'UTR etwa 370 bp umfassen. Das Anhängen entsprechender Schnittstellen an das 5'Ende eines jeden Primers ermöglichte eine gezielte Restriktion der Elemente und den Austausch des Promotors/Terminators aus dem ER60-GFP-ER60-Plasmid gegen die entsprechenden Elemente des Aktin 1-Gens. Die Klonierung erfolgte schrittweise, indem erst die 5'UTR *Ksp I/Xba I* ersetzt wurde. Der resultierende Vektor erhielt den Namen Act-GFP-60. Danach wurde der ER60-Terminator unter Verwendung der gleichen Strategie *Eco RI/Kpn I* durch den Aktin 1-Terminator ersetzt. In Abb.10 ist der finale Transformationsvektor Act-GFP-Act dargestellt, der über verschiedene Restriktionsanalysen und eine Sequenzierung verifiziert wurde.

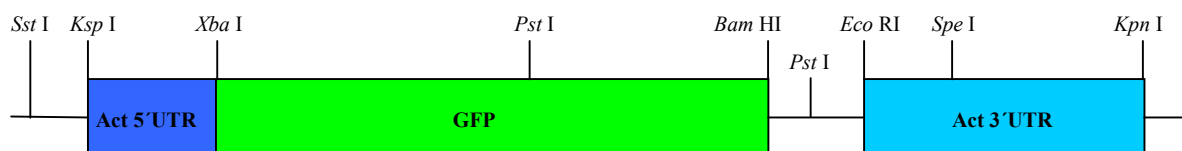


Abb.10: Der Transformationsvektor Act-GFP-Act  
 Schematische und maßstabsgerechte Darstellung der Größenverhältnisse (Act 5'UTR: 170 bp, GFP: 730 bp, Act 3'UTR: 370 bp) des Inserts, welches sich in pBluescript SK<sup>-</sup> befindet. Die für die Klonierung relevanten Schnittstellen sind angegeben.

Um sicherzustellen, dass es sich bei diesem Konstrukt um einen funktionsfähigen Transformationsvektor handelt, wurden zunächst Transfektionsexperimente mit CHO und COS-7 Zellen durchgeführt. Die konfokale Lasermikroskopie offenbarte fluoreszierende Zellen 48 h post Transfektion, gleichbedeutend mit einer entsprechenden GFP Expression (Abb.11). Kontrollversuche mit einem Vektor, der nur das GFP-Gen enthielt bzw. Versuche, bei denen keine DNA eingesetzt wurde, zeigten unter Fluoreszenzbedingungen keine grünen Signale (Resultat nicht gezeigt).

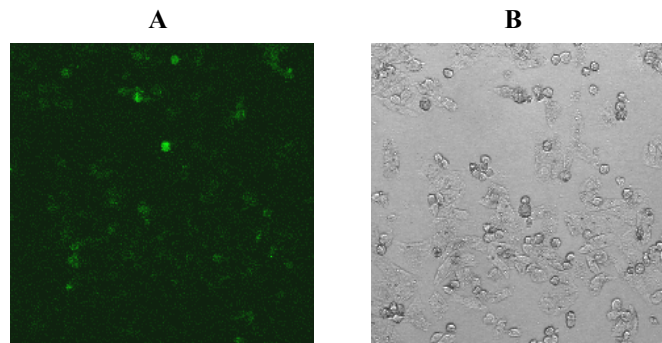


Abb.11 Transfektion von CHO Zellen mit dem Konstrukt Act-GFP-Act.

Die Detektion der GFP-induzierten Fluoreszenz erfolgte 48 h post Transfektion mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie. **A**: Fluoreszenz, **B**: Hellfeld

Das Ergebnis beweist zum einen, dass die klonierten Bereiche ausreichen, um das Transgen im heterologen System zur Expression zu bringen, zum anderen, die Funktionalität des gesamten Konstrukts.

#### ◆ 3.1.2.4 Klonierung von p14-GUS-p14

Die Klonierung der regulatorischen Elemente dieses Gens wurde von Kapp (2000) durchgeführt und diente zur Konstruktion des für Weibchen gedachten Transformationsvektors p14-GFP-p14. Wie sich in den ersten Versuchen mit diesem Vektor zeigte, offenbarten weibliche Schistosomen im Bereich des Vittelariums starke Eigenfluoreszenz auch im Emissionsbereich von GFP bei etwa 520 nm (Abb.12). Die Schlussfolgerung ist, dass sich dieses Konstrukt nicht für die Transformation von Weibchen eignet, da eine GFP-induzierte Fluoreszenz nicht von der Eigenfluoreszenz zu unterscheiden ist.

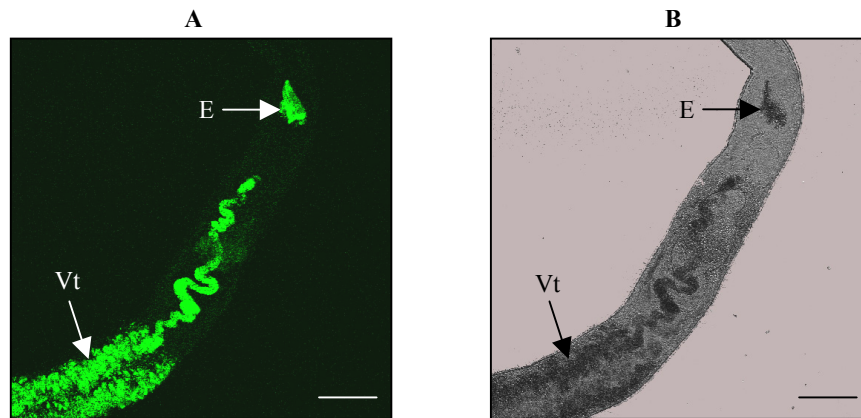


Abb.12: Konfokaler Lasermikroskopie eines muren Wildtyp-Weibchens.  
**A:** Fluoreszenz, **B:** Hellfeld. E= Ei, Vt= Vitellarium. (Größenstandard: 0.5 mm)

Um dennoch einen Vektor für die Transformation speziell von Weibchen einsetzen zu können, wurde das GFP-Gen durch das  $\beta$ -Glucuronidase Gen (GUS) ersetzt. Die Klonierung erfolgte über die bekannte Strategie der PCR-Amplifikation des Reportergens mit spezifischen Primern, denen entsprechende Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme angehängt wurden. Nachdem GUS amplifiziert und in pGEM Teasy inkloniert war, erfolgte der Austausch der Reportergene über eine gerichtete Klonierung mit *Nco* I und *Bam* HI. Die nachfolgende Abb.13 zeigt den schematischen Aufbau des neugeschaffenen Plasmids p14-GUS-p14.

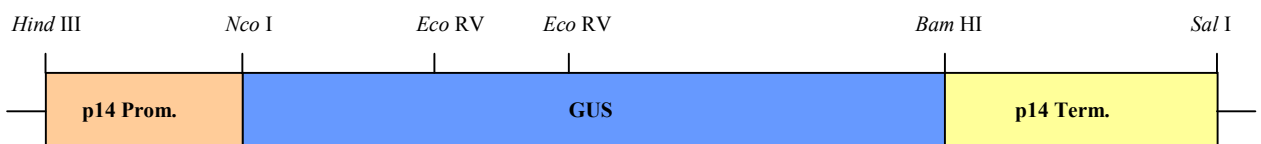


Abb.13: Der Transformationsvektor p14-GUS-p14  
 Schematische und maßstabgerechte Darstellung der Größenverhältnisse (p14 Prom.: 520 bp, GUS: 1870 bp, p14 Term.: 720 bp) des Inserts, welches sich in pUC 18 befindet. Die für die Klonierung relevanten Schnittstellen sind angegeben.

Wie sich im Vorfeld herausgestellt hatte, gibt es innerhalb der klonierten 5'UTR keine Motive bekannter Transkriptionsfaktor-Bindestellen (Kapp, 2000). Auch die Transfektion von mammalischen Zelllinien mit p14-GFP-p14 ergab keine GFP Expression. Da es sich bei dem GUS-Nachweis im Lysat um den sensitiveren Test handelt, wurden dennoch Transfektionsexperimente mit COS-7 und CHO Zellen durchgeführt, um eine möglicher-

weise schwache Reporterexpression nachweisen zu können. Die Ergebnisse fielen jedoch negativ aus, so dass dieser Vektor ohne Funktionalitätstest zur Transformation von Schistosomen eingesetzt werden musste.

### ❖ 3.1.3 Particle Bombardment (Helios Gene Gun vs. PDS 1000)

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppen Kunz/Grevelding (Kapp, 2000) wurden bereits einige bekannte Transfektions- und Transformationsmethoden erfolglos getestet, um transgene Schistosomen zu erzeugen. Im Rahmen dieser Arbeiten verdichteten sich jedoch die Hinweise, dass es mit der Hilfe des Particle Bombardment möglich sein könnte, transiente Transgenaktivität in Schistosomen erhalten zu können. Parallele Arbeiten von Davis et al. (1999) und Jackstadt et al. (1999) zeigten zudem den Einsatz dieser Technik an weiteren parasitischen Organismen.

Zur Zeit werden zwei Geräte für diese Technik kommerziell von der Firma Bio-Rad vertrieben (Abb.14). Der grundlegende Unterschied dieser beiden Geräte liegt darin, dass die Gene Gun unter atmosphärischen Bedingungen arbeitet, die PDS 1000 dagegen unter Vakuum. Im Gegensatz zur PDS 1000 kann die Gene Gun daher für DNA-Vakzinierungsversuche eingesetzt werden. Beide Systeme sind auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht worden, um den hier zugrunde liegenden Organismus *S.mansoni* transient oder stabil zu transformieren.

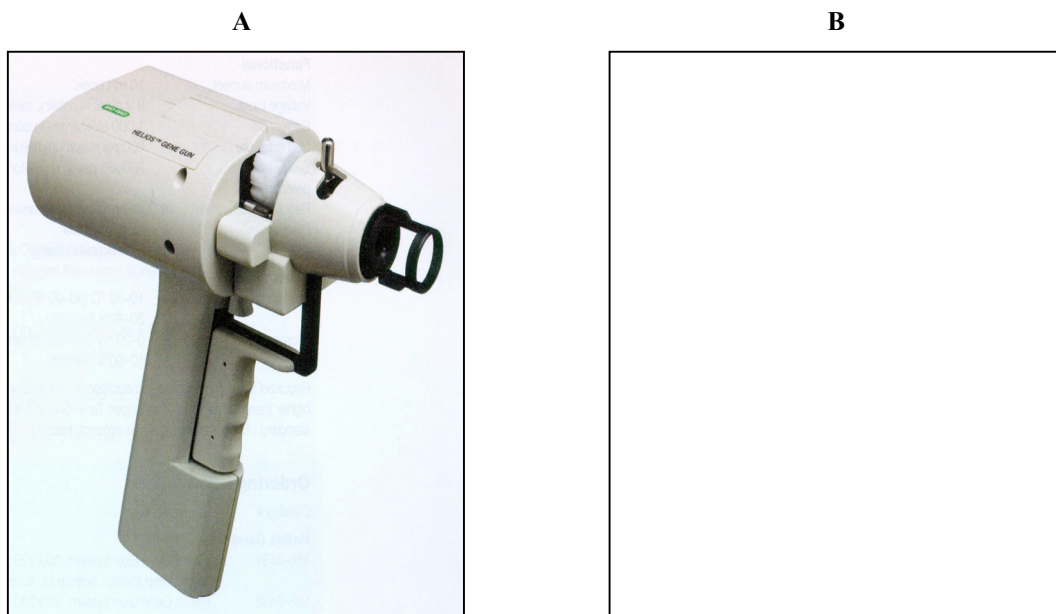


Abb.14: Darstellung der beiden Geräte für das Particle Bombardment, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen. **A:** Helios Gene Gun, **B:** PDS 1000



### ❖ 3.1.4 Gentransferexperimente mit der Helios Gene Gun

Zu Beginn dieser Arbeit wurden erste Particle Bombardment-Versuche mit der Gene Gun und adulten Schistosomen in Zusammenarbeit mit Katja Kapp unternommen. Da uns ein solches Gerät nicht direkt zur Verfügung stand, wurden die Experimente mit freundlicher Unterstützung von Prof. Horst Zahner und Dr. Peter Jackstadt am Institut für Parasitologie der Universität Gießen durchgeführt. Bei den Versuchen kamen Transformationsvektoren zum Einsatz, die bereits in der Arbeit von Katja Kapp (2000) beschrieben worden sind. Es handelt sich hierbei um die Konstrukte ER60-GUS-ER60 und hsp70-GFP-hsp70.

Nachdem die DNA auf 0.6 µm Goldpartikel präzipitiert worden war, wurden Teflonschläuche mit dieser DNA/Gold-Suspension, wie unter Bio-Rad „technote No. 2433“ beschrieben, gefüllt und getrocknet. Etwa 1 cm große Schlauchstücke dienten als Munition für das Bombardment. Zur Kontrolle der erfolgreichen Präzipitation und Beladung der einzelnen Patronen wurden einige Schlauchstücke für kurze Zeit in dH<sub>2</sub>O inkubiert, woraufhin sich das Gold vom Teflon und die DNA wiederum vom Gold löste. Zur Mengenbestimmung wurde ein Aliquot des Überstandes auf ein Agarosegel aufgetragen. Im Schnitt ergab sich eine DNA-Konzentration von ca. 100 ng pro Patrone (Resultat nicht gezeigt).

Zur Durchführung des Particle Bombardments wurden die Würmer in der Mitte einer Petrischale gesammelt und das Kulturmedium komplett entfernt. Nach Aktivierung des Gerätes wurden die Tiere aus einer Distanz von 2-3 cm beschossen, wobei es aufgrund der Druckwelle zu einer weiten Verteilung der einzelnen Individuen innerhalb und außerhalb der Petrischale kam. Die in der Schale verbliebenen Würmer konnten durch Hinzufügen von Kulturmedium gesammelt werden. Die anschließende Mikroskopie der beschossenen Würmer offenbarte starke Verletzungen der Tiere. Einzelne Goldpartikel und große Goldaggregate konnten im Inneren und am Tegument der Würmer beobachtet werden. Nach mehrmaligem Waschen der verbliebenen Tiere wurden diese entsprechend des transferierten Konstrukts weiter behandelt und sowohl für die Isolation von Nukleinsäuren verwendet, als auch für die Mikroskopie. Im Anschluss daran wurde mit Hilfe von PCR bzw. RT-PCR die Präsenz der Plasmide und die Transkription der Reportergene nachgewiesen. Einige Resultate sind in Abb.15 dargestellt.

Die Mikroskopie der mit den GUS-Konstrukten beschossenen Würmer nach 12 h Inkubation mit X-Gluc zum Enzymnachweis offenbarte keine Blaufärbung innerhalb der Würmer.

Bei hsp70-GFP-hsp70 ergab die mikroskopische Analyse nach Hitzeschock vereinzelt schwache Fluoreszenzsignale, die in Verbindung mit großen Goldaggregaten gebracht

werden konnten (Resultate nicht gezeigt). Eine genaue Lokalisation der GFP Expression war jedoch aufgrund der zu starken Verletzungen der Würmer nicht möglich.

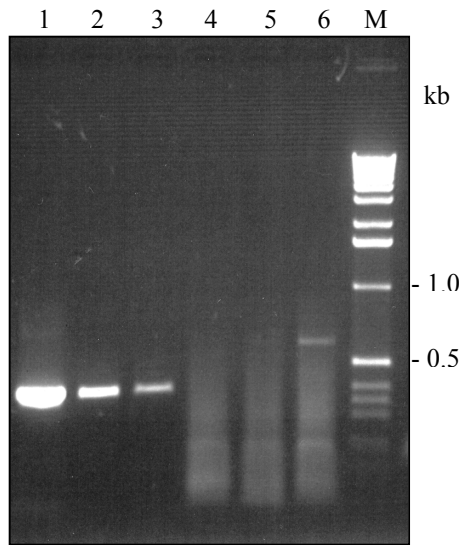


Abb.15: PCR/RT-PCR mit DNA/RNA

isoliert aus Würmern, die mit ER60-GUS-ER60 und der Gene Gun beschossen wurden. 1-3: PCR mit DNA (Primer GUS-5 vs. GUS spez.3, erwartetes Amplifikationsprodukt: ca. 400 bp), 4-6: RT-PCR (Primer GUS spez.5 vs. ER60-GUS, erwartetes Amplifikationsprodukt: ca. 650 bp). 1= 150 psi, 2= 200 psi, 3= 225 psi, 4= Kontrolle, 5= 200 psi, 6= 225 psi

Insgesamt wurden mit der Gene Gun 25 unabhängige Versuche mit ca. 700 Würmer durchgeführt. Die einzelnen Ansätze unterschieden sich in den verwendeten Konstrukten und den applizierten Drücken (150-350 psi). Da es während der Beschüsse und der sich anschließenden Inkubationen (und Hitzeschock) immer wieder zu erheblichen Verlusten ( $\varnothing$  40%) an Würmern kam, und die erheblichen Deformationen der einzelnen Individuen eine Lokalisation der Reportergenexpression nicht zuließen, wurden die Experimente mit der Helios Gene Gun nicht weiter verfolgt. Allerdings offenbarten diese Ergebnisse, dass es grundsätzlich möglich erschien, das Particle Bombardment zum Gentransfer in Schistosomen zum Einsatz zu bringen.

### ❖ 3.1.5 Gentransferexperimente mit der PDS 1000

Nachdem Vorexperimente gezeigt hatten, dass der Einsatz der Vakuumkammer keinen Einfluss auf die Würmer hat, sind insgesamt mehr als 5000 Tiere mit unterschiedlichen Parametern beschossen worden: Drücke von 1100 bis 2000 psi, Goldgrößen zwischen 0.6 und 1.6  $\mu$ m, Vakuum zwischen 15 und 20 inch Hg und Zielentfernungen von 3 oder 6 cm. Im Gegensatz zu den Versuchen mit der Gene Gun konnten nach dem Bombardment mit bis zu 1800 psi kaum offensichtliche, tegumentale Läsionen an den Tieren beobachtet werden. Nachdem die Würmer beschossen und anschließend gewaschen worden waren, konnte innerhalb von Stunden eine Regeneration der einzelnen Individuen festgestellt werden (Abb.16). Sie begannen sich normal zu bewegen und an den Boden der Petrischale anzu-

saugen. Über den Zeitraum der Arbeit konnte bei Drücken von 1550 und 1800 psi eine Überlebensrate von über 90% beobachtet werden.

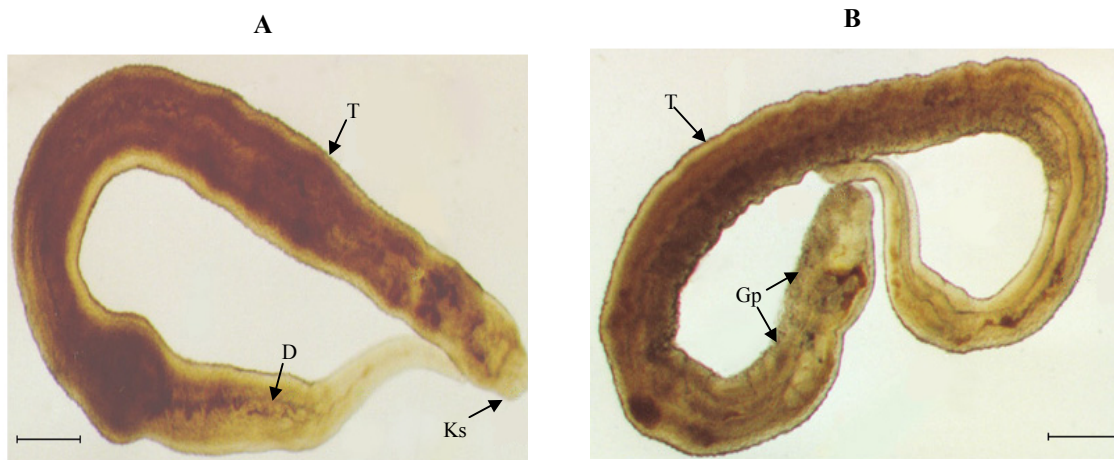


Abb.16: Morphologie nach Particle Bombardment  
 Vergleichende Hellfeldmikroskopie (Nikon SMZ-U) von zwei adulten Schistosomen Männchen ca. 2 h nach Beschuss. **A**: nicht transformierte, **B**: transformiert mit 1550 psi und 0.6  $\mu\text{m}$  Au. D= Darm, Gp= Goldpartikel, Ks= Kopfsaugnapf, T= Tegument. (Größenstandard: 0.5 mm)

Bei den Experimenten mit *in vitro* generierten Sporozysten wurden Drücke von 900 und 1350 psi angewandt. Es konnte mit ca. 70-80% eine geringere Überlebensrate erzielt werden, was auf die größere Empfindlichkeit im Vergleich zu den Adulten zurückzuführen ist. Die behandelten Larven zeigten nach dem Beschuss ebenfalls kaum Tegumentschäden (s. Abb.21B) und zeichneten sich durch normale Körperkontraktion und Bewegung der „flame cells“ innerhalb der Protonephridien aus. Beim Particle Bombardment von Miracidien zeigte sich im mikroskopischen Bild nach der Transformation, dass noch 50-60% der überlebenden Individuen normal beweglich waren. Transformierte Larven konnten somit für die Infektion bzw. Transplantation von Schnecken eingesetzt werden.

Im Vergleich mit der Gene Gun kann man zusammenfassend sagen, dass es sich bei dem Particle Bombardment mit der PDS 1000 um die bedeutend effizientere Technik im Bezug auf die Transformation von Schistosomen handelt.

### ❖ 3.1.6 Transformation adulter Schistosomen Männchen mit dem Vektor hsp70-GFP-hsp70

#### ◆ 3.1.6.1 Molekularbiologische Analyse

Der verwendete Transformationsvektor wurde bereits vorgestellt und auf seine Funktionalität hin überprüft (Kapp 2000). Die Transfektion von COS-7 Zellen zeigte einige fluoreszierende Zellen nach Hitzeschock, was die induzierte Expression des GFP unter der Kontrolle dieses Promotors bestätigte. Kontroll-Experimente mit transfizierten Zellen, die nicht Hitze-geschockt wurden, offenbarten keine fluoreszierenden Zellen (Resultat nicht gezeigt).

Der Vektor hsp70-GFP-hsp70 wurde nun für Particle Bombardment Experimente mit der PDS 1000 und adulten Schistosomen-Männchen eingesetzt. Nach dem Beschuss wurden die Würmer für ca. 1h bei 37°C kultiviert und anschließend durch Überführen in steriles Medium gewaschen. 24h nach dem Gentransfer wurden die entsprechenden Tiere für 4h bei 42°C Hitze-geschockt. Für weiterführende Versuche wurden die Würmer unter Standardbedingungen weiter kultiviert.

Um die Präsenz und die Transkription des Vektors bzw. des Transgens zu überprüfen wurden die Tiere 6h nach Hitzeschock in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Isolation der Nukleinsäuren dort gelagert. Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die Transkriptmengen von hsp70 zu diesem Zeitpunkt am höchsten sind (Neumann et al., 1993). Im Anschluss an die Präparation von DNA und RNA wurde zuerst eine PCR mit GFP-spezifischen Primern durchgeführt, um nachzuweisen, dass der Vektor erfolgreich in die Würmer eingebracht wurde. Abb.17A zeigt ein Agarosegel nach der PCR, bei der DNA unterschiedlich behandelte Wurmpopulationen eingesetzt worden war. In allen dargestellten Fällen konnte der Nachweis des geglückten DNA-Transfers über die Amplifikation des erwarteten Produkts von 380 bp erbracht werden. Kontroll-PCR-Versuche mit DNA aus unbeschossenen Würmern und mit Kulturmedium als Template ergaben kein Amplifikationsprodukt (Resultat nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob das Transgen unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente des hsp70-Gens auch transkribiert wird, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Die erwartete Größe des Amplifikationsproduktes mit den Primern GFP5' und 60-GFP3' war 420 bp. In Abb.17B ist das Ergebnis dargestellt. Entsprechende Banden sind nur in Spur 1 (1550psi, +hs) und der Positivkontrolle zu erkennen. Um zu gewährleisten, dass es sich um spezifische Produkte handelt und dass die auftretenden Banden bei ca. 550 bp (Spuren 2, 5, 6) unspezifische Amplifikationsprodukte sind, wurde ein Southern Blot mit diesem Gel

durchgeführt (Abb.17C). Die anschließende Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten GFP Sonde. Die nachfolgenden Waschschrte wurden unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Der Southern Blot verifiziert zum einen das Ergebnis der RT-PCR bezüglich der bereits detektierten Banden bei 420 bp, zum anderen zeigt er zusätzlich, dass auch bei 1800 psi/+hs Transkripte vorhanden waren, die allerdings unterhalb der Nachweisgrenze des Agarosegels gelegen haben. Die Resultate belegen, dass GFP-Transkripte nur nach Hitzeschock-Induktion gefunden werden konnten.

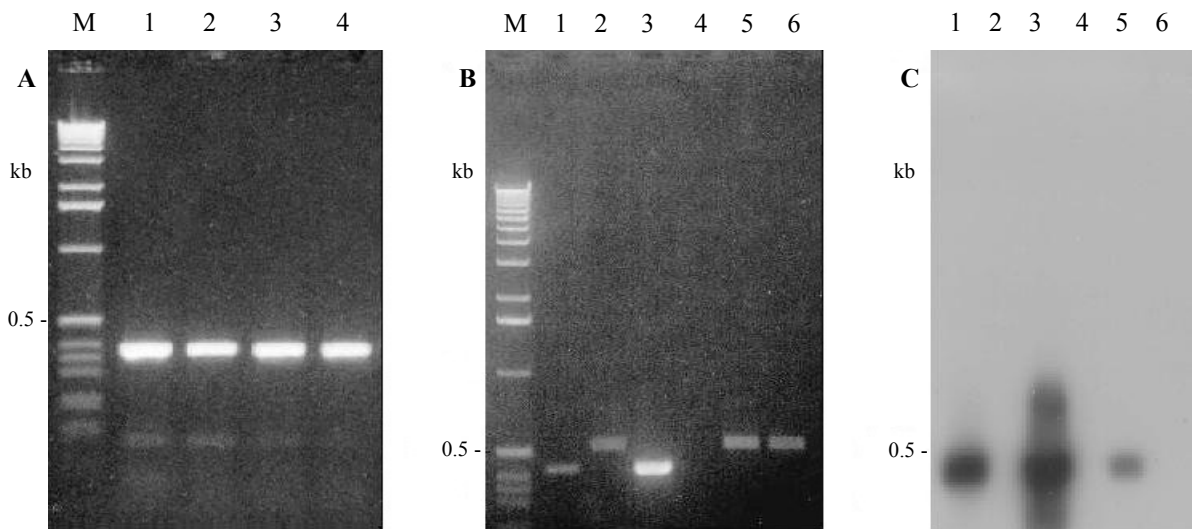


Abb.17: Molekulare Analyse zur Transkription von GFP unter der Kontrolle von hsp70 in Adulten.

**A:** PCR mit DNA aus beschossenen Würmern (1550/1800 psi, 0.6  $\mu$ m Au) und den GFP-spezifischen Primern GFP5'/GFP4. 1: 1550 psi, + hs; 2: 1550 psi, - hs; 3: 1800 psi, + hs; 4: 1800 psi, - hs.

**B:** RT-PCR mit Total-RNA aus beschossenen Würmern und GFP-spezifischen Primern (GFP5'/60-GFP3'). 1: 1550 psi, + hs; 2: 1550 psi, - hs; 3: PCR positiv Kontrolle; 4: RT<sup>-</sup> Kontrolle; 5: 1800 psi, + hs; 6: 1800 psi, - hs.

**C:** Southern Blot des unter B dargestellten Gels. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten GFP- Sonde.

Neben der Transkription des Transgens sollte auch die Translation von GFP mit Hilfe eines Western Blots und anschließender Antikörperumsetzung nachgewiesen werden (Abb.18). Hierzu wurden beschossene Würmer für 4h bei 42°C Hitze-geschockt und anschließend für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert, bevor eine Proteinisolation durchgeführt wurde. Eine weitere Wurmpopulation wurde zur Kontrolle ebenfalls beschossen, jedoch keinem Hitzeschock ausgesetzt. Wie sich zeigte, konnte ein Signal der erwar-

teten Größe von ca. 27 kDa nur in den Würmern erhalten werden, die zum einen beschossen wurden und zusätzlich einem Hitzeschock ausgesetzt waren (Spur 3). In allen weiteren Spuren ist keine Bande zu erkennen.

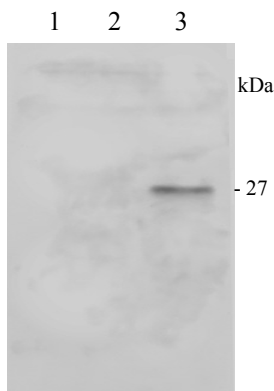


Abb.18: Molekulare Analyse zur Translation von GFP unter der Kontrolle von hsp70 in Adulten.

Western Blot mit anschließender Umsetzung durch einen GFP-spezifischen Antikörper. 1: Proteine untransformierter Würmer; 2: Proteine transformierter, aber nicht Hitze-geschockter Würmer; 3: Proteine transformierter und Hitze-geschockter Würmer.

Dieses Ergebnis untermauert die bisherigen molekularen Daten, die gezeigt haben, dass nur in transformierten Würmern, die bei 42°C gestresst wurden, eine Expression des Transgens erfolgte.

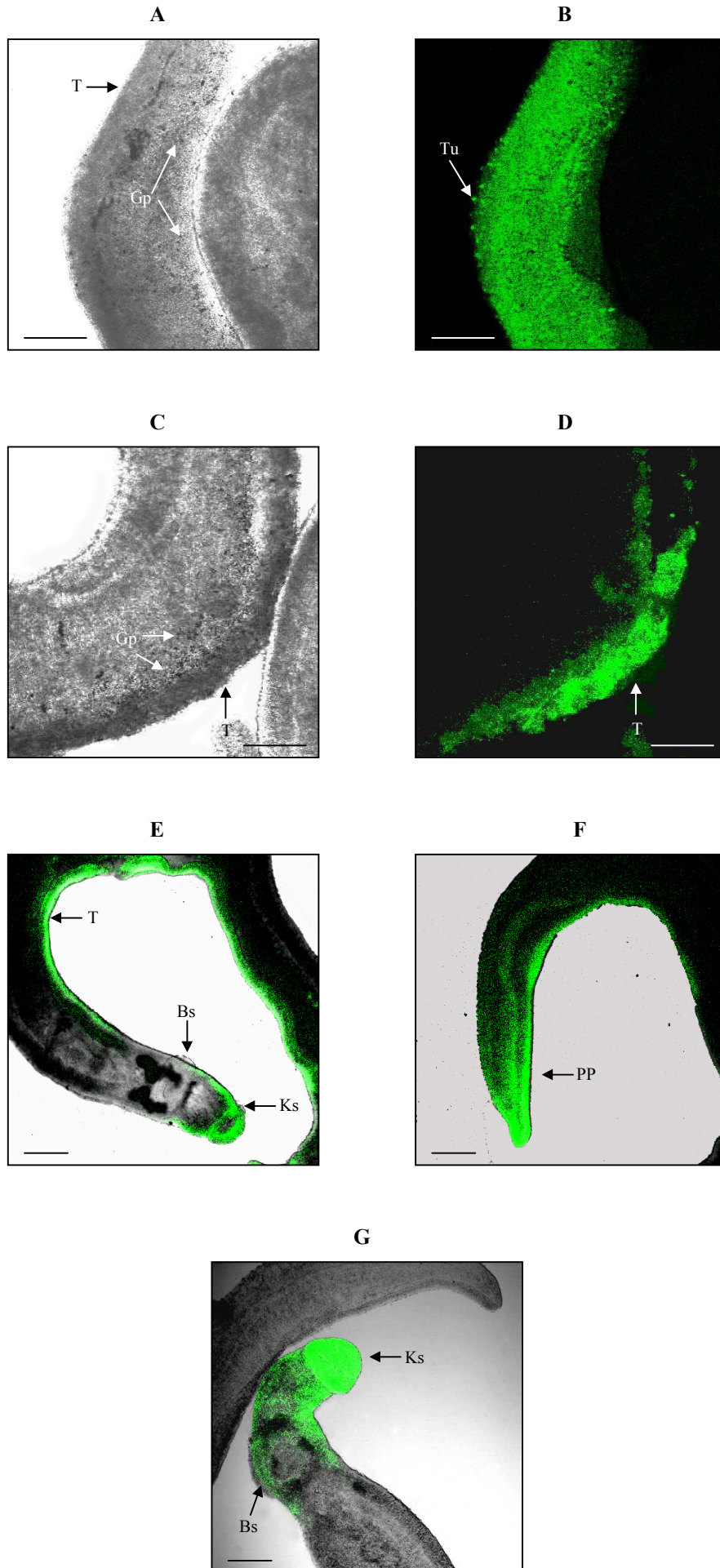
#### ◆ 3.1.6.2 Mikroskopische Analyse

Parallel zu den molekularen Analysen wurden die beschossenen und Hitze-geschockten Würmer mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie auf GFP induzierte Fluoreszenz hin untersucht (Abb.19). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Transformationseffizienz bei den Experimenten mit der PDS 1000 und dem Plasmid hsp70-GFP-hsp70 innerhalb der einzelnen Ansätze variierte, im Schnitt aber bei ca. 10% lag.

Abb.19: Mikroskopie adulter Schistosomen Männchen, die mit dem Vektor hsp70-GFP-hsp70 transformiert wurden (1550 psi, 0.6/1.6 µm Au).

**A:** Hellfeldaufnahme von zwei Männchen, wobei sich nur im linken eine breite Goldverteilung nachweisen lässt. **B:** Das Fluoreszenzbild des gleichen Ausschnittes verdeutlicht, dass nur der linke Wurm deutliche Signale zeigt. **C:** Hellfeldaufnahme von zwei weiteren Männchen, wobei sich auch hier nur im linken eine breite Goldverteilung im Tegument nachweisen lässt. **D:** Fluoreszenzbild des gleichen Ausschnittes verifiziert, dass tegumentale GFP-Fluoreszenz nur im linken Wurm vorhanden ist. **E:** Übersichtsaufnahme eines transient transgenen Wurms, der GFP Expression im Tegument und im Bereich des Kopfsaugnapfes zeigt. **F:** Tegumentale GFP-Expression im posterioren Teil. **G:** Tegumentale GFP-Expression im anterioren Bereich.

Bs= Bauchsaugnapf; Gp= Goldpartikel; Ks= Kopfsaugnapf; PP= posteriorer Part; T= Tegument; Tu= Tuberkel. (Größenstandard: 0.25 mm)



Die fluoreszierenden Bereiche konnten nur dort gefunden werden, wo sich im Transmissionsbild auch Goldpartikel zeigten. Der in Abb.19A auf der linken Seite dargestellte mittlere Teil eines Wurms zeigt eine weit verbreitete Verteilung einzelner Goldpartikel und kleinster Goldaggregate, wohingegen das rechte Individuum kein Gold aufweist. Das dazugehörige Fluoreszenzbild zeigt eindeutig, dass nur im linken Wurm Fluoreszenz zu erkennen ist (Abb.19B). Die Fluoreszenz in einigen Tuberkeln gibt erste Hinweise auf eine GFP-Expression im Tegument. Diese Annahme bestätigte sich bei der Betrachtung der Abb.19C/D/E. Besonders in E lässt sich die tegumentale Expression des Reportergens erkennen.

Neben der GFP-Expression im Tegument des mittleren Teils lässt sich auch deutliche Fluoreszenz sowohl im posterioren, als auch im anterioren Teil inklusive des Kopfsaugnapfes der Würmer erkennen (Abb.19F/G).

Stellt man diese und die molekularen Daten zusammen, wird deutlich, dass es gelungen ist, den Transformationsvektor in den Organismus einzubringen und das Reportergen unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente des *hsp70* Gens transient zur Expression zu bringen.

### ❖ 3.1.7 Transformation *in-vitro* generierter Sporozysten mit dem Vektor *hsp70*-GFP-*hsp70*

#### ◆ 3.1.7.1 Molekularbiologische Analyse

Neben den Experimenten mit Adulten wurde *hsp70*-GFP-*hsp70* auch für das Particle Bombardment von larvalen Stadien eingesetzt. Hierzu wurden *in vitro* primäre Sporozysten generiert (s. 2.2.18.2). Nachdem die Transformation der Miracidien zu Muttersporozysten stattgefunden hatte, wurden 1000-2000 Larven mit Hilfe einer Pipette in die Mitte einer Petrischale überführt und anschließend mit unterschiedlichen Drücken beschossen (900/1350 psi). Nach dem Beschuss wurden 2-6 ml *Bge*-konditioniertes Medium (inkl. ABAM) zugegeben und die Sporozysten für weitere 48 h unter Standardbedingungen kultiviert. Wie bei den Experimenten mit den adulten Tieren sollte auch hier zunächst die molekulare Analyse des erfolgreichen Gentransfers vorgenommen werden. Nachdem die Präsenz des Konstruktes mit Hilfe der PCR an isolierter DNA nachgewiesen werden konnte (Resultat nicht gezeigt), wurde eine RT-PCR zur Bestätigung der Transkription durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb.20A dargestellt. Es zeigt sich, dass nur in Populationen, die beschossen wurden, ein Amplifikationsprodukt von 420 bp detektiert werden konnte. Die Verifikation der Translation erfolgte über einen Western Blot mit anschließen-



der Antikörperumsetzung (Abb.20B). Das Resultat bestätigt die Erwartungen, dass nur in den Sporozysten, die auch beschossen wurden eine deutliche Bande bei 27 kDa zu erkennen ist.

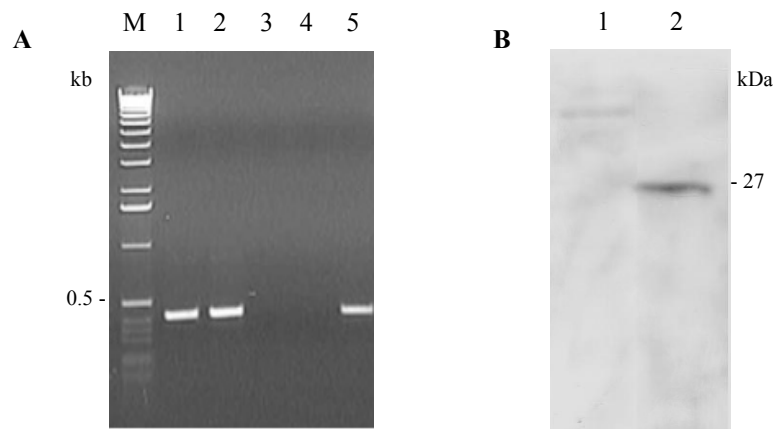


Abb.20: Molekulare Analyse zur Transkription und Translation von GFP unter der Kontrolle von hsp70 in Larven.

**A:** RT-PCR mit Total-RNA beschossener Sporozysten (1.6  $\mu$ m Au) und GFP-spezifischen Primern (GFP5'/60-GFP3'). 1: 900 psi; 2: 1350 psi; 3: nicht beschossenen Larven; 4: RT<sup>-</sup> Kontrolle; 5: PCR Positivkontrolle.

**B:** Western Blot mit anschließender Umsetzung durch einen GFP-spezifischen Antikörper. 1: Proteine nicht beschossener Sporozysten; 2: Proteine beschossener Sporozysten (900 psi).

Im Gegensatz zu den adulten Tieren wurden die Larven nicht einem Hitzeschock unterzogen, da es sich gezeigt hat, dass hsp70 während der Entwicklung der Schistosomen in Miracidien und Sporozysten konstitutiv exprimiert wird (Neumann et al., 1993).

#### ◆ 3.1.7.2 Mikroskopische Analyse

Nachdem auf molekularer Ebene gezeigt werden konnte, dass das Reportergen in Sporozysten, die mit dem hsp70-GFP-hsp70 Vektor beschossen wurden, sowohl transkribiert als auch translatiert wird, wurden weitere Larven bombadiert und zur Detektion des GFP mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie eingesetzt. Dazu überführte ich transformierte Individuen mittels einer Pasteurpipette 48h nach Particle Bombardment auf einen Objektträger und fixiert sie vorsichtig mit einem Deckglas. Die anschließende Mikroskopie wurde wie unter 2.2.23.1 beschrieben durchgeführt.

In beschossenen Tieren konnten neben einer breiten Verteilung von Goldpartikeln auch fluoreszierende Bereiche innerhalb der Larven beobachtet werden. GFP-Aktivität zeigte sich im anterioren Bereich, u.a. in den „gland cells“ (Abb.21A/B).

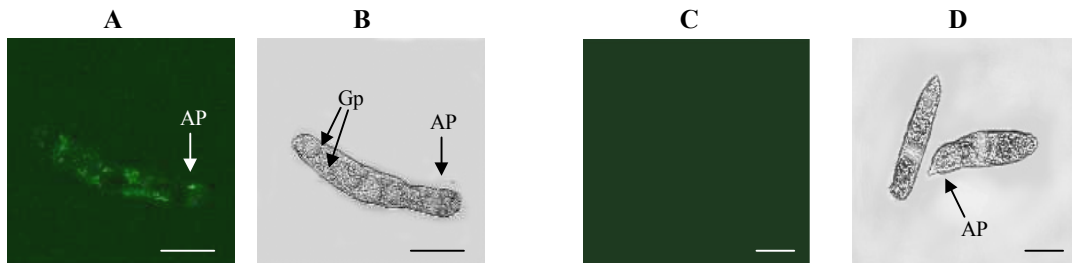


Abb.21: Mikroskopie *in-vitro* generierter Sporozysten, die mit dem Vektor hsp70-GFP-hsp70 transformiert wurden und nicht transgener Larven.

A/B: Hellfeld- und Fluoreszenzbilder beschossener Sporozysten (hsp70-GFP-hsp70, 1350 psi, 1.6  $\mu\text{m}$  Au). C/D: Hellfeld- und Fluoreszenzbilder nicht beschossener Sporozysten als Kontrolle. AP= anteriorer Part; Gp= Goldpartikel, RC= „ridge cyton“. (Größenstandard: 50  $\mu\text{m}$ )

Im mittleren und posterioren Teil der Sporozysten zeigte sich Fluoreszenz u.a. in den Zellen der „ridge cytons“ und der „interstitiellen cytons“ (Pan, 1980). Die Kontrolle mit Muttersporozysten, die nicht transformiert wurden, zeigte keinerlei fluoreszierende Bereiche (Abb.21C/D).

Diese Resultate beweisen, dass der Gentransfer mit Hilfe des Particle Bombardments auch in *in-vitro* generierte Muttersporozysten gelungen ist.

### ❖ 3.1.8 Transformation adulter Schistosomen Männchen mit dem Vektor ER60-GFP-ER60

Neben den Versuchen mit dem hsp70-GFP-hsp70 Konstrukt wurden auch Particle Bombardment-Experimente mit dem ER60-GFP-ER60-Vektor und adulten Männchen durchgeführt. Die Vorgehensweise bei diesen Versuchen entsprach den bereits genannten Bedingungen für den Gentransfer an adulten Schistosomen. Hierbei wurde zunächst auf eine molekulare Analyse der Transgenexpression verzichtet und die beschossenen Würmer direkt mikroskopisch untersucht (Abb.22).

Fluoreszierende Bereiche traten innerhalb der Würmer vorwiegend im Bereich des Darms auf. Diese Resultate korrelieren mit den von Finken-Eigen und Kunz (1997) veröffentlichten Daten, die zeigten, dass ER60 u.a. innerhalb der Gastrodermis stark exprimiert

wird. Das gezeigte Resultat verdeutlichen, dass es gelungen ist, ein Transgen gewebespezifisch in Adulten zur Expression gebracht zu haben.

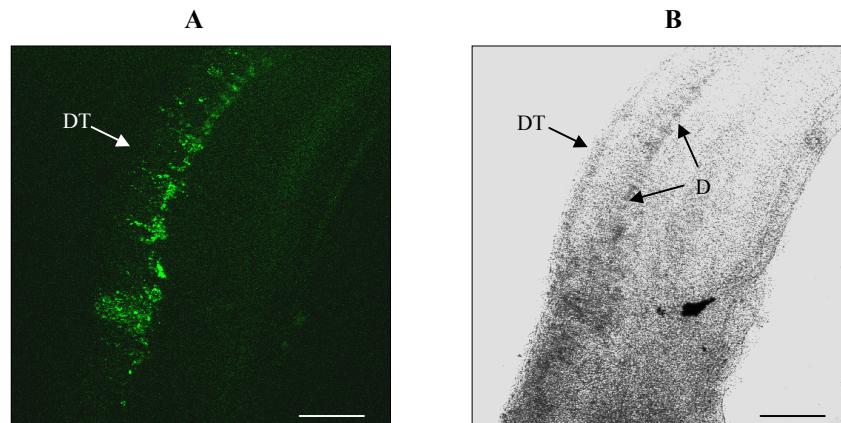


Abb.22: Mikroskopie adulter Schistosomen Männchen, die mit dem Vektor ER60-GFP-ER60 transformiert wurden .  
**A:** Fluoreszenz, **B:** Hellfeld. D= Darm, DT= dorsales Tegument. (Größenstandard: 0.25mm)

Die nachfolgende molekulare Analyse ergab bei der RT-PCR das erwartete Ergebnis. GFP-Transkripte konnte nur in beschossenen Würmern nachgewiesen werden, nicht in unbehandelten (Resultat nicht gezeigt).

### ❖ 3.1.9 Transformation von Sporozysten mit dem Vektor ER60-GFP-ER60

Bei den Gentransferexperimenten mit dem Transformationsvektor ER60-GFP-ER60 standen die Versuche mit Larvalstadien im Vordergrund.

Nachdem gezeigt wurde, dass ER60 in verschiedenen Larvenstadien von *Schistosoma mansoni* transkribiert wird, war das Ziel dieser Versuche die weitere Charakterisierung der Expression in Sporozysten mit Hilfe des Gentransfers.

#### ◆ 3.1.9.1 Molekularbiologische Analyse

Zunächst wurden mit Hilfe der PDS 1000 *in-vitro* generierte Muttersporozysten transformiert. Nachdem die Larven beschossen worden waren, wurden zunächst molekulare Analysen durchgeführt, um die Transkription und Translation des Reportergens unter der Kontrolle der Promotor/Terminator-Einheiten dieses Cystein Protease Gens zu verifizieren. Hierbei zeigte sich, dass nach der Isolation von Total-RNA und anschließender RT-PCR mit GFP-spezifischen Primern, Amplifikationsprodukte der erwarteten Größe von 420 bp

nur in solchen Sporozystenpopulationen identifiziert werden konnten, die beschossen worden waren (Abb.23A).

Die Überprüfung der Translation des GFP-Gens erfolgte über einen Western Blot mit darauffolgender Immunumsetzung mit einem GFP-spezifischen Antikörper. Auch hier zeigte sich, dass ein spezifisches Signal bei ca.27 kDa nur in transformierten Sporozysten zu erkennen war (Abb.23B).

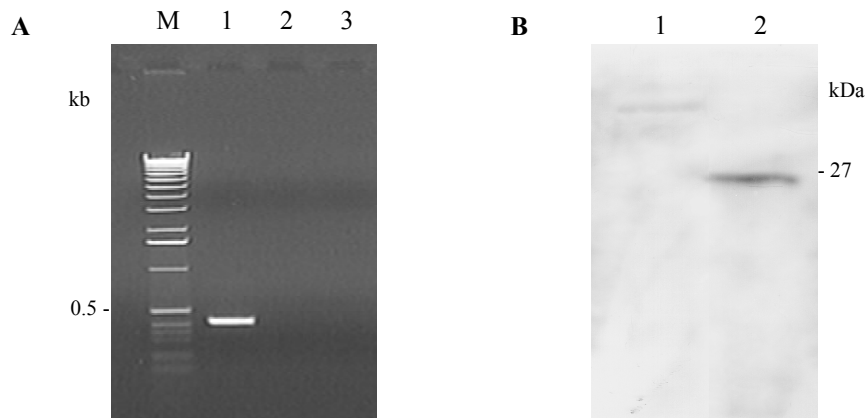


Abb.23: Molekulare Analyse zur Transkription und Translation von GFP unter der Kontrolle von ER60 in Larven.

**A:** RT-PCR mit Total-RNA beschossener Sporozysten (1.6  $\mu$ m Au) und GFP-spezifischen Primern (GFP5'/60-GFP3'). 1: 900 psi; 2: nicht beschossenen Larven; 3: RT<sup>-</sup> Kontrolle.

**B:** Western Blot mit anschließender Umsetzung durch einen GFP-spezifischen Antikörper. 1: Proteine nicht beschossener Sporozysten; 2: Proteine beschossener Sporozysten (900 psi).

Diese Daten beweisen die GFP Expression noch erfolgter Transformation von primären Muttersporozysten.

#### ◆ 3.1.9.2 Mikroskopische Analyse

Um herauszufinden, ob GFP unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente des ER60-Gens in Larven ein gewebespezifisches Aktivitätsmuster zeigt, wurden *in-vitro* generierte Sporozysten 48 h nach der Transformation mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops untersucht. Die Transmissionsbilder offenbarten hierbei eine breite Verteilung von Goldpartikeln. Die dazugehörigen Fluoreszenzaufnahmen zeigten, dass deutliche fluoreszierende Bereiche innerhalb der Tiere beobachtet werden konnten (Abb.24). Im anterioren Teil der Larven wurden dabei wiederholt zwei parallel angeordnete Strukturen beobachtet

(Abb.24A/B), die im Vergleich mit der Ultrastrukturanalyse von Pan (1980), als laterale „gland cells“ identifiziert werden konnten. Desweiteren konnten fluoreszierende Bereiche im mittleren und posterioren Teil der Sporozysten lokalisiert werden (Abb.24C/D), in denen sich die sogenannten „ridge cytons“, „cytons of the common excretory tubule“ und die Protonephridien befinden (Pan, 1980).

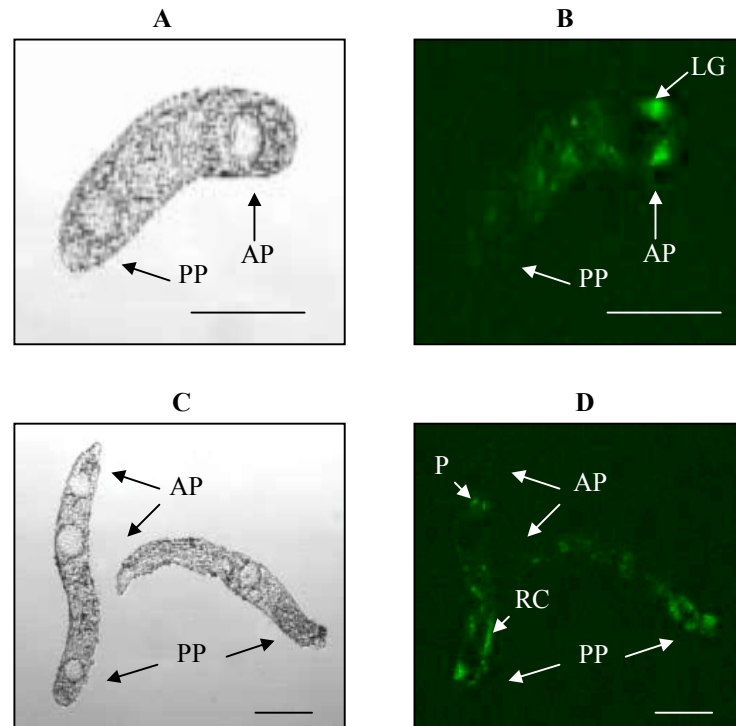


Abb.24: Mikroskopie *in-vitro* generierter Sporozysten, die mit dem Vektor ER60-GFP-ER60 transformiert wurden.

Hellfeld- (A) und Fluoreszenzbilder (B) beschossener Sporozysten (ER60-GFP-ER60, 900 psi, 1.6  $\mu$ m Au). AP: anteriorer Part; LG: „lateral gland cell“; P: Protonephridien; PP: posterior Part; RC: „ridge cyton“. (Größenstandard: 50  $\mu$ m).

Sporozysten, die nicht beschossen wurden, zeigten keine fluoreszierenden Signale (Resultat nicht gezeigt). Aus diesen Daten geht hervor, dass es gelungen ist, nach erfolgtem Gentransfer gewebespezifische GFP-Expression unter der Kontrolle der ER60 regulatorischen Elemente in den Zellen des ES Systems primärer Muttersporozysten nachzuweisen.

❖ 3.1.10 Transformation adulter Schistosomen Männchen mit dem Vektor Act-GFP-Act

In den folgenden Versuchen mit dem Vektor Act-GFP-Act sollte gezeigt werden, dass sich das Reportergen auch konstitutiv exprimieren lässt.

Dazu wurden erneut adulte Männchen beschossen und bis zur weiteren Analyse unter Standardbedingungen kultiviert. Die molekularen Daten (RT-PCR) signalisierten eine Transkription von GFP (Resultat nicht gezeigt). Auf den Western-Blot zur Überprüfung der Translation wurde hierbei verzichtet, so dass sich weitere Versuche zur Mikroskopie direkt anschlossen. Die folgende Abb.25 zeigt jeweils den mittleren Teil eines Schistosomen-Männchens, der fluoreszierende Bereiche dort erkennen lässt, wo im Transmissionsbild große Aggregate von Goldpartikeln zu sehen sind.

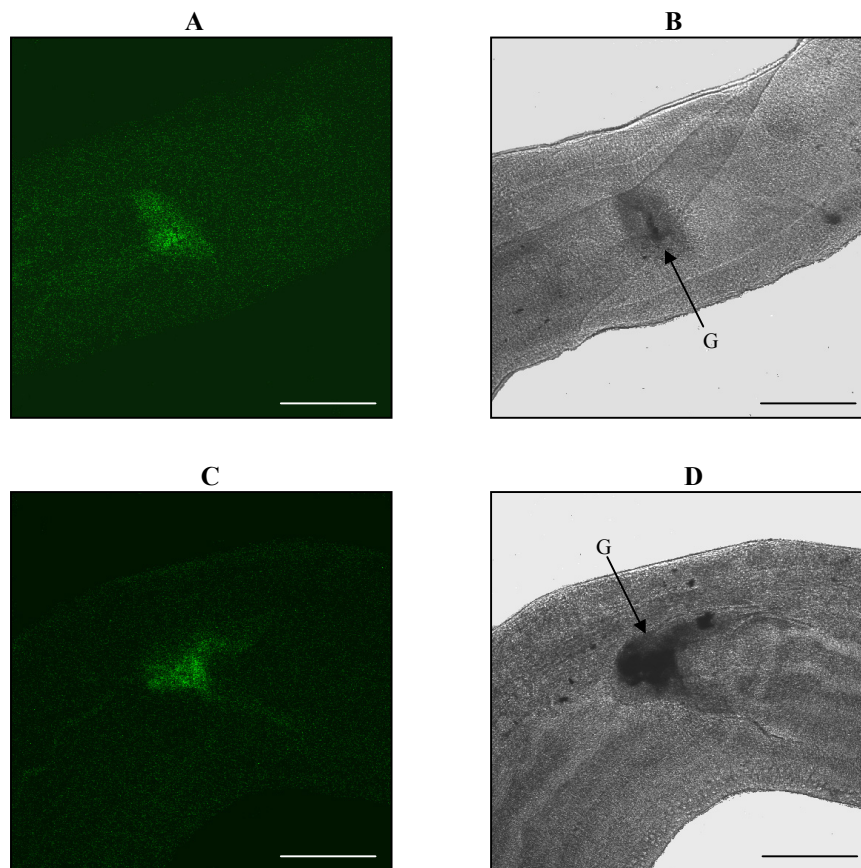


Abb.25: Mikroskopie adulter Schistosomen Männchen, die mit dem Vektor Act-GFP-Act transformiert wurden.

A/C: Fluoreszenz, B/D: Hellfeld. G= Goldaggregate. (Größenstandard: 0.25mm)

Da sich bei entsprechende Kontrollen (Plasmid mit GFP ohne regulatorische Elemente) auch in Bereichen solcher Aggregate keine Fluoreszenz zeigte, handelt es sich hierbei um spezifische GFP Signale, die allerdings nur dort gefunden werden konnte, wo sehr gro-

ße Mengen DNA in den Wurm gelangt sind. Ein daraus resultierender Gendosiseffekt erscheint hier wahrscheinlich. Eine konstitutive Transgenexpression in allen getroffenen Geweben konnte unter der Kontrolle der klonierten Promotor-/Terminator-Sequenzen nicht beobachtet werden.

#### ❖ 3.1.11 Ansätze zum Gentransfer über die Mikroinjektion

Die Mikroinjektion ist die direkteste Methode des Gentransfers, bei der Nukleinsäuren mit Hilfe einer extrem dünnen Glaskapillare unter mikroskopischer Kontrolle direkt in einen Organismus oder den Zellkern einer Zielzelle eingepflegt werden kann. Die Technik wurde erstmalig von Kondoh et al. (1983) beschrieben, die DNA in den Kern verschiedener somatischer Zellen der Maus injizierten. Mikroinjektionsversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einer Apparatur der Firma Eppendorf durchgeführt. Hierbei lag der Schwerpunkt auf dem Gentransfer in Muttersporozysten, wenn möglich direkt in eine der ca. 20 Keimzellen, die in einem solchen Individuum zu finden sind (Pan, 1980).

Zu diesem Zweck wurden *in vitro* generierte Sporozysten mittels einer Pasteurpipette auf einen Objektträger überführt und in die Apparatur eingespannt. Über eine Haltekapillare wurden dann einzelne Individuen fixiert, und versucht, die DNA mit Hilfe der Glaskapillare in den Organismus zu transferieren. Dieses Unterfangen stellte sich allerdings als äußerst schwierig heraus, da Larven ein sehr weiches und flexibles Tegument besitzen, das nicht ohne weiteres von der Injektionskanüle durchdrungen werden konnte. War es dennoch gelungen, die DNA in die Tiere zu injizieren, so zeigte sich, dass diese Behandlung letal war. Innerhalb von wenigen Stunden starben die transformierten Organismen. Unter mikroskopischer Kontrolle zeigte sich, dass nach dem Entfernen der Injektionskanüle Zellen und weitere Inhaltsstoffe aus den Sporozysten entwichen, was möglicherweise zu diesem Effekt geführt haben könnte.

Auch die Mikroinjektion adulter Schistosomen stellte sich als sehr schwierig heraus, da eine Fixierung des einzelnen Wurmes mit der Haltepipette nur unzureichend möglich war. Das ebenfalls sehr flexible Tegument der Adulten ließ sich, wie bei den Larven, mit den Kapillaren nur selten penetrieren.

#### ❖ 3.1.12 Auf dem Weg zu einer stabilen Transformation

Von einer stabilen Transformation spricht man dann, wenn das Transgen zum dauerhaften Bestandteil des Genoms wird und bei der Zellteilung weitergegeben wird (Koch-Brand, 1993). Dieses Ereignis findet bei den herkömmlichen Methoden, darunter auch das

Particle Bombardment, nur sehr selten statt (eine Zelle unter  $10^5$ ; Gassen & Minol, 1996). Mit welchen Mitteln man diese Frequenz erhöhen kann, soll an anderer Stelle diskutiert werden.

Bei den bisher gezeigten Daten handelt es sich um eine transiente Transgenexpression in *Schistosoma mansoni*. Auf dem Weg zu einer stabilen Keimbahntransformation dieses Organismus, ist dies erst der Anfang.

Die Verfügbarkeit von Keimzellen ist in Larven am besten, wobei sich in Miracidien und Muttersporozysten etwa 20 omnipotente Stammzellen im medianen bis posterioren Teil befinden (Pan, 1980). Mit Hilfe des Particle Bombardments sollte nun versucht werden diese Zellen zu transfizieren, in der Hoffnung, dass es zu einer Weitergabe des Transgens an die sich anschließenden Entwicklungsstadien kommt, entweder durch Integration ins Genom oder extrachromosomal (vgl. *C. elegans*; Mello et al., 1991). Da bislang die Entwicklung von der Sporozyste bis zur Cercarie nur einmal *in vitro* gelungen ist (Ivanschenco et al, 1999), dies jedoch 8 Monate dauerte, und die Invasionsfähigkeit einer so entstandenen Larve nicht geklärt ist, kann bei diesen Versuchen auf den Zwischenwirt nicht verzichtet werden.

Wie sich im Rahmen dieser Arbeit gezeigt hat, ist es möglich, *in-vitro* generierte Muttersporozysten zu transformieren. Auf dem Weg zu einer dauerhaften Transformation dieser Individuen müssen diese also wieder in den Zwischenwirt eingebracht werden. 1980 veröffentlichten Jourdane und Theron eine Technik, mit der man Tochttersporozysten in Schnecken transplantieren kann. Diese Technik wurde während der Arbeit von Kapp (2000) im Rahmen einer Kollaboration erlernt und weiterentwickelt, so dass es heute möglich ist, *in vitro* generierte Muttersporocysten in *B. glabrata* zu transferieren. Dass diese Schnecken zur Cercariogenese befähigt sind, konnte ebenfalls gezeigt werden. Ob diese Larven jedoch invasiv sind, und ob sich aus ihnen Adulte entwickeln würden, musste noch herausgefunden werden. In Zusammenarbeit mit Katja Kapp wurden Transplantationsexperimente durchgeführt, die bewiesen, dass unter diesen Umständen der Lebenszyklus aufrecht gehalten werden kann (Tab.1). Hierzu wurden 25 Schnecken mit 3-5 Sporozysten transplantiert und nach 42 Tagen auf den Cercarienausstoß hin überprüft. Von den 25 *B.glabrata* überlebten 14, von denen 6 Cercarien freisetzten. Dies entspricht einer Quote von ca. 40%.



Tabelle1: Zusammenfassung der Resultate, die bei der Transplantation erzielt werden konnten.

Infizierte Schnecken	Anz. Cercarien	Endwirtinfektion	Anz. Adulter
S1	500	+	130 M, 13 W
S2	166	-	-
S3	833	+	162 M
S4	866	+	129 M
S5	833	+	62 M
S6	2000	+	247 M

Mit Ausnahme von S2 wurde je ein Hamster mit den Larven infiziert und nach 49 Tagen auf die Entwicklung von Adulten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass es gelungen ist, aus transplantierten Schnecken Cercarien zu gewinnen, die in der Lage sind, den Endwirt zu penetrieren und sich dort zu adulten Tieren zu entwickeln. Versuche zur Transplantation beschossener Sporozysten stehen derzeit noch aus.

Eine Alternative zu dem beschriebenen Ansatz ist das Particle Bombardment von Miracidien. Hierzu wurden etwa 1000 Larven mit dem Vektor hsp70-GFP-hsp70 transformiert und im Anschluss zur natürlichen Zwischenwirtinfektion eingesetzt. Die mikroskopische Kontrolle nach dem Beschuss zeigte eine breite Verteilung von Goldpartikeln innerhalb der Larven (vgl. Abb.21B), und dass etwa 50% ein normales Schwimmverhalten offenbarten. Die Miracidien wurden dann in ein Becherglas mit 40 Schnecken gegeben und einen Tag später in ein Aquarium überführt. Nach 6 Wochen wurden sie erstmalig zum Cercarienausstoß illuminiert. Es zeigte sich, dass aus 4 der infizierten Schnecken insgesamt ca. 100 Cercarien gewonnen werden konnten. Um zu beweisen, dass diese Larven auch das Transgen trugen, wurde die DNA aus den Cercarien isoliert und diese für eine PCR mit GFP-spezifischen Primern eingesetzt (Abb.26). Das erwartete Amplifikationsprodukt von 420 bp verdeutlicht, dass das Konstrukt auch nach der Cercariogenese noch nachweisbar ist, was zunächst einmal die Stabilität des Konstruktes innerhalb des Organismus zeigt. Ob es sich hierbei um eine stabile Transformation handelt, oder ob das Plasmid extrachromosomal weitergegeben wurde, ist noch unklar.

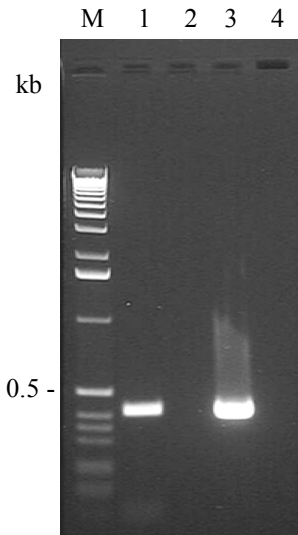


Abb.26: PCR mit GFP-spezifischen Primern und genomischer DNA zum Nachweis des Transgens. 1= Cercarien aus transformierten Miracidien, 2= Cercarien aus untransformierten Miracidien, 3= Positivkontrolle (Plasmid als Template), 4= Negativkontrolle (ohne Template)

Als nächstes sollen weitere Cercarien aus diesem Ansatz zur Endwirtinfektion eingesetzt werden. Resultate, ob sich aus diese Larven adulte Schistosomen entwickeln, und ob sich auch dort das Transgen nachweisen lässt, stehen noch aus.

❖ 3.1.13 Erste Experimente zur funktionellen Analyse eines *Schistosoma*-Promotors im homologen System

Die Aktivität und Induzierbarkeit des Promotors im Konstrukt hsp70-GFP-hsp70 konnte im homologen System, wie unter 3.1.6 in dieser Arbeit dargestellt, demonstriert werden. Anhand der Sequenzdaten der 5'UTR ergaben sich folgende Fragen: Handelt es sich bei den gefundenen HSE's um echte regulatorische Einheiten, und welches der beiden putativen HSE's vermittelt die Hitzeschockantwort? Eine Antwort darauf, sollte durch den Gentransfer von verschiedenen HSE-Deletionsklonen in adulten Schistosomen gefunden werden.

◆ 3.1.13.1 Konstruktion von hsp70 Promotordeletionsklonen und deren Funktion im heterologen System

Erste Hinweise auf die Frage, welches HSE verantwortlich ist, ergaben sich aus den Ergebnissen von Levy-Holtzmann und Schechter (1994), die in „gel shift assays“ gezeigt haben, dass nur mit HSE 1 und Proteinextrakten Hitze-geschockter Würmer eine Retardierung im Gel zu erkennen war. Die Schlussfolgerung war, dass es unter den gegebenen Bedingungen einen Transkriptionsfaktor gibt, der die Sequenz des HSE1 erkennt, nicht aber die des HSE 2. Wie sich in späteren Studien dieser Arbeitsgruppe zeigte, gibt es einen Hitzeschockfaktor (Levy-Holtzmann & Schechter, 1996), der zudem auch noch *in vitro* be-

vorzugt die von der Konsensussequenz (3x nGAAn) abweichende Form des HSE 1 (nGTAn im dritten Pentamer) bindet (Lardans et al., 2001).

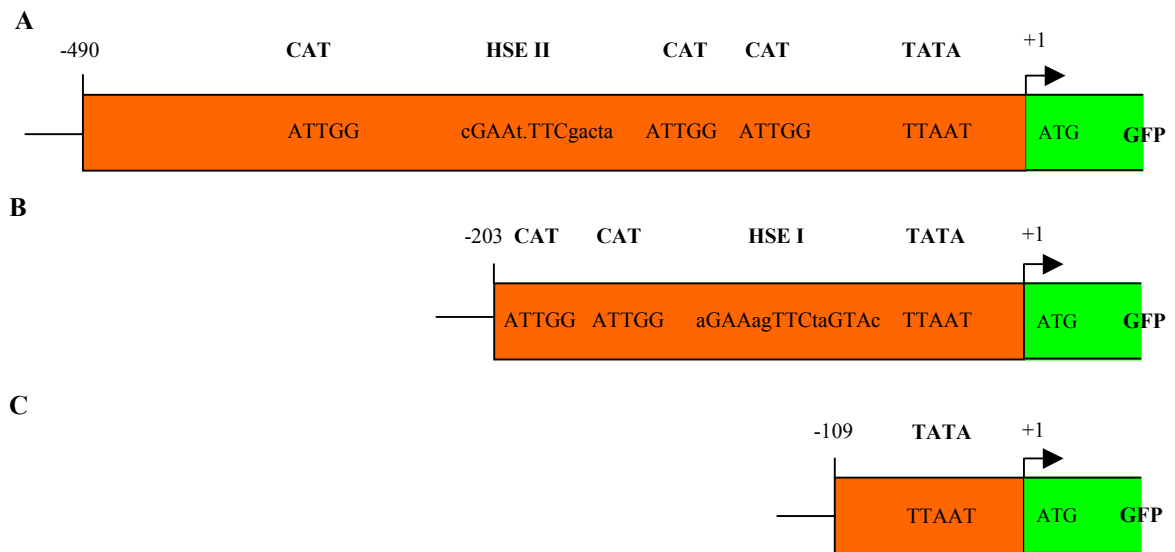


Abb.27: Deletions-Klone des hsp70-Promotors  
**A:** HSE Del 1; **B:** HSE Del 2; **C:** HSE Del 1/2. Die Reihenfolge der noch verbliebenen regulatorischen Einheiten innerhalb der 5'UTR sind mit ihrer Sequenz angegeben, die Abstände untereinander sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Die weiter 3' gelegenen Sequenzen des Inserts entsprechen dem hsp70-GFP-hsp70 Transformationsvektor.

Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden zunächst unterschiedliche Deletionsklone des Promotors hergestellt (Abb.27), die sich durch das Fehlen einzelner oder beider HSE auszeichnen.

Bevor diese Konstrukte für das Particle Bombardment mit adulten Schistosomen eingesetzt wurden, erfolgte eine Transfektion von CHO Zellen, mit dem Ziel, erste Hinweise auf eine Auswirkung der fehlenden Motive auf die Reporterexpression im heterologen System zu erlangen.

Die konfokale Mikroskopie offenbarte fluoreszierende Zellen nur in den Ansätzen, die mit Konstrukten transfiziert worden waren, die noch ein intaktes HSE1 enthielten (Abb.28A/B). Die Vektoren HSE Del 1 und HSE Del 1/2 führten zu keiner Transgenexpression (Abb. 28C/D).

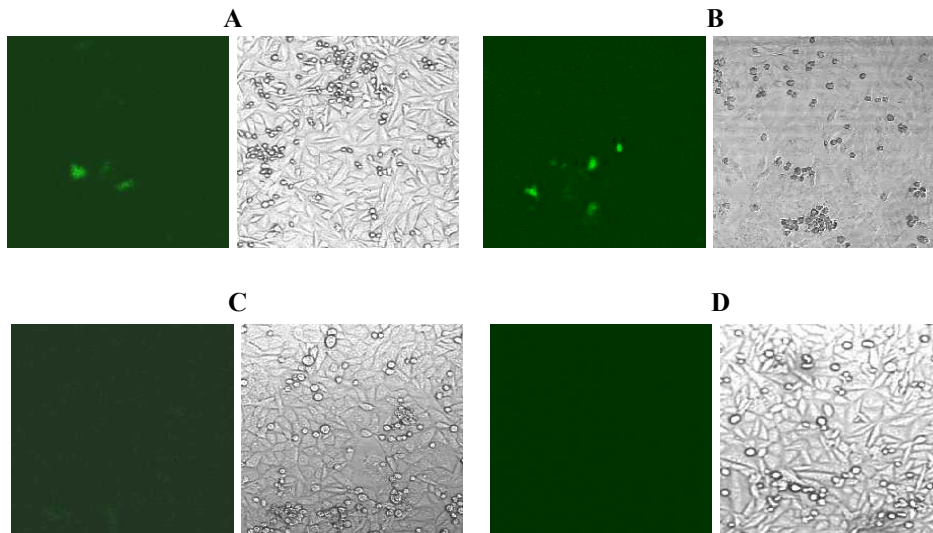


Abb.28: Transfektion von CHO Zellen mit den hsp70-Promotor-Deletionsklonen  
 CHO Zellen wurden mit den Konstrukten **A**: hsp70-GFP-hsp70; **B**: HSE Del 2; **C**: HSE Del 1; **D**: HSE Del  $\frac{1}{2}$  über Lipofektion transfiziert und nach 4 h für 3 bei 42°C inkubiert. Bis zur abschließenden Mikroskopie wurden die Zellen 36 h post Hitzeschock unter Standardbedingungen weiterkultiviert.

Das Ergebnis demonstriert, dass HSE 1 auch für die Hitzeschockantwort im heterologen System verantwortlich erscheint.

#### ◆ 3.1.13.2 Transformation adulter Schistosomen mit den Deletionsplasmiden

Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob sich dieses Ergebnis auch im homologen System reproduzieren lässt. Hierzu wurden adulte Schistosomen-Männchen mit Hilfe des neuentwickelten Gentransfersystem transformiert und 24 h nach Beschuss mit Ausnahme einer Negativkontrolle einem Hitzeschock (4 h, 42°C) ausgesetzt. Nach einer weiteren Inkubation dieser Würmer für 24 h unter Standardbedingungen, erfolgte die mikroskopische Auswertung. Hierbei zeigte sich, dass in sämtlichen Würmern, die einem Hitzeschock ausgesetzt waren, mehr oder weniger fluoreszierende Bereiche zu finden waren, die sich nicht quantifizieren ließen (Resultate nicht gezeigt). Die Kontrollpopulation ohne Hitzeschock zeigte hingegen, wie erwartet, keine Fluoreszenz. Diese Resultate offenbarten, dass eine Quantifizierung notwendig ist, um entsprechende Unterschiede in der GFP Expression der verschiedenen Klone in adulten Schistosomen darstellen zu können.

❖ 3.1.14 Quantitative Promotoranalyse mittels des Luciferasesystems

◆ 3.1.14.1 Luciferase als Reportergergen

Die Luciferase (LUC) aus *Photinus pyralis* eignet sich als Reportergergen (Gould & Subramani, 1988) für quantitative Analysen, wie bei Regulationsmechanismen der Genexpression. Die Quantifizierung erfolgt über einen Enzymassay, bei dem Luciferin unter Beteiligung von ATP durch die Luciferase zu Oxyluciferin umgewandelt wird. Die dabei entstehende Lichtemission kann luminometrisch gemessen werden. Der Vorteil gegenüber herkömmlichen Enzymreaktionen ist, dass die Aktivität direkt nach der Translation gemessen werden kann, da es keine post-translationellen Modifikationen gibt (de Wet et al., 1987). Innerhalb der Chemilumineszenz-Reaktionen ist der Luciferase-Nachweis sehr sensitiv (Wood, 1990) und zeigt kaum Hintergrundaktivität.

Im Folgenden wurde das Luciferasegen aus dem pG13 Vektor der Fa. Promega verwendet. Es hat eine modifizierte Kodierregion, die für transfizierte Eukaryontenzellen optimiert wurde. Davis et al. (1999) haben gezeigt, dass es sich auch als Reportergergen in Parasiten eignet.

◆ 3.1.14.2 Klonierung des Luciferasegens in die bereits vorhandenen Deletionsklone

Ausgehend von den in Abb.27 dargestellten Deletionsklonen wurde im folgenden das GFP-Gen durch das Luciferase-Gen ersetzt. Mit Hilfe des pG13 Plasmids (Promega) und Luciferase-spezifischen Primern (*Nco*-Luci-5'Primer, *Luci-Bam*-3'Primer) wurde das Gen in einer PCR mit den terminalen Schnittstellen amplifiziert. Nach einem Restriktionsverdau des PCR-Produkts wurde dieses in die *Nco* I/*Bam* HI geöffneten Deletionskonstrukte ligiert. Die daraus resultierenden Transformationsvektoren sind in der folgenden Abb.29 dargestellt.

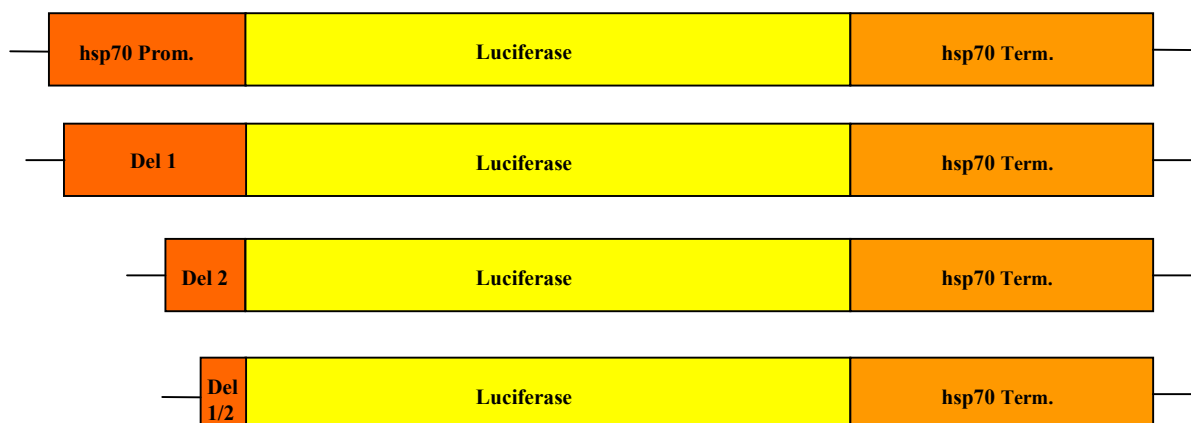


Abb.29: Die Transformationsvektoren hsp70-LUC-hsp70 und die entsprechenden Promotor-Deletionsklone  
Schematische Darstellung der maßstabsgerechten Größenverhältnisse (hsp70 und Prom.Del 5'UTR: s. Abb.27, Luciferse: 1630 bp, hsp70 3'UTR: 808 bp) der Inserts, die sich in pUC18/pStBlue1 befinden.

Die Fertigstellung der gezeigten Plasmide wurde erst zum Ende dieser Arbeit erreicht. Weiterführende Resultate bezüglich der Funktionalität der Vektoren und dem Einsatz für das Particle Bombardment adulter Schistosomen bzw. Larven standen zu diesem Zeitpunkt noch aus .

### 3.2 Ansätze zur Immortalisierung von *Schistosoma*-Zellen

In diesem Teil der Promotionsarbeit werden erste Ansätze beschrieben, die zur Etablierung einer permanenten Zelllinie von *Schistosoma mansoni* beitragen sollen. Bisherige Versuche, schistosomale Zellen zu isolieren und sie anschließend durch die Zugabe mitogener Substanzen zur Teilung anzuregen, waren erfolglos (D. Barnes, persönliche Mitteilung).

Andreas Kampkötter identifizierte 1999 in seiner Promotionsarbeit das ras-Homolog aus *S. mansoni*. Mit Hilfe verschiedener ras-Gene und weiterer genetischer Elemente ist es schon mehrfach gelungen, immortale Zelllinien zu erzeugen (Land et al., 1983; Ruley, 1983; Amsterdam et al., 1988), so auch bei ausdifferenzierten humanen Zellen, die mit dem LargeT Antigen von SV40, einem mutierten h-ras und der Telomerase zur permanenten Teilung angeregt wurden (Hahn et al., 1999).

Das Projekt sah nun vor, einen ähnlichen Ansatz auch bei Schistosomen durchzuführen. Dazu sollte zunächst das Sm-ras-Gen an zwei Aminosäurepositionen verändert werden (s.u.) und in verschiedene Transformationsvektoren kloniert werden. Anschließend sollten isolierte Zellen aus *S. mansoni* mit diesen Konstrukten und/oder dem LargeT Antigen transfiziert werden, um eine dauerhafte Teilung zu initiieren. Das Gen für die Telomerase von Schistosomen ist bislang noch nicht identifiziert, so dass darauf nicht zurückgegriffen werden konnte.

In den folgenden Kapiteln soll nun dargestellt werden, welche Arbeiten auf dem Weg zur Immortalisierung durchgeführt wurden.

#### ❖ 3.2.1 Zielgerichtete Punktmutation des ras-Homologs aus *S. mansoni*

Wie sich in bisherigen Studien von Ras gezeigt hatte, führt der Austausch von Glycin zu Valin (Position 12) und der Austausch von Glutamin zu Leucin (Position 61) zur höchsten Transformationseffektivität des Moleküls (Spandidos & Wilkie, 1984; Der et al., 1986). Daher war zu Beginn des Projektes die Aufgabe, das ras Homolog aus *Schistosoma* gezielt an diesen Aminosäurepositionen zu mutieren.

Ausgehend vom Klon 18/2 (Kampkötter, 1999), der u.a. das komplette ORF des Gens in pBluescript SK- enthält, wurde die zielgerichtete Mutagenese durchgeführt. Mit Hilfe von komplementären Primern, die den Bereich des 12. bzw. 61. Codons umfassten und die einen entsprechenden Nukleotidaustausch (12: GGT -> GTT, 61: CAA -> CTA) beinhalten, wurde eine PCR durchgeführt, bei der das gesamte Plasmid amplifiziert wurde. Das Resultat dieser PCR waren Amplifikationsprodukte in Form doppelt „genickter“ Plasmide,

die an den Positionen 12 bzw. 61 die eingeführte Mutation aufwiesen. Um sich vor der anschließenden Transformation der Plasmide in entsprechende Bakterien der Templatstränge, die keine Mutation aufwiesen, zu entledigen, wurde ein *Dpn* I Restriktionsverdau durchgeführt. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass *Dpn* I selektiv methylierte DNA schneidet, in diesem Fall also nur das Template. Die darauf folgende Transformation wurde mit „superkompetenten“ Bakterien ( $> 10^9$  cfu/ $\mu$ g) durchgeführt, da die Aufnahme beschädigter DNA Moleküle eine sehr hohe Kompetenz voraussetzt. Die Reparatur und Vervielfältigung der Plasmide übernehmen die Bakterien. Abb.30 zeigt noch einmal schematisch den Ablauf der Mutagenese.

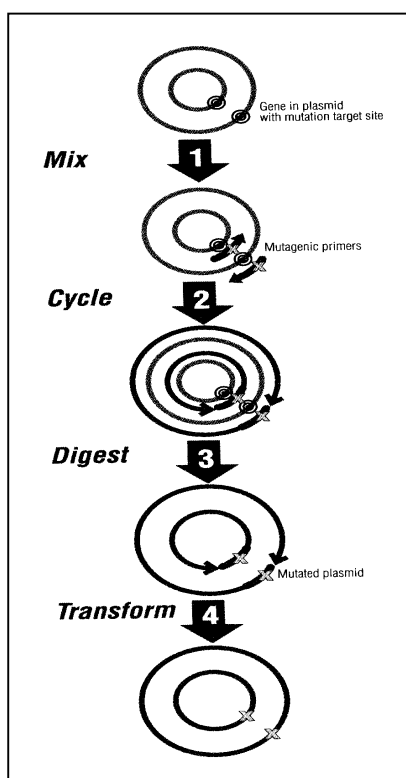


Abb.30: Grafische Darstellung der Strategie und des Ablaufes zur zielgerichteten Punktmutation der ras-Homologs aus *Schistosoma mansoni*.

Die Plasmide wurden aus den putativ positiven Transformanten präpariert und die gewonnene DNA einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen. Dieser diente jedoch nur zur Abklärung, ob es sich bei den Plasmiden um den Klon 18/2 handelte, da die eingefügten Mutationen nicht Bestandteil einer Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym waren.

Zur Verifikation der erfolgreichen Mutagenese wurde abschließend eine Sequenzierung durchgeführt. Diese ergab, dass sowohl die Mutationen G12V, als auch Q61L erfolgreich durchgeführt worden waren (Abb.31). Diese beiden Klone (18/2 G12V, 18/2 Q61L) stellten nun die Basis für die Klonierung weiterer Transformationsvektoren dar.



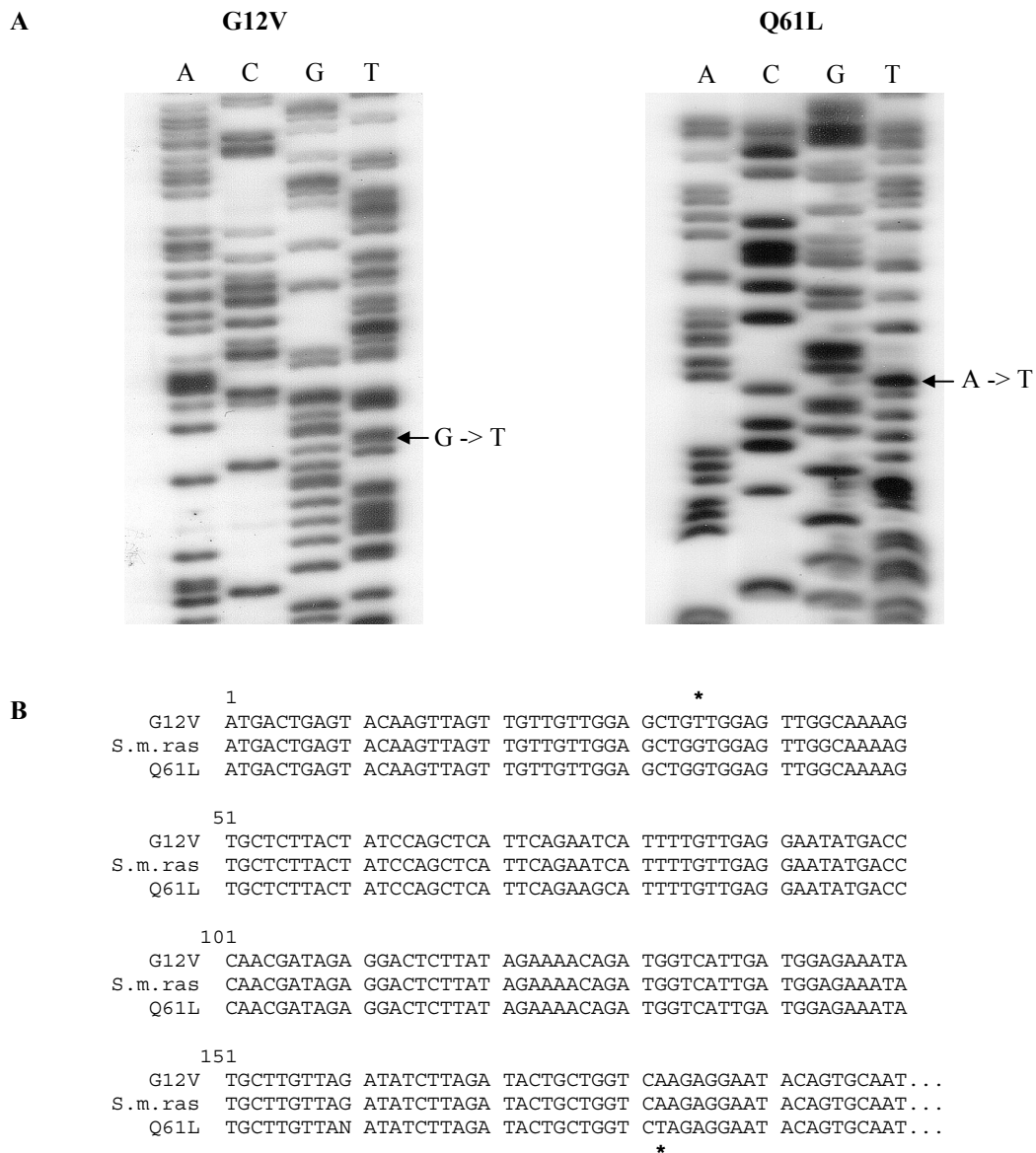


Abb.31: Sequenzierung der mutierten ras Gene (A) und Alignment der erzeugten Sequenzen gegen Sm-ras Wildtyp (B). Die Mutationen sind gekennzeichnet.

### ❖ 3.2.2 Klonierung von ras 18/210

Anfangs standen drei ras Klone zur Verfügung (18/2, 18/9, 18/10), wobei nur 18/2 den kompletten ORF beinhaltet, nicht jedoch die lange 3'UTR mit den putative Polyadenylierungsstellen, von denen es insgesamt sechs gibt (Kampkötter, 1999). Letztere wiederum sind in Klon 18/10 vollständig enthalten, so dass die Fusion beider einen Klon mit ORF und sämtlichen PolyA-Signalen ergeben sollte. Hierzu wurden 18/2 G12V bzw. 18/2 Q61L und 18/10 jeweils mit *Eco* RI und *Acc* I verdaut, wobei *Eco* RI Bestandteil der MCS aus pBluescript ist und 5' vom Klonanfang liegt und *Acc* I, das sich an Position 559 im Insert befindet. Die gerichtete Klonierung des kleinen Fragmentes aus 18/2 mit den Mutationen

in das *Eco* RI/*Acc* I geöffnete Plasmid mit 18/10 ergab den Vektor 18/210 (Abb.32), der über Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert wurde.

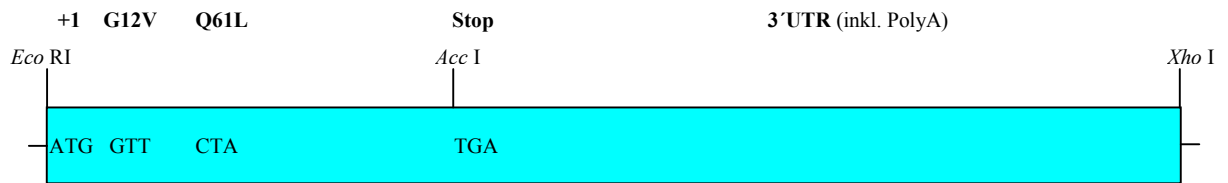


Abb.32: Sm-ras Klon 18/210 (wt, G12V, Q61L)  
Schematische Darstellung der maßstabgerechten Größenverhältnisse des neuen Ras-Klons 18/210 mit dem Transkriptionsstart und der vollständigen 3'UTR

### ❖ 3.2.3 Funktionalitätstest zur Transformationspotenz der mutierten Ras-Moleküle

Nachdem die Mutagenese durchgeführt worden war, blieb die Frage offen, ob sich aus den eingeführten Mutationen auch eine höhere Transformationspotenz des Moleküls ableiten lässt. Um Klarheit zu erlangen, wurde auf ein etabliertes System zurückgegriffen, das am Max-Planck-Institut (MPI) in Dortmund entwickelt wurde. Hierbei werden RK13-Zellen („rabbit kidney epithelium like cells“) mit unterschiedlichen Plasmiden cotransfiziert. Diese Vektoren enthalten zum einen, unter der Kontrolle eines SV40 Minimalpromotors, den ORF des zu untersuchenden ras-Gens und den ORF des humanen raf-Wildtyp Gens, desweiteren ein Reportergenkonstrukt, das als Resultat der Ras/Raf-Interaktion zur Luciferasetranskription befähigt ist (Quack, persönliche Mitteilung). In Abhängigkeit der ras-Aktivität kommt es nun zu einer mehr oder weniger starken Luciferaseexpression, die im Enzymassay gemessen werden kann. Je höher die Aktivität von Ras ist, um so stärker wird Luciferase exprimiert. Voraussetzung ist allerdings, dass zunächst Ras über einen Farnesylrest mit der Zellmembran interagiert und anschließend mit dem Raf-Molekül einen aktiven Komplex eingeht (Daub et al., 1998). Die entscheidende Modifikation des Moleküls (Prenisylierung: Farnesylierung oder Geranysylierung) erfolgt über die C-terminale Erkennungssequenz CAAX (Fu & Casey, 1999), die aus den letzten vier Aminosäuren besteht und bei Sm-Ras die Sequenz CCIQ hat (Kampkötter et al, 1999), wobei es zu einer Farnesylierung des ersten Cysteins dieser Sequenz kommt (Osman et al., 1999).

Dieses Testsystem wurde jedoch zur Erforschung der humanen ras-Moleküle entwickelt, so dass die Anwendbarkeit auf das Sm-ras nicht gewährleistet werden konnte. Zunächst mussten nun entsprechende Expressionsklone mit den einzelnen mutierten/wt-ras ORFs erzeugt werden. Hierzu wurden Primer zur Amplifikation des ras Gens verwendet,

denen terminal Restriktionsschnittstellen für *Kpn* I (5'Primer, RasTQ5) und *Eco* RI (3'Primer, RasTQ3kurz) angehängt worden waren. Die Klonierung erfolgte anschließend über diese Schnittstellen in einen modifizierten pSVK 3 Expressionsvektor, der von Thomas Quack (MPI, Dortmund) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Nachdem die Konstrukte über Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert worden waren, wurden die Transfektionsexperimente am MPI in Dortmund von Thomas Quack durchgeführt. Die Resultate sind in der folgenden Abb.33 dargestellt.

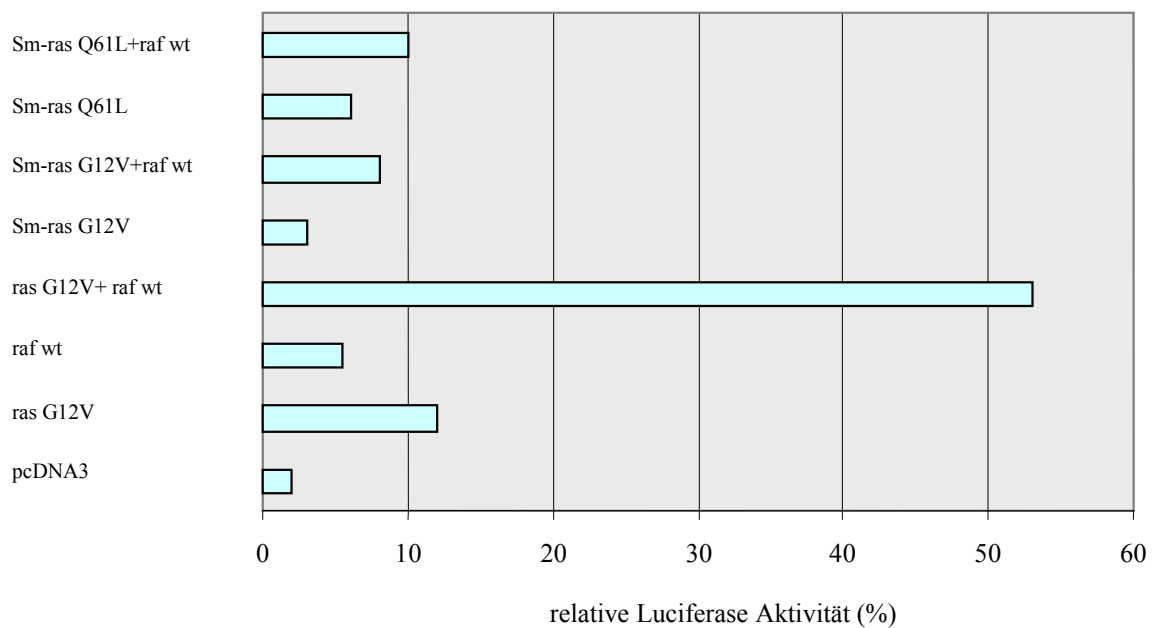


Abb.33: Luciferaseaktivitätsmessung nach Transfektion von RK13 Zellen mit unterschiedlichen Plasmiden.  
(pcDNA3: Reportergenvektor, ras G12V: H-ras G12V in pSVK 3, raf wt: humanes raf Wildtyp in pSVK 3, Sm-ras G12V in pSVK 3, Sm-ras Q61L in pSVK3)

Aus der Grafik ergibt sich, dass es unter den gegebenen Bedingungen im heterologen System nicht zu einer gesteigerten Luciferaseaktivität kam, was zu der ersten Schlussfolgerung führte, dass die mutierten Sm-ras Moleküle in diesem Test keine verstärkte Transformationspotenz besaßen.

Die Verankerung von Ras über den Farnesylrest an der Innenseite der Zellmembran ist der erste Schritt der Signalkaskade. Im Gegensatz zur humanen ras Sequenz, die der CAAX-Konsensus-Sequenz entspricht, divergiert bei Sm-Ras die dritte Aminosäure vom C-Terminus gesehen mit einem Cystein von dieser Sequenz. Um sicher zu stellen, dass es aufgrund dieser Abweichung nicht zu einer verminderten oder ausbleibenden Prenylsilierung des Sm-Ras im Testsystem gekommen war, wurden die letzten vier AS durch die Se-

quenz CVLS des humanen h-ras ersetzt. Diese neuen Plasmide wurden dann erneut in die Transfektion von RK13 Zellen eingesetzt (Abb.34). Die Verwendung verschiedener Mengen (1-4 fach) an Plasmiden sollte gewährleisten, dass eine eventuell verminderte Prenyslierung ausgeglichen wird.

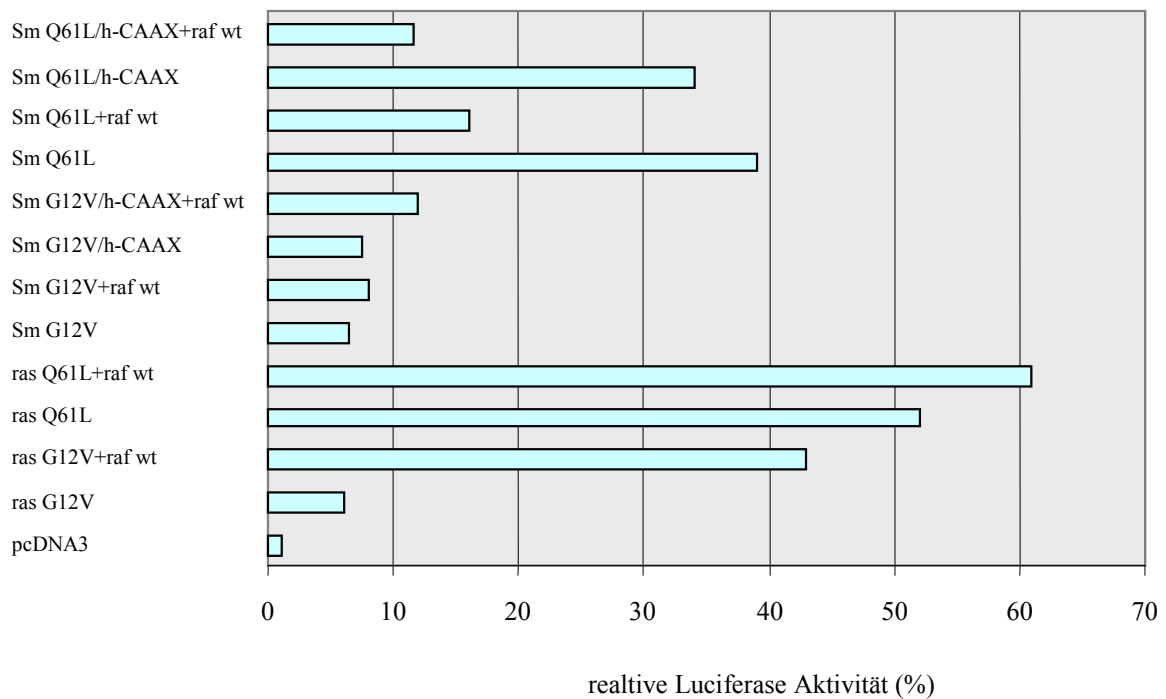


Abb.34: Luciferaseaktivitätsmessung nach Transfektion von RK13 Zellen mit unterschiedlichen Plasmiden. (h-Ras: 80 ng Plasmid-DNA/Ansatz, Sm-Ras: 320 ng Plasmid-DNA/Ansatz)  
 (pcDNA3: Reportergenvektor, ras G12V: H-ras G12V in pSVK 3, raf wt: humanes raf Wildtyp in pSVK 3, Sm G12V: Sm-ras G12V in pSVK 3, Sm G12V/h-CAAX: Sm-ras G12V mit h-ras CAAX-Box in pSVK 3, Sm Q61L: Sm-ras Q61L in pSVK3, Sm Q61L/h-CAAX: Sm-ras Q61L mit h-ras CAAX-Box in pSVK 3)

Wie sich zeigt, kam es beim Einsatz der 4-fachen DNA-Menge von Sm-ras Q61L zu einer signifikant höheren Luciferaseaktivität, was auf eine erhöhte Transformationspotenz schließen lässt. Bei der Mutation G12V konnte in diesem Test keine verstärkte Luciferaseaktivität gemessen werden.

Da es sich bei dem hier verwendete Test um ein mammalisches System handelt, mit dessen Hilfe ein Invertebratenmolekül überprüft wurde, sind diese Resultate nur bedingt aussagekräftig, so dass mit den Versuchen der Immortalisierung über diese genetischen Elemente fortgefahren wurde.

❖ 3.2.4 Klonierung von Plasmiden zur Immortalisierung

◆ 3.2.4.1 hsp70-ras 18/210 (wt, G12V, Q61L) und ER60-ras 18/210 (wt, G12V, Q61L)

Die ersten Konstrukte, die für die Transfektion von *Schistosoma*-Zellen kloniert wurden, umfassten die mutierte bzw. Wt Kodierregion des Sm-ras-Gens, einschließlich der homologen 3'UTR mit den putativen Polyadenylierungs-Sequenzen. Als Promotor wurden die 5' UTR von hsp70 und ER60 verwendet.

Für die Klonierung des hsp70-Promotors wurde auf den Klon #944 (s. 2.1.5) zurückgegriffen. Dieser enthält 530 bp der 5'UTR des induzierbaren hsp70-Gens. Aus diesem Klon wurde der Promotor *Sst I/Bam HI* herausgeschnitten und in die mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektoren 18/210 (Wildtyp-Ras, Ras mit Mutation G12V und Ras mit Mutation Q61L) gerichtet ligiert. Das daraus resultierende Konstrukt ist in Abb.35A dargestellt.

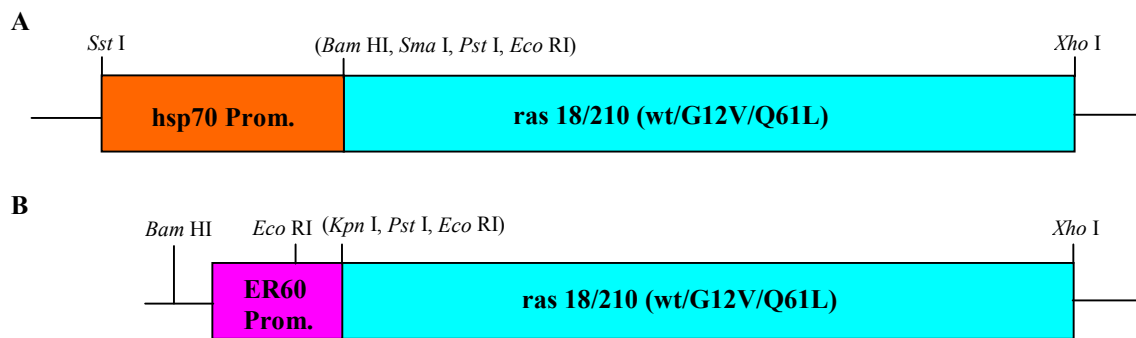


Abb.35: Transformationsvektoren hsp70- (A)/ER60- (B) ras 18/210 (wt, G12V, Q61L) Schematische Darstellung der maßstabsgerechten Größenverhältnisse des Inserts, welches sich in pBluescript SK<sup>-</sup> befindet. Die für die Klonierung relevanten Schnittstellen sind angegeben.

Für die Herstellung der Plasmide ER60-Ras 18/210 (wt/G12V/Q61L) wurden 290 bp der 5'UTR des Cystein-Protease Gens *Hind III/Sst I* aus dem Plasmid #839 (s. 2.1.5) herausgeschnitten und die überhängenden Enden mit einer S1-Nuklease geglättet. Die Konstrukte ras 18/210 (wt/G12V/Q61L) wurden zeitgleich jeweils mit *Sma I* geschnitten, woraus sich direkt geöffnete Plasmide mit glatten Enden ergaben. Im Anschluss erfolgte die ungerichtete Ligation des Promotors in die ras-Konstrukte (Abb.35B). Durch die in der 5'UTR an Position 190 befindlichen *Eco RI* Schnittstelle, konnte eine Verifikation der korrekten Orientierung durchgeführt werden.

Auf einen Funktionalitätstest konnte bei diesen Konstrukten nicht zurückgegriffen werden. Da die Promotoren jedoch sowohl im heterologen, als auch im homologen System

positiv getestet wurden (s. Ergebnisse 3.1.6-3.1.9) kann die Funktionsfähigkeit der Plasmide vorausgesetzt werden, auch wenn sie abweichend die 3'UTR des ras-Gens beinhalten.

◆ 3.2.4.2 ER60-ras(wt, G12V, Q61L)-ER60

Um einen alternativen Transformationsvektor in Händen zu halten, sollte im Folgenden die 3'UTR des Sm-ras durch den ER60-Terminator ersetzt werden.

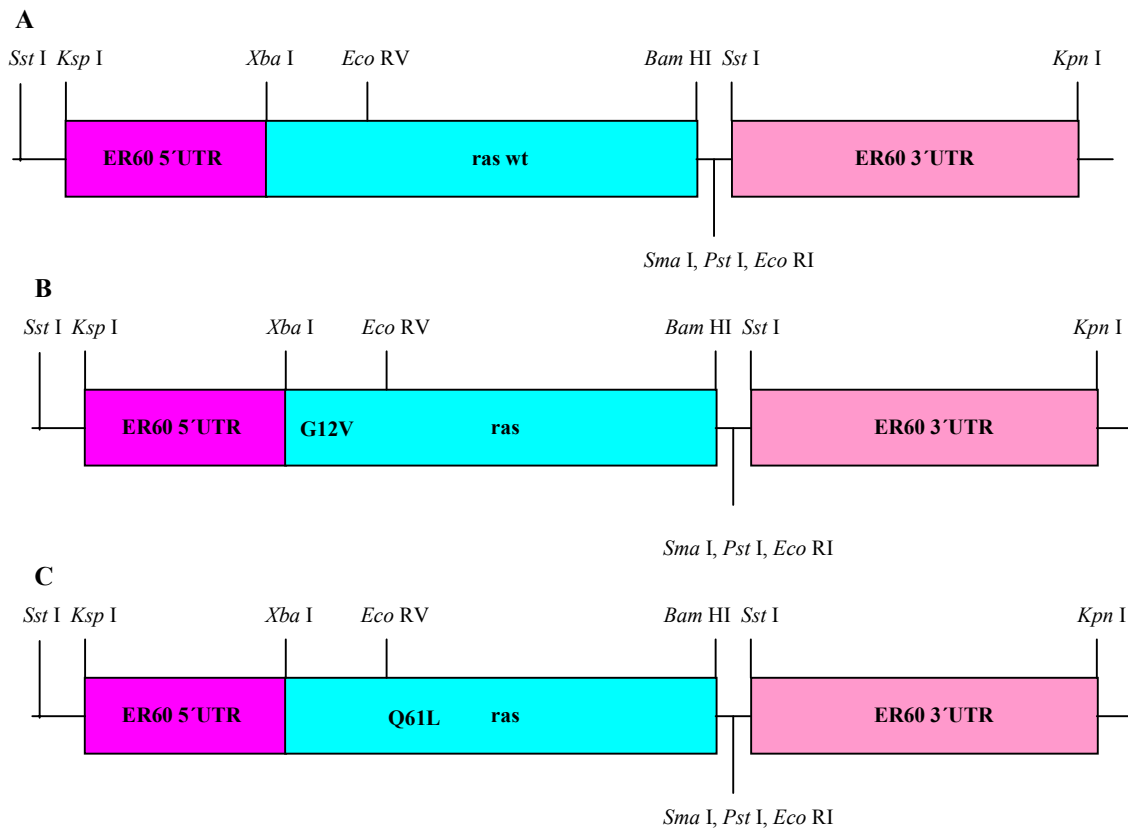


Abb.36: Transformationsvektoren ER60-Ras(wt (A), G12V (B), Q61L (C))-ER60  
Schematische Darstellung der maßstabgerechten Größenverhältnisse (ER60 5'UTR: 290 bp, Ras: 570 bp, ER60 3'UTR: 480 bp) des Inserts, welches sich in pBluescript SK<sup>-</sup> befindet. Die für die Klonierung relevanten Schnittstellen sind angegeben.

Bei dieser Plasmidkonstruktion wurde auf die mehrfach erfolgreich angewandte Technik der PCR-basierenden Klonierung zurückgegriffen und sie ist daher mit der Konstruktion von ER60-GFP-ER60 vergleichbar. Als Template für die PCR dienten die drei verschiedenen 18/210 Klone; die Ligation in den 60-60 Vektor erfolgte hierbei auch über die Schnittstellen *Xba* I und *Bam* HI. Abb.36 zeigt eine schematische Darstellung der Transformationsvektoren.

Die Verwendbarkeit wurde vorausgesetzt, da die regulatorischen Elemente bereits erfolgreich eingesetzt wurden. Diese Transformationsvektoren sollten nun im Anschluss zur Transfektion isolierter Zellen aus adulten und larvalen Schistosomen eingesetzt werden.

#### ❖ 3.2.5 Isolation von Zellen aus adulten und larvalen Schistosomen

Die Isolation von schistosomalen Zellen wurde in Anlehnung an bereits veröffentlichte Protokolle durchgeführt (Hobbs et al., 1993; Bayne et al., 1994).

Die Aufarbeitung erfolgte getrennt nach Entwicklungsstadien. Zunächst wurden die Tiere (je ca. 30 Adulte oder ca. 500 Sporocysten) in 400 µl ATV-Puffer aufgenommen und für 30 sec homogenisiert (Ultra-Turrax T8, IKA Labortechnik; Stufe 3). Die Spitze des Homogenisators wurde anschließend mit 1 ml SM-Medium von den Resten gesäubert und der komplette Ansatz in ein 15 ml Falcon überführt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei RT, währenddessen sich die Einzelzellen von den noch verbliebenen Zellverbänden durch unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit trennen sollten. Danach wurde 1 ml des Überstandes in ein neues Falcon überführt und das Pellet in der Restflüssigkeit erneut homogenisiert. Nachdem das Homogenat mit dem Überstand vereinigt worden war, erfolgte die Zugabe von 0.1 U Collagenase und 0.8 U Dispase (Roche) zur weiteren Auflösung noch bestehender Zell-Zell-Verbindungen. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz bei 37°C für 40 min inkubiert, bevor er für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert wurde. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte mit 1 ml SM-Medium inkl. 10% FCS. Jeweils 100 µl dieses Ansatzes wurden in 24-well Platten verteilt und für 5 min bei RT inkubiert, bevor 1 ml frisches SM-Medium mit 10% FCS hinzugegeben wurde. Die anschließende Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 24 h nach der Isolation zeigte sich unter mikroskopischer Kontrolle, dass sich trotz der Behandlung neben vermeintlichen Einzelzellen noch große Zellverbände in den einzelnen Ansätzen befanden. Nach dem Austausch von 750 µl altem gegen frisches Medium, wurden die Ansätze weiterkultiviert. 48 h nach der Aufarbeitung zeigte sich ein rapider Abfall des pH-Wertes (< 6), und es stellten sich vermehrt Kontaminationen ein. Letztlich konnten keine vitalen Strukturen mehr beobachtet werden.

Abschließend muss gesagt werden, dass es bislang nicht gelungen ist, Zellen soweit in Kultur zu halten, um sie anschließend transfizieren zu können.

#### ❖ 3.2.6 Transformation adulter Schistosomen mit mutierten GFP-Ras Fusionsproteinen

Um Zellen zum Verlassen ihres Differenzierungsstatus zu bringen (Tumorinduktion), sollten adulte Schistosomen mit Hilfe des neu entwickelten Gentransfersystems und durch

den Einsatz von Fusionsproteinen aus GFP und Ras G12V, Q61L transformiert werden. Unter der Annahme, dass beide Bestandteile des fusionierten Proteins ihre gewünschte Funktion erfüllen, würden sich zum einen morphologische Gewebeveränderungen aufgrund des mutierten Ras-Anteils zeigen, zum anderen sollten sich diese Bereiche unter mikroskopischer Kontrolle durch entsprechende GFP-Fluoreszenz auszeichnen. Eine Isolation dieser Bereiche aus den Würmern und eine sich anschließende Zellextraktion könnten möglicherweise zu einer immortalen Tumorzelllinie von Schistosomen führen.

◆ 3.2.6.1 Klonierung der Transformationsvektoren mit dem GFP-Ras(G12V/Q61L) Fusionsprotein

Die Vorgaben für die Konstruktion des Fusionsproteins waren, dass das GFP Gen 5' vom ras liegen sollte, um zu gewährleisten, dass am C-Terminus die Prenylsilierung des Moleküls stattfinden kann. Desweiteren sollte ein durchgängiges Leseraster einen vorzeitigen Transkriptionsabbruch verhindern. Aus diesem Grund wurde das Stopcodon des GFP-Gens im Laufe der Klonierung entfernt und durch das ATG des ras-Gens ersetzt. Letztlich sollten die regulatorischen Elemente des ER60 Gens eine Expression im homologen System gewährleisten.

Zunächst wurde der ORF der ras Mutanten über eine PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM Teasy kloniert. Anschließend wurde das PCR-Produkt über die flankierenden *Eco* RI Schnittstellen (aus pGEM-T easy) wieder herausgeschnitten und in den *Eco* RI geöffneten Vektor GFP-ER60 ligiert. Nachdem die korrekte Orientierung der ras Mutanten im neuen Plasmid über einen analytischen Restriktionslauf sichergestellt wurde, erfolgte eine PCR zur Amplifikation des gesamten Konstrukts mit Hilfe einer pfu-*Taq* Polymerase. Hierbei wurden die Primer so gewählt, dass der 5'Primer (ras-5) mit dem ATG des ras-Gens beginnt und das 5' Ende des 3'Primers (GFP-ras-3) das letzte kodierende Triplet des GFP aufweist. Die Religation des aus der PCR resultierenden Konstrukts brachte somit das Fusionsprotein hervor. Durch eine gerichtete Klonierung über *Nco* I/*Kpn* I des Fusionsproteins mit dem ER60 Terminator in einen ebenfalls *Nco* I/*Kpn* I geöffneten ER60-GFP-ER60 Vektor konnte das in Abb.37 dargestellte Konstrukt (ER60-FSP(G12V, Q61L)-ER60) fertiggestellt werden.



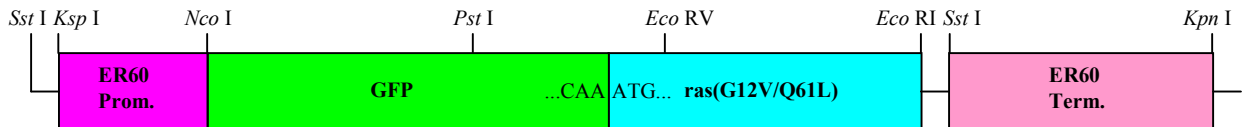


Abb.37: Transformationsvektoren ER60-FSP(G12V/Q61L)-ER60  
 Schematische Darstellung der maßstabgerechten Größenverhältnisse (ER60 5'UTR: 290 bp, GFP: 730 bp, ras: 570 bp, ER60 3'UTR: 480 bp) des Inserts, welches sich in pBluescript SK<sup>-</sup> befindet. Die für die Klonierung relevanten Schnittstellen sind angegeben

Letztlich erbrachte die Sequenzierung den Nachweis, dass sowohl der Übergang, als auch die Mutationen im Molekül korrekt vorhanden sind.

Eine anschließende Transfektion von COS-7 Zellen sollte den Nachweis erbringen, dass das GFP im Fusionsprotein funktionell ist. Wie in Abb.38 deutlich wird, sind fluoreszierende Zellen zu erkennen, die eine GFP-Funktion im Fusionsprotein beweisen.

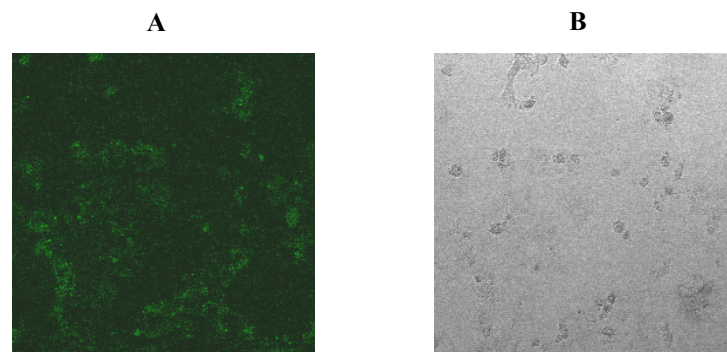


Abb.38: Transfektion von COS7-Zellen mit dem Konstrukt ER60-FSP-ER60  
 Die Detektion der GFP-induzierten Fluoreszenz erfolgte 48 h post Transfektion mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie. **A:** Fluoreszenz, **B:** Hellfeld

Die Funktionalität des ras-Anteils im Fusionsprotein konnte nicht nachgewiesen werden.

◆ 3.2.6.2 Gentransferexperimente mit dem Transformationsvektor ER60-FSP-ER60

Um den Vektor in adulte Schistosomen einzubringen, wurde auf das bewährte System des Particle Bombardments zurückgegriffen. Unter Verwendung verschiedener Parameter (0.6/1.6 µm Au, 1550/1800 psi) wurden Männchen beschossen und anschließend zur weiteren Kultivierung 1x nach dem Bombardment gewaschen. Nach etwa dreiwöchiger Kulti-

vierung der transformierten Individuen, mit wöchentlichem Mediumwechsel, zeigten sich bei einigen Tieren starke Gewebeveränderungen (Abb.39). Diese konnten sowohl bei Schistosomen festgestellt werden, die mit der G12V, als auch mit der Q61L Variante beschossen worden waren. Wie die Abb.39B zeigt, konnten in diesem Bereich vermehrt Goldpartikel gefunden werden, was auf die Anwesenheit des Transformationsvektors schließen lässt.

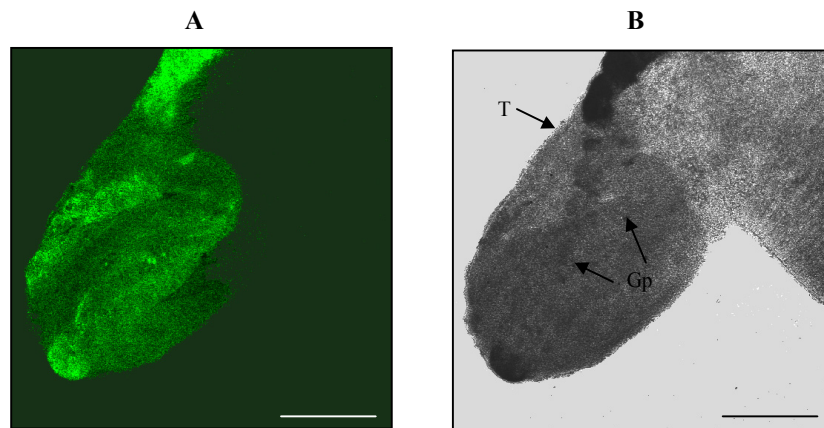


Abb.39: Gewebeveränderungen eines adulten *Schistosoma*-Männchens im posterioren Teil transformiert mit ER60-FSP(Q61L)-ER60. **A:** Fluoreszenz, **B:** Hellfeld. Gp= Goldpartikel, T= dorsales Tegument. (Größenstandard: 0.25 mm)

Dass sich in diesen Verformungen auch Fluoreszenz zeigte, offenbarte die konfokale Mikroskopie dieser Würmer (Abb.39A). Dieses Resultat lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese Verformungen auf den mutierten Ras-Anteil im Fusionsprotein zurückzuführen sind und liefert die ersten Hinweise darauf, dass eine Transformation differenzierter Schistosomenzellen möglich erscheint.

Im Anschluss an die Mikroskopie wurden diese Bereiche aus den Würmern selektiv herausgeschnitten und zur Zellisolation in SM-Medium inkl. 10 % FCS überführt. Aufgrund von Kontaminationen ist es im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gelungen, Zellen aus diesen Geweben in Kultur zu nehmen und für eine weitere Charakterisierung einzusetzen.

### ❖ 3.2.7 Klonierung des LargeT Antigen von SV40

Ein Vektor, der das komplette LargeT Antigen (inkl. der regulatorischen Elemente) enthielt, wurde freundlicherweise von Dr. Heiner Schaal (HHU, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Da es sich hierbei um einen Vektor handelt, der u.a. zur Expression von HIV-Hüllproteinen verwendet wurde (Rekosh et al., 1988), musste zunächst das LargeT-

Gen isoliert und in einen neutralen Vektor inkloniert werden. Dies geschah über eine *Kpn* I/*Bam* HI-Restriktion und anschließende gerichtete Ligation des LargeT in einen entsprechend geöffneten Vektor pBluescript SK<sup>-</sup> (Abb.40).

Neben dem Einsatz des gesamten LargeT-Gens sollte auch ein Vektor verwendet werden, nach dessen Klonierung das ORF des Gens unter der Kontrolle der regulatorischen Einheiten von ER60 steht (Abb.42). Arbeiten zur Klonierung dieses Vektors sind bereits in Angriff genommen worden, jedoch konnte die endgültige Fertigstellung noch nicht erreicht werden.

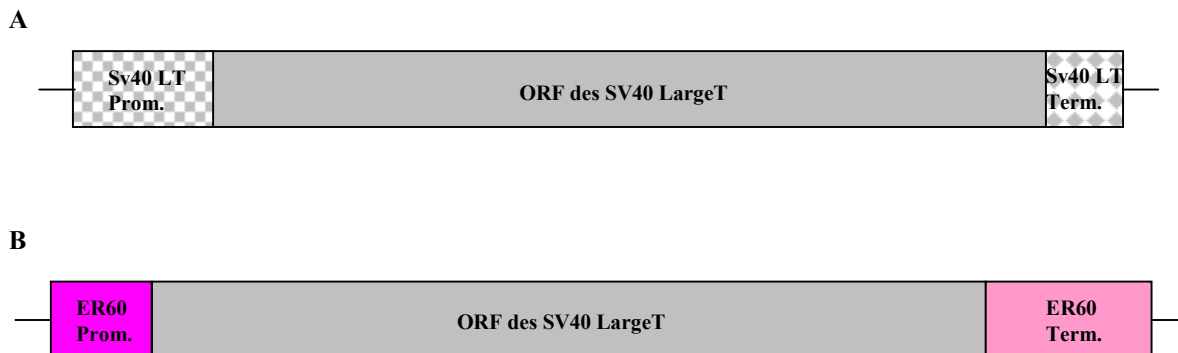


Abb.44: Die Transformationsvektoren SV40 LargeT (**A**) und ER60-LT/ORF-ER60 (**B**)  
Schematische Darstellung der Inserts in pBluescript SK<sup>-</sup>.

Aus diesem Grund sind bislang auch noch keine Experimente mit dem LargeT-Gen und einem mutierten Sm-Ras-Gen an adulten Schistosomen durchgeführt worden, sollen aber in Kürze vorgenommen werden.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Etablierung eines Gentransfersystems

Transformationssysteme sind wichtige molekularbiologische Werkzeuge zur funktionellen Charakterisierung von Genen und deren regulatorischen Elementen (Buono & Linsler, 1992). Aufgrund des Mangels an etablierten Protokollen zur Transformation multizellulärer Parasiten, haben bisher hauptsächlich heterologe Systeme wie z.B. *C. elegans* zur Charakterisierung Parasiten-spezifischer Gene beigetragen. Derartige Analysen haben jedoch wegen der Verschiedenheit der Organismen nur eine begrenzte Aussagekraft. Bei Parasiten sind Transfektionsprotokolle seit einiger Zeit für Protozoen verfügbar. Deren Verwendbarkeit zur funktionellen Analyse von Genen wurde mehrfach unter Beweis gestellt (Clayton, 1999; deKoning-Ward, 2000). Daher war es Ziel dieser Promotionsarbeit, ein Transformationsprotokoll für den humanpathogenen Parasiten *S. mansoni* zu entwickeln. Parallel zu dieser Arbeit durchgeführte Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass es prinzipiell möglich ist, die Methode des Particle Bombardments zur Transformation multizellulärer Parasiten einsetzen zu können. Davis et al. (1999) und Jackstadt et al. (1999) berichteten vom Gentransfer in *Ascaris*, *Litosomoides* und *C. elegans* mit unterschiedlich Verfahren des ballistischen Gentransfers. Die durchgeführten Versuch von Davis et al. (1999) deuteten zudem an, dass diese Technik auch für adulte Schistosomen geeignet sein könnte.

Bei den Particle Bombardment-Experimenten mit adulten Schistosomen kamen im Rahmen dieser Arbeit zwei Geräte (Helios Gene Gun/PDS1000) für den ballistischen Gentransfer zum Einsatz. Experimente mit der Gene Gun zeigten, dass diese Methode sehr materialintensiv ist. Bis zu 40% der eingesetzten Würmer überlebten das Bombardment und die anschließende Behandlung nicht. Die verbliebenen Individuen wiesen starke tegumentale Defekte auf, so dass eine Lokalisierung der möglichen Transgenaktivität nicht durchführbar war. Die molekularen Daten wiederum zeigten, dass sich innerhalb der überlebenden Würmer Transgen-Transkripte befanden, was ein deutlicher Hinweis auf einen gelungenen Gentransfer war. Die Resultate von Jackstadt et al. (1999) haben gezeigt, dass dieses Gerät für den Gentransfer in Filarien geeignet ist. Hierbei handelt es sich jedoch um einen vergleichsweise großen Parasiten, der durch eine Kutikula vor äußeren, mechanischen Einwirkungen besser geschützt zu sein scheint, als die nur von einem Tegument umgebenen Schistosomen. Aufgrund ihrer Größe lassen sich Filarien zudem besser fixieren.

Im Vergleich dazu ist die Prozedur mit der PDS 1000 die deutlich schonendere Variante. Erste Experimente zeigten, dass der Einsatz des Vakuums keinen Einfluss auf die

Würmer ausübte. Beim Particle Bombardment mit der PDS 1000 konnte eine Überlebensrate von nahezu 100% erzielt werden. Dies ist zum einen auf die geringere Druckwelle im Vakuum zurückzuführen, zum anderen auf eine deutlich feinere Verteilung der Goldpartikel auf dem „Macrocarrier“. Im Vergleich dazu wurden bei der Munitionsherstellung für die Gene Gun immer wieder größere Aggregate von Goldpartikeln innerhalb des Schlauches gefunden, die anschließend zu starken Verletzungen der Würmer führten. Die feine Verteilung von Mikroprojektilen während des Beschusses mit der PDS 1000 gewährleistet nicht nur eine breite Plasmidverteilung, sie schädigt den Wurm auch deutlich weniger.

Um festzustellen, ob sich diese Methode auch auf andere Entwicklungsstadien anwenden lässt, sind auch Particle Bombardment-Experimente mit Larven durchgeführt worden. Mit niederen Drücken ist es gelungen, *in-vitro* generierte Muttersporozysten zu transformieren. Auch bei diesen Individuen konnten nach dem Beschuss kaum tegumentale Schäden bei einer breiten Goldpartikelverteilung beobachten werden.

#### ❖ 4.1.1 Hsp70-induzierte GFP-Expression in Schistosomen

Die Klonierung des Plasmids hsp70-GFP-hsp70 und der Nachweis der Funktionalität dieses Konstrukts unter Hitzeschockbedingungen in mammalischen Zellen wurde in Zusammenarbeit mit Katja Kapp erfolgreich durchgeführt. Damit war gleichzeitig bewiesen, dass sich das eingesetzte GFP-Gen auch für Vertebratensysteme eignet, welches zuvor nur in Pflanzen verwendet wurde (Reichel et al., 1996).

Nach der Transformation adulter Männchen mit diesem Konstrukt und der PDS 1000 konnten die Präsenz des Plasmids, sowie die Transkription, Translation und Lokalisation der Transgenaktivität im adulten Männchen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu bisherigen Daten, die eine geringe hsp70-Expression ohne Hitze-Stress auch in Adulten zeigten (Neumann et al., 1993), konnte in meinen Experimenten nur in solchen Würmern GFP-Expression gefunden werden, die auch einem Hitzeschock ausgesetzt waren. Die Regulation der basalen hsp70-Expression ist jedoch bislang noch nicht vollständig verstanden, wobei klar zu sein scheint, dass „heat shock response elements“ (HSE) nicht daran beteiligt sind (Kiang & Tsokos, 1998). Im Vergleich mit dem hsp70-Promotor aus der Ratte lassen sich Parallelen im Aufbau mit dem aus *S. mansoni* (s. Abb.3) feststellen. Ersterer enthält innerhalb von 250 bp upstream des Transkriptionsstarts sämtliche regulatorischen Elemente inkl. HSE- und CAAT-Boxen, aber auch mehrere SP1 Motive (Bienz & Pelham, 1987). Diese SP1-Stellen sind im verwendeten Teil des schistosomalen hsp70-Promotors

nicht enthalten, was die Möglichkeit zulässt, dass diese bei *S. mansoni* weiter upstream liegen und für die basale Expression verantwortlich sind.

Die Lokalisierung der GFP-Fluoreszenz im Bereich des Teguments von Adulten entspricht den Erwartungen, da *hsp70* in *S. mansoni* als ein „major immuno antigen“ beschrieben worden ist (Hedstrom et al., 1987; Moser et al., 1990) und daher an der Oberfläche zu vermuten war. Immunlokalisationsstudien von Scallon et al. (1987) offenbarten zudem, dass in *S. japonicum* Hsp70 weitestgehend im Tegument expremiert wird. Auch nicht veröffentlichte Daten von *S. mansoni* haben dieses Resultat bestätigt (W. Kunz und A. Buchheiser, persönliche Mitteilung). Da Goldpartikel nach dem Beschuss nicht nur im Tegument, sondern auch in tieferliegenden Geweben gefunden wurden (Resultat nicht gezeigt), liegt eine gewebespezifische Expression des Transgens nahe. Wie in Abb.19 dargestellt, wurde die Fluoreszenz nicht nur in unmittelbarer Nähe von Goldpartikeln beobachtet. Da es sich beim Tegument um ein Syncytium handelt (McLaren, 1980), erscheint die freie Diffusion von Proteinen, also auch von GFP, innerhalb dieses Gewebes prinzipiell möglich.

Auch in larvalen Schistosomen wurde *hsp70*-Promotor-induzierte Transgenaktivität beobachtet. Sowohl auf molekularer, als auch auf mikroskopischer Ebene zeigte sich GFP-Aktivität in primären Sporozysten, bereits ohne Hitzeschock. Dies korrespondiert mit dem Phänomen, dass *hsp70* bei *S. mansoni* u.a. in Miracidien stress-unabhängig expremiert wird (Neumann et al., 1993). Die regulatorischen Motive, die diese konstitutive Expression vermitteln, müssen demnach innerhalb des klonierten Promotors zu finden sein.

Im Gegensatz zur Lokalisation der GFP-Expression in Adulten offenbarte die Mikroskopie der Larven Fluoreszenz nur innerhalb der Organismen, inkl. der „gland cells“. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass es innerhalb der einzelnen Entwicklungsstadien gewebespezifische Unterschiede in der Expression von Hsp70 gibt, was wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Genregulation während der Entwicklung der Parasiten zurückzuführen ist.

#### ❖ 4.1.2 Charakterisierung des *hsp70*-Promotors aus *S. mansoni*.

Hsp70-Proteine sind molekulare Chaperone und sorgen für eine Minimierung von zellulären Schäden in Folge eines Stresses (Clark, 1996; Frydman, 2001). Sie koordinieren die Regulation der Protein-Translokation, sowie den Import und die Faltung von Proteinen. Dabei verhindern sie die Proteinaggregationen und stellen die Funktionsfähigkeit bereits denaturierter Proteine wieder her (Parsell & Lindquist, 1993). In den meisten Eukaryonten

sind Hsp70-Proteine Angehörige einer Multigenfamilie, von denen einige unter Stress, andere konstitutiv exprimiert werden (Langer & Neupert, 1991). Bei *S. mansoni* konnte gezeigt werden, dass hsp70 ein „single copy“ Gen ist (Kapp, 2000). Um die vielfältigen Aufgaben zu erfüllen, muss eine komplexe Regulation dieses Gens in Schistosomen postuliert werden.

Als Neumann et al. (1992) neben dem hsp70-ORF auch einen großen Teil der 5'UTR dieses Gens identifizierten, wurden innerhalb dieser Sequenz zwei putative „heat shock response elements“ (HSE), drei CAAT-Boxen und eine TATA-Box identifiziert. Ob es sich hierbei um zwei echte HSE's handelt, und welches der Elemente für die Hitzeschockantwort *in vivo* verantwortlich ist, konnte bislang nicht beantwortet werden. Um zur Klärung dieser Frage beitragen zu können, wurden zunächst Deletionsklone erzeugt, denen verschiedene regulatorische Elemente fehlten. Die Transfektion von CHO-Zellen mit diesen Vektoren zeigte, dass nur das HSE I an der Hitzeschockantwort im heterologen System beteiligt ist. Dieses Resultat war erwartet worden, da sich bei näherer Betrachtung der HSE-Sequenzen herausstellte, dass nur HSE I den konservierten Aufbau aus drei Pentameren (nGAAn) in Reihe aufweist (Kiang & Tsokos, 1998). Zusammen mit anderen Arbeiten stellt sich immer deutlicher heraus, dass es sich bei HSE II wahrscheinlich nicht um ein regulatorisches Element im hsp70-Promotor von *S. mansoni* handelt (Levi-Holtzmann & Schechter, 1994; Levi-Holtzmann et al., 1995), und dass die Abweichung des dritten Pentamers im HSE I (nGTAn an Stelle von nGAAn) für die stressinduzierte Genexpression in Schistosomen essentiell ist (Lardans et al., 2001).

Das Particle Bombardment adulter Männchen mit diesen Konstrukten brachte bislang jedoch kein eindeutiges Ergebnis hervor, da schwache GFP-Signale auch in solchen Tieren gefunden wurden, die bspw. mit HSE Del 1 beschossen und Hitze-geschockt worden waren. Würmer, die nicht einem Hitzeschock ausgesetzt waren, zeigten keinerlei Fluoreszenz. Eine Quantifizierung der Transkripte über semiquantitative RT-PCR lieferte zunächst Hinweise auf unterschiedliche Mengen an Transkripten, bei gleicher Anzahl von Plasmidmolekülen in den einzelnen Populationen (Resultat nicht gezeigt). Die Messung der Fluoreszenz im Fluorometer blieb dagegen ohne Ergebnis. Dieses Resultat steht im Kontrast zu den Daten aus dem heterologen System, bei dem fluoreszierende Zellen nur mit einem intakten HSE I gefunden werden konnte. Ob es bei den Würmern, die mit den Vektoren ohne HSE I (HSE Del 1, ½) beschossen wurden, zu einer zufälligen Integration über homologe Rekombination gekommen ist, oder ob sich innerhalb der ersten 100 bp upstream des

Transkriptionsstarts noch weitere regulatorische Elemente befinden, die an der Hitze-schockantwort beteiligt sind, konnte bislang nicht geklärt werden.

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit einer Quantifizierung der GFP-Expression wurde auf ein sensitiveres Reporter-gen-System (LUC) umgestellt. Die Klonierung der Vektoren war im Rahmen dieser Arbeit noch möglich, der Einsatz dieser Konstrukte zur Transformation von Schistosomen konnte jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

#### ❖ 4.1.3 ER60-induzierte GFP-Expression in Larven und adulten Schistosomen

In verschiedenen parasitischen Organismen sind Proteinasen, u.a. auch Cystein Proteasen, an einer Vielzahl von verschiedenen Prozessen, wie der Differenzierung, der Proteinprozessierung, der Verdauung, der Immunevasion und der Wirt-Parasit-Interaktion beteiligt (Mottram et al., 1998; Brady et al., 1999; Que and Reed, 2000; Trap and Boireau, 2000; Mundodia et al., 2002; Sajid and McKerrow, 2002). Einige dieser Moleküle sind während der Entwicklung konstitutiv expremiert, während andere nur in bestimmten Stadien nachgewiesen werden konnten.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der Cystein Protease ER60 aus *S. mansoni* beinhaltete die Überprüfung der Genexpression in verschiedenen Larvenstadien, da bisher nur Daten von Adulten vorlagen. Die freilebenden Larven sind zur Aufrechterhaltung des Entwicklungszyklus auf die Penetration eines Wirtes angewiesen (Camus et al., 1995). Biochemische Daten von Yoshino et al. (1993) haben gezeigt, dass bei der Penetration der Miracidien in die Schnecke Moleküle des so genannte „excretory-secretory systems“ (ES) beteiligt sind, zu denen auch Proteinasen gehören. Daher lag die Vermutung nahe, dass ER60 an diesem Prozess beteiligt ist. Nachdem das Konstrukt ER60-GFP-ER60 erfolgreich kloniert worden war, wurde durch Transfektionsexperimente mit mammalischen Zellen festgestellt, dass die 290 bp lange 5`UTR Promotoraktivität ausübte.

Die Transformation von primären Muttersporozysten mit diesem Vektor offenbarte Fluoreszenz innerhalb der Larven nur in solchen Geweben, die mit dem ES System in Verbindung stehen. Bereiche, in denen die neurale Masse oder die Keimzellen liegen, zeigten keine Transgenexpression. Insbesondere die GFP-Expression in den lateralen „gland cells“ deutete darauf hin, dass ER60 an der Penetration in die Schnecke beteiligt sein könnte, zumal gezeigt worden ist, dass diese Zellen am Invasionsprozess beteiligt sind (Dresden et al., 1986). Die lateralen „gland cells“ sind aber auch an der Migration der Larven innerhalb des Zwischenwirtes beteiligt (Pan, 1980), was eine Funktion von ER60 bei diesen Prozessen ebenfalls möglich macht. Neben diesen Zellen wurde Fluoreszenz auch posterior in



den Protonephridien und in den verschiedenen Cytons gefunden, die u.a. am ES beteiligt sind (Pan, 1980). Die Transgenexpression in den Protonephridien korreliert mit den Daten von Finken-Eigen und Kunz (1997), die eine ER60-Expression in diesen Geweben von Adulten gezeigt haben und verdeutlicht, dass diesem Molekül eine Bedeutung im ES während der gesamten Entwicklung der Schistosomen zukommt.

Die computergestützte Analyse der 290 bp langen 5'UTR offenbarte nur eine TATA-Box. Da die Mikroskopie der Larven jedoch eine gewebespezifische GFP-Expression deutlich werden ließ und eine TATA-Box alleine dies nicht vermitteln kann, müssen sich innerhalb der Sequenz noch weitere Transkriptionsfaktorbindestellen befinden, die bislang noch nicht bekannt sind. Dass ein so kurzes Stück der 5'UTR ausreichen kann, um Gewebespezifität zu vermitteln, wurde bspw. durch die Arbeit von Britton et al. (1999) gezeigt. Sie fanden heraus, dass die spezifische Darm-Expression einer Cystein Protease aus *Haemonchus* durch Sequenzmotive innerhalb der ersten 130 bp upstream des Transkriptionsstarts gewährleistet wird (Britton et al., 1999). Hierbei handelt es sich um zwei „GATA-like“ Motive, die jedoch innerhalb des ER60 Promotors nicht gefunden werden konnten.

Finken-Eigen & Kunz (1997) identifizierten ein KSEL-Motiv am C-Terminus des ER60-Proteins. Sie interpretierten dieses Motiv als ein endoplasmatisches Retentionssignal, da es Homologie zu der H/KDEL Konsensussequenz vieler ER-spezifischer Proteinasen aufwies (Munro & Pelham, 1987). Auch wenn H/KDEL für die Rückführung des Moleküls ins ER notwendig ist, scheint es alleine nicht ausreichend für eine Retention zu sein (Anders et al., 1991). Neuste Daten von Okamoto et al. (2001) haben zudem gezeigt, dass Cystein Proteasen mit dieser Konsensussequenz am C-Terminus auch in proteinhaltigen Vakuolen ausserhalb des ER zu finden sind. Diese Daten und die unter 3.1.9.2 präsentierten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ER60 von *S. mansoni* in Sporozysten sowohl an der Prozessierung von Molekülen des ES beteiligt sein könnte, als auch selbst sekretiert werden kann, um Invasionsmechanismen zu unterstützen.

Nicht nur in Muttersporozysten, sondern auch in adulten Männchen konnte mit Hilfe des ER60-GFP-ER60 Transformationvektors GFP-induzierte Fluoreszenz beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Larven ist eine Gewebezunordnung innerhalb der Adulten deutlich schwieriger, da diese auf Grund ihrer Dicke und Eigenfärbung nicht so transparent sind. Dennoch scheint es sich auch hier um eine gewebespezifische Expression zu handeln, in diesem Fall im Bereich des Darmepithels. Dieser Befund korreliert mit den immunhistochemischen und *in-situ* Hybridisierungs-Daten von Finken-Eigen & Kunz (1997). Welche

Funktion ER60 in Adulten ausübt bleibt weiter spekulativ. Geht man, wie bei den Larven, von einer möglichen Doppelfunktion aus, so könnte dieses Molekül neben der proteolytischen Prozessierung anderer Proteine im ER auch eine Funktion bei der Verdauung haben, wenn es z.B. von der Gastrodermis ins Darmlumen sekretiert würde.

Desweiteren unterstützen die Resultate mit den Männchen die Vermutung, dass innerhalb des eingesetzten Promotors Sequenzmotive vorhanden sein müssen, die eine Gewebespezifität vermitteln. Fluoreszenz konnte zwar mit Goldpartikeln in den gezeigten Bereichen in Verbindung gebracht werden, es gab jedoch auch viele Mikropartikel, in deren Umfeld sich unter Fluoreszenzbedingungen kein Signal zeigte.

Eine Eingrenzung der für die Gewebespezifität verantwortlichen Motive im Promotor könnte durch eine schrittweise Deletion der 5'UTR erbracht werden. Zusätzliche Gewissheit könnte dann durch den Einsatz von definierten Oligonukleotiden in „gel shift“ Experimenten erlangt werden.

#### ❖ 4.1.4 Aktin-induzierte GFP-Expression in adulten Schistosomen

Aktin hat neben seiner Funktion beim Aufbau des Zytoskeletts und der zellulären Bewegung (Pollard, 1990) noch weitere Aufgaben innerhalb der Zelle, wie z.B. bei der Endozytose, bei Signaltransduktionsprozessen und bei der RNA-Lokalisation (Sutherland & Witke, 1999). Das Protein hat somit den Stellenwert eines zentralen Organisators in vielen Zellfunktionen. In den meisten Zellen unterschiedlicher Organismen werden verschiedene Aktin-Isoformen gebildet, welche sowohl gewebespezifisch, als auch entwicklungspezifisch expremiert werden (Schoenenberger et al., 1999). Desweiteren unterscheidet man muskelspezifische und cytoplasmatische Aktine, die jeweils innerhalb ihrer Gruppe hohe Homologien aufweisen und unterschiedlich reguliert werden (Pollard, 1990). Die meisten Zellen besitzen einen großen Pool an G-Aktin, um schnell auf wechselnde Bedingungen reagieren zu können (Ballestrem et al., 1998). Um ein solches Reservoir aufrecht zu halten, ist eine konstitutive Expression der Aktine Voraussetzung.

Als Oliveira und Kemp (1995) erstmalig die Sequenzen von zwei Aktinegenen aus *S. mansoni* veröffentlichten, wurden beide aufgrund hoher Homologien untereinander (95%) und gegenüber bekannten Aktinsequenzen der Gruppe der cytoplasmatischen Aktine zugeordnet. Lokalisationsdaten durch Immunhistochemie oder *in-situ* Hybridisierung sind weder für Aktin 1 noch für Aktin 2 beschrieben.

Anhand der veröffentlichten Sequenz-Daten ist es gelungen, Teile der 5' und 3'UTR zu klonieren und mit dem GFP-Gen in einem Plasmid zu vereinen. Die Überprüfung der

Funktionalität des neu klonierten Act-GFP-Act Vektors im heterologen System offenbart schwache Fluoreszenz in einigen Zellen, die durch entsprechende Kontrollen auf GFP-Expression zurückgeführt werden konnte. Diese geringe Transgenaktivität in der Vertebraten-Zellkultur ist möglicherweise durch die Kürze des Promotors oder durch Divergenzen in seinem Aufbau zu erklären (s.u.).

Die Transformation adulter Schistosomenmännchen demonstrierte, dass dieses Plasmid nicht die gewünschte, konstitutive Transgenaktivität im homologen System zeigte. Obwohl nach dem Particle Bombardment eine weite Verteilung von Goldpartikeln innerhalb der einzelnen Individuen beobachtet werden konnte, waren nur an Stellen großer Goldaggregate Fluoreszenzsignale zu erkennen. Dieses Phänomen kann durch einen Gendosisseffekt erklärt werden, führt letztlich jedoch zu dem Schluss, dass die klonierten 170 bp des SmAct1 nicht ausreichen, um eine konstitutive GFP-Expression in sämtlichen nicht-muskulären Zellen hervorzubringen.

Innerhalb der ersten 170 bp upstream des Startcodons von Aktin 1 fanden Oliveira & Kemp (1995) verschiedene, putativ regulatorische Elemente: eine mögliche TATA-Box an Position -35, ein CAAT-Element an Position -78, eine CArG-Box bei -62 und eine E-Box bei -23. Bei Aktingenen unterschiedlicher Vertebraten konnte die Bedeutung der CArG- und/oder der E-Boxen für die konstitutiven Expression nachgewiesen werden (Bergsma et al., 1986; Moss et al., 1994). In ihrer Position zum Transkriptionsstart unterscheiden sie sich jedoch deutlich von denen in *S. mansoni* (Oliveira & Kemp, 1995). Die identifizierte 5'UTR des Aktin 2-Gens umfasste nur 43 bp und wies keine regulatorischen Sequenzmotive auf.

Insbesondere die CArG-Box als Erkennungssequenz des „serum response factors“ (SRF) spielt für die Regulation in Vertebraten eine große Rolle. Diese Regulationseinheit wurde auch bei einigen Crustaceen identifiziert (Ortega et al., 1996; Casero & Sastre, 2001), aber auch bei verschiedenen Ascidien (Satou & Satho, 1996; Kusakabe, 1997). Da die Sequenz innerhalb des Aktin1-Promotors aus *Schistosoma* nicht der Konsensussequenz (CC 6xA/T GG) entspricht und in ihrer Lage divergent ist, erscheint eine Funktion anhand der Transformationsdaten unwahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Ebenfalls unklar ist, ob die gefundene E-Box für die Expression in Schistosomen relevant ist, da sie im Gegensatz zu Aktin-Promotoren anderer Organismen downstream der TATA-Box liegt. Funktionell aktive E-Boxen sind bislang nur upstream gefunden worden (Moss et al., 1994; Kusakabe, 1997; Grimba et al., 2000).

Obwohl innerhalb der 5'UTR weitere putative, regulatorische Elemente gefunden werden konnten (s.o.), müssen andere Motive weiter upstream für die konstitutive Aktinexpression verantwortlich sein. So konnte z.B. für den proximalen Promotor des Aktin5C-Gens aus *Drosophila* gezeigt werden, dass der Sequenzbereich –450 bis –190 für die konstitutive Expression verantwortlich ist (Bond-Matthews & Davidson, 1988). „Gel shift“ Experimente von Chung und Keller (1990a) bewiesen anschließend, dass der Bereich –326 bis –314 (A5CE-1) für Bindung von Transkriptionsfaktoren in der 5'UTR verantwortlich ist. Weitere regulatorische Einheiten wurden weiter downstream von A5CE-1 gefunden. Hierbei handelt es sich um drei GAGA-Elemente, die sich nahe dem Transkriptionsstart befinden (-160 bis –60) (Chung & Keller, 1990b). Solche Motive konnten jedoch nicht in der klonierten 5'UTR des SmAct1 gefunden werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass nur die Identifikation weiterer 5'UTR-Sequenzen und gezielte Promotoranalysen Aufschluss über die transkriptionelle Regulation der bekannten Aktinogene aus Schistosomen erbringen können.

#### ❖ 4.1.5 Transiente oder stabile Transformation

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten basieren bislang auf einer transienter Transformation von *S. mansoni*. Da eine Rekombination über die homologen Regulationssequenzen (Promotor/Terminator) in den Vektoren grundsätzlich möglich erscheint, ist eine stabile Integration der verwendeten Konstrukte nicht ausgeschlossen.

Darüber hinaus könnte die Möglichkeit zur Integration von Vektorkonstrukten ins Schistosomengenom durch den Einsatz von zusätzlichen DNA-Sequenzen erreicht werden, die von mobilen Elementen stammen. Solche wurden in der Vergangenheit bereits mehrfach erfolgreich in anderen Systemen eingesetzt (Hsieh & Fire, 2000, Pereira, 2000). In Schistosomen sind jedoch noch keine Transposons bekannt. Bislang identifizierte Retroelemente (Drew & Brindley, 1997) gehören zu der Klasse der non-LTR Retroposons und sind daher für diesen Zweck nicht geeignet. Es gibt allerdings eine Klasse von repetitiven Elementen, die in hoher Kopienzahl im Genom von *Schistosoma* vorkommen und ein Rekombinationsmuster aufweisen, das an das Verhalten mobiler Elemente erinnert (Greveling, 1999). Der Einsatz dieser Sequenzen als zusätzliche, flankierende Module von Transformationsvektoren könnte das Integrationspotential erhöhen und zu einer stabilen Transformation führen.

Um Plasmide an nachfolgende Zellen weiterzugeben, ist eine Genomintegration nicht immer notwendig. Bei *C. elegans* werden z.B. große Konkatemere transferierter Plasmid-

DNA extrachromosomal vererbt (Fire, 1986; Mello et al., 1991), eine Möglichkeit, die auch für *S. mansoni* nicht ausgeschlossen werden kann.

Ein Ziel weiterer Projekte muss die Keimbahntransformation von Schistosomen sein, um eine komplette, also alle Entwicklungsstadien umfassende, phänotypische Charakterisierung möglich zu machen. Dies könnte durch Transformationsexperimente mit Miracidien und Muttersporozysten erreicht werden. Hier findet man ca. 20 omnipotente Keimzellen (Pan, 1980), die im Vergleich zu adulten Männchen proportional einen größeren Teil des Individuums ausmachen, und aus denen die nachfolgenden Entwicklungsstadien hervorgehen (Jourdane & Theron, 1987). Tochttersporozysten haben eine noch höhere Anzahl von undifferenzierter Zellen (ca. 100), aus denen später die Cercarien hervorgehen. Somit ist dieses Entwicklungsstadium auch als Ziel von Keimbahntransformations-Experimenten geeignet. Da die Generierung und Kultivierung von Tochttersporozysten sehr schwierig ist und einen speziellen apparativen Aufwand erfordert (Ivanchenko et al., 1999; D. Barnes, persönliche Mitteilung), konnten Ansätze zur Transformation dieser Stadien bislang nicht verfolgt werden.

Um eine alternative Möglichkeit zur Haltung, Transformation und Propagation von Larven zu haben, wurden Experimente mit Muttersporozysten durchgeführt. Diese lassen sich ohne großen Aufwand aus Miracidien erzeugen und transformieren, wie verschiedene Resultate dieser Arbeit belegen (s. 3.1.7 & 3.1.9). Allerdings war es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht klar, in wieweit *in-vitro* generierte Muttersporozysten propagiert werden können, um aus ihnen adulte Würmer zu erhalten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Transplantationsexperimente haben gezeigt, dass sich diese Larven mit einer Effizienz von 40% wieder in den Zwischenwirt einbringen lassen, wo es zur Entwicklung infektiöser Cercarien kommt. Hiermit ist eine weitere Grundlage für Experimente zur Keimbahntransformation geschaffen. Versuche zur Transplantation beschossener Sporozysten stehen derzeit noch aus.

Experimente mit Miracidien, die im Anschluss an das Particle Bombardment mit dem Konstrukt hsp70-GFP-hsp70 zur natürlichen Infektion des Zwischenwirtes eingesetzt wurden, geben den berechtigten Anlass zur Hoffnung, auf diesem Wege eine Transformation der Keimbahn erreicht zu haben. Der molekulare Nachweis der Transgenpräsenz in der nachfolgende Cercariengeneration kann als ein Beleg für die erfolgreiche Transformation von Keimzellen gewertet werden. Bis heute geht man davon aus, dass nur die Keimzellen der Sporozysten die Grundlage für das nächste Entwicklungsstadium darstellen (Jourdane & Theron, 1987). Ob es sich hierbei um eine stabile Integration handelt, oder ob die DNA

extrachromosomal weitergegeben wurde, ist noch unklar. Die Überprüfung könnte z.B. durch IPCR-Experimente oder Southern-Blot erfolgen. Zunächst werden jedoch die gewonnenen Cercarien für eine Endwirtinfektion verwendet, um eine mögliche Transgenaktivität dort nachweisen zu können.

Der Einsatz von Resistenz-vermittelnden Reportergenen, wie z.B. der Dehydrofolatreduktase (DHFR) (Simonsen & Levinson, 1983), könnte bei der Selektion stabil-transgener Organismen hilfreich sein. Unter dem Einfluss des Antibiotikums Methotrexat (MTX) können sich bspw. nur noch aus solchen Keimzellen weitere Entwicklungsstadien bilden, die das DHFR-Gen chromosomal oder extra-chromosomal weitergeben. Da MTX bei mitotischen Zellen wirksam ist, werden ausdifferenzierte Gewebe nicht beeinflusst. Erste Experimente in dieser Richtung sind bereits durchgeführt worden. Hier zeigte sich, dass in infizierten Schnecken unter dem Einfluss von MTX keine Cercariogenese mehr stattfindet (C.G. Grevelding, persönliche Mitteilung).

Die Mikroinjektion ist heute in verschiedenen Bereichen der Naturwissenschaften und der Medizin eine gängige Methode des Gentransfers (Mello et al., 1991; Davis et al., 2000; Morris et al., 2001), vor allem bei der Herstellung transgener Tiere. Dabei wird DNA in den männlichen Pronucleus einer befruchteten Eizelle injiziert und integriert dort in einer frühen Entwicklungsphase in das Wirtsgenom (Old & Primrose, 1992). Mikroinjektionsversuche zur Generierung transgener Sporozysten zielten u. a. auch auf eine mögliche stabile Keimbahntransformation ab, wie es z.B. bei *C. elegans* durch die Injektion in die Gonaden gezeigt werden konnte (Mello et al., 1991). Da diese Methode jedoch keine überlebenden Individuen hervorbrachte, ist sie für den gedachten Zweck nicht einsetzbar. Die Schwierigkeiten decken sich mit Erfahrungen anderer Forschergruppen, denen es bislang auch nicht gelungen ist, Larven erfolgreich zu mikroinjizieren (Yoshino et al., 2001; C. Shoemaker und A. Parton, persönliche Mitteilung).

#### ❖ 4.1.6 Zukünftige Arbeiten

Nachdem es nun gelungen ist, ein Transformationsprotokoll für Schistosomen zu entwickeln, können erste Beiträge zur Beantwortung biologischer Fragen geleistet werden. Desweiteren wird es in der Zukunft möglich sein, Funktionsanalysen mit Hilfe dieser Technik durchzuführen, wie die Charakterisierung regulatorischer Elemente (Britton et al., 1999), gewebespezifischer Genexpression (Quijada et al., 2000) oder die Folgen von Überexpression (Gillingham & Munro, 2000). Seitdem bekannt ist, dass sich neben DNA- auch RNA-Moleküle an Goldpartikel koppeln lassen (Sanford et al., 1987; Davis et al.,

1999), können erste Experimente zum funktionellen „knock out“ über RNAi (Bass, 2000; Tavernarakis et al., 2000) in Angriff genommen werden.

Darüber hinaus sollte es möglich sein, die Technik des Particle Bombardments nicht nur auf Schistosomen anzuwenden, sondern auch für den Gentransfer in andere multizelluläre Parasiten.

#### 4.2 Ansätze zur Immortalisierung von *Schistosoma*-Zellen

Die Etablierung von Zelllinien aus verschiedenen Vertebraten sowie aus Insekten oder Arachniden ist heute bereits Routine, wohingegen permanente Zellkulturen von anderen Invertebraten bislang kaum beschrieben sind (Hansen, 1976; Bayne, 1998). Bereits 1979 wurden von F. Hink 70 verschiedene Zelllinien von Invertebraten beschrieben, wobei die meisten aus Insekten stammten. Bis heute gibt es noch keine Zellkulturen aus aquatischen Invertebraten, Parasiten, Parasiten-Vektoren oder anderen eukaryontischen Krankheitserregern (Bayne, 1998).

Zellen in Kultur, die einen bestimmten Phänotyp widerspiegeln, sind ein unverzichtbares Werkzeug in der Zellbiologie (Katakura et al., 1998). Anfangs wurde versucht, Probleme bei der Kultivierung primärer Zellen (z.B. langsame Teilung, Absterben nach einigen Passagen), durch den Einsatz von Tumorzelllinien zu beheben (McLean, 1993). Da es sich hierbei aber um transformierte Zellen handelte, gaben sie den Phänotyp einer normalen Zelle nur selten wieder. Die Lösung dieses Problems sind Zellen, die sich in der Kultur permanent teilen und ihren differenzierten Status dabei nicht verlieren. Solche Zelllinien werden als „immortalisiert“ bezeichnet (McLean, 1993; Katakura et al., 1998). Nagerzellen z.B. immortalisieren spontan mit einer Frequenz von  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$ , wohingegen humane Zellen dies mit einer Frequenz von ca.  $10^{-12}$  nur sehr selten tun (Katakura et al., 1998).

Seit einigen Jahrzehnten sind eine Reihe von Genen identifiziert worden, die an dem Prozess der Cancerogenese beteiligt sind und die zur Immortalisierung differenzierter Zellen verwendet wurden. Zu diesen „immortalisierenden“ Genen gehören z.B. das LargeT Antigen aus SV40 (Jha et al., 1998), E6 und E7 des Pappilomaviruses (Band et al., 1990), E1A des Adenoviruses (Dumont & Branton, 1992), sowie verschiedene Oncogene und/oder Tumorsuppressorgene (Land et al., 1983; Spandidos & Wilke, 1984; Schütte et al., 1989; Prives, 1993).

Durch die Identifikation des ras-Homologs aus *S. mansoni*, einem putativen Onkogen, war nun eine gute Voraussetzung geschaffen, eine Immortalisierung von *Schistosoma*-

Zellen durch Transfektion von ras und des LargeT-Gens zu versuchen, da bisherige Versuche, dauerhaftes Wachstum von schistosomalen Zellen zu induzieren, erfolglos blieben.

#### ❖ 4.2.1 Transformationspotenz des mutierten Sm-Ras

Nachdem Sm-Ras an den Aminosäurepositionen 12 und 61 erfolgreich mutiert worden war, sollte seine Transformationspotenz im heterologen System überprüft werden. Wie sich jedoch zeigte, ist es nur durch den Einsatz einer deutlich erhöhten Gendosis in diesem Test gelungen, eine leicht gesteigerte Transformationsrate zu erhalten. Auch der Austausch der Erkennungssequenz für die unverzichtbare Prenylsilierung von CCIQ in CVLS erbrachte keinen nennenswerten Effekt. Das lässt den Schluss zu, dass die Ursache eher in der nachgeschalteten Signalkaskade und nicht bei post-translationellen Modifikationen zu suchen ist.

Eine weitere unabdingbare Voraussetzung zur Funktionalität ist die Bindung des raf-Moleküls (Daub et al., 1998). Da die Interaktion von Raf und Ras durch konservierte Motive vermittelt wird, wurde die Interaktion dieser beiden Moleküle vorausgesetzt, auch wenn sich die flankierenden Aminosäuren unterscheiden und somit eine sterische Behinderung hervorrufen können. Ob nun die Mutationen im Sm-ras zu einer erhöhten Transformationspotenz des Moleküls führen, kann jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden.

#### ❖ 4.2.2 Transfektion isolierter *Schistosoma*-Zellen

Die Transfektion sollte mit Plasmiden durchgeführt werden, die ein mutiertes ras-Gen zunächst unter der Kontrolle der regulatorischen Einheiten von ER60 umfassen. Da es für die klonierten Vektoren keinen einfachen Funktionsnachweis gibt, wurde aufgrund der Klonierung angenommen, dass sie funktionell sind. Diese Konstrukte sind im Rahmen dieser Arbeit nicht zum Einsatz gekommen, da es nicht möglich war, mit Hilfe der beschriebenen Protokolle von Hobbs et al. (1993) und Bayne et al. (1994) Zellen aus Adulten oder aus Larven zu isolieren. Insbesondere am Anfang der Aufarbeitung sind Homogenisationsschritte enthalten, die nicht mit demselben Gerät durchgeführt werden konnten. Auch der Einsatz der beschriebenen Collagenase war nicht möglich, da dieses Produkt seit langem vom Markt ist.

Um eine Immortalisierung von Zellen durchzuführen, ist es zunächst notwendig, ein neues Protokoll zur Isolation von Zellen zu entwickeln. Dies war innerhalb des gegebenen Zeitraums nicht möglich, so dass es Bestandteil weiterführender Arbeiten sein wird.



### ❖ 4.2.3 Gewebeveränderung in transformierten Schistosomen

Nachdem die Isolation von Zellen weder aus Larven noch aus adulten Schistosomen erfolgreich war, wurden adulte Tiere mit dem Konstrukt ER60-FSP(G12V, Q61L)-ER60 transformiert und anschließend für einen längeren Zeitraum kultiviert. Einige der transformierten Würmer offenbarten nach dieser Zeit an verschiedenen Stellen starke Verformungen des Körpers, besonders im posterioren Teil. Die konfokale Lasermikroskopie zeigte in diesen Bereichen eine starke Fluoreszenz, was auf die Expression des Fusionsproteins zurückgeführt wurde. Für die Funktionalität des Ras-Anteils im Fusionsprotein spricht die starke Verdickung des Wurmes, speziell des Darms, und die Fluoreszenz in diesem Bereich. In Anbetracht der Tatsache, dass das FSP in diesem Experiment unter der Kontrolle des ER60 Promotors stand, und die Cystein Protease bei Adulten u. a. in der Gastrodermis zu finden ist, entspricht die Lokalisation der Fluoreszenz den Erwartungen. Möglicherweise ist es hier gelungen, mit Hilfe eines mutierten ras-Gens ein neoplastisches Wachstum in Schistosomen zu erzeugen. Weiterführende cytologische Experimente könnten darüber Aufschluss geben.

Dennoch stellt sich die Frage, ob es bei Invertebraten überhaupt möglich ist, mit Hilfe von Genen, die in die Kontrolle des Zellzykluses eingreifen, eine Zellproliferation bzw. Immortalisierung zu induzieren? Versuche, diese Frage zu beantworten, sind bislang nicht beschrieben. Auch sind die bisher veröffentlichten Invertebraten-Zelllinien nicht durch einen solchen Ansatz zur dauerhaften Teilung gebracht worden, sondern z.B. durch zelluläre Hybride (Wyss, 1982) oder durch die Kultivierung embryonaler Zellen (Vaughn et al., 1977; Oro, 1984; Simcox et al., 1985). Versuche zur Kultivierung von Zellen aus *C. elegans* sind bisher daran gescheitert, dass es einen Kontrollmechanismus zu geben scheint, der nur eine definierte Zellzahl innerhalb des Organismus zulässt (Seydoux & Schedl, 2001). Hinweise auf eine Zellzahlregulation liegen bei *S. mansoni* nicht vor.

D. Barnes (1998) beschrieb in seiner Arbeit, dass es grundsätzlich möglich ist, einen solchen Ansatz zur Immortalisierung zu verfolgen, dass aber das Fehlen eines geeigneten Gentransfersystems Experimente dieser Art bislang nicht möglich machte. Durch die vorliegende Arbeit wird die Möglichkeit eröffnet, Gene in *S. mansoni* zu transferieren, so dass weiteren Versuchen zur Immortalisierung durch genetische Elemente nichts mehr im Wege steht.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- \* Adamson, R., Lyons, K., Sharrad, M., Kinnaird, J., Swan, D., Graham, S., Shields, B., Hall, R., 2001. Transient transfection of *Theileria annulata*. Mol. Biochem. Parasitol. 114, 53-61.
- \* Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1994. Molekularbiologie der Zelle, , VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- \* Amann, K.J., Pollard, T.D., 2001. Cellular regulation of actin network assembly. Curr. Biol. 10, 728-730.
- \* Amsterdam, A., Zauberman, A., Meir, G., Pinhasi-Kimhi, O., Suh, B.S., Oren, M., 1988. Co-transfection of granulosa cells with simian virus 40 and Ha-ras oncogene generates stable lines capable of induced steroidogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7582-7586.
- \* Andres, D.A., Rhodes, J.D., Meisel, R.L., Dixon, J.E., 1991. Characterisation of the carboxyl-terminal sequences responsible for protein retention in the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 266, 14277-82.
- \* Ayllon, V., Rebollo, A., 2000. Ras-induced cellular events. Mol. Membr. Biol. 17, 65-73.
- \* Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Imhof, B.A., 1998. Actin dynamics in living mammalian cells. J. Cell Science 111, 1649-1658.
- \* Band, V., Zajchowsky, D., Kulesa, V., Sager, R., 1990. Human papillomavirus DNA immortalize normal epithelial cells and reduce their growth factor requirement. Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 463-467.
- \* Barbacid, M., 1987. Ras genes. Annu. Rev. Biochem. 56, 779-827.
- \* Bass, B.L., 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell 101, 235-238.
- \* Bayne, J.C., 1998. Invertebrate cell culture consideration: insects, ticks, shellfish and worms. Methods Cell Biol. 57, 187-201.
- \* Bayne, C.J., Menino, J.S., Hobbs, D.J., Barnes, D.W., 1994. *In vitro* cultivation of cells from larval *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 80, 29-35.
- \* Bergsma, D.J., Grichnik, J.M., Gossert, L.M.A., Schwartz, R.J., 1986. Delimitation and characterization of cis-acting DNA sequences required for the regulated expression and transcriptional control of the chicken skeletal alpha-actin gene. Mol. Cell. Biol. 6, 2462-2475.
- \* Bienz, M., Pelham, H.R., 1987. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. Adv. Genet. 24, 31-72.
- \* Bond-Matthews, B., Davidson, N., 1988. Transcription from each of the *Drosophila act5C* leader exons is driven by a separate functional promoter. Gene 62, 289-300.
- \* Bos, J.L., 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res. 49, 4682-4689.
- \* Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72, 248-254.

- \* Brady, C.P., Dowd, A.J. Brindley, P.J., Ryan, T., Day, S.R., Dalton, J.P., 1999. Recombinant expression and localization of *Schistosoma mansoni* cathepsin L1 support its role in the degradation of host hemoglobin. *Infect. Immun.* 67, 368-374.
- \* Brindley, P.J., Kalinna, B.H., Dalton, J.P., Day, S.D., Wong, J.Y.M., Smythe, M.L., McManus, D.P., 1997. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89, 1-9.
- \* Britton, C., Redmond, D.L., Knox, D.P., McKerrow, J.H., Barry, J.D., 1999. Identification of promoter elements of parasite nematode genes in transgenic *C. elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103, 171-181.
- \* Bullock, W.O., Fernandes, J.M., Short, J.M., 1987. XL1-Blue: A high efficiency transforming recA *E. coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-380.
- \* Bueno, R.J., Linser, P.J., 1992. Transient expression of RSV-CAT in transgenic zebrafish made by electroporation. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1, 271-275.
- \* Camus, D., Zalis, M.G., Vannier-Santos M.A., Banic, D.M., 1995. The art of parasite survival. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28, 399-413.
- \* Casero, M.C., Sastre, L., 2001. Characterization of a functional serum response element in the actin403 gene promoter from the crustacean *Artemia franciscana*. *Eur. J. Biochem.* 268, 2587-2592.
- \* Cavender, J.F., Conn, A., Epler, M., Lacko, H., Tevethia, J.M., 1995. Simian virus 40 large T-antigen contains two independent activities that cooperate with the ras oncogene to transform rat embryo fibroblasts. *J. Virol.* 69, 923-934.
- \* Celis, J.E., 1998. *Cell biology: a laboratory handbook*. Academic Press, NY.
- \* Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-804.
- \* Chin, L., Ta, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., Horner, J.W., Cordon-Cardo, C., Yancopoulos, G.D., DePinho, R.A., 1999. Essential role for oncogenic ras in tumor maintenance. *Nature* 400, 468-472.
- \* Chung, Y.T., Keller, E.B., 1990a. Regulatory elements mediating transcription from *Drosophila melanogaster* actin 5C proximal promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10, 206-216.
- \* Chung, Y.T., Keller, E.B., 1990b. Positive and negative regulatory elements mediating transcription from the *Drosophila melanogaster* actin 5C distal promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6172-6180.
- \* Clark, A.R., 1996. Molecular chaperons in protein folding and translocation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 43-50.
- \* Clayton, C.E., 1999. Genetic manipulation of kinetoplasts. *Parasitol. Today* 15, 372-378.
- \* Colley, D.G., LoVerde, P.T., Savioli, L., 2001. Medical helminthology in the 21<sup>st</sup> century. *Science* 293, 1437-1438.

- 
- \* Coustau, C., Ataev, G., Jourdane, J., Yoshino, T.P., 1997. *Schistosoma japonicum*: *in vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. *Exp. Parasitol.* 87, 77-87.
  - \* Dalton, J.P., Clough, K.A., Jones, M.K., Brindley, P.J., 1997. The cysteine protease of *Schistosoma cercariae*. *Parasitol.* 114, 105-112.
  - \* Daub M., Jöckel, J., Quack, T., Weber, C.K., Schmitz, F., Rapp, U.R., Wittinghofer, A., Block, C., 1998. The rafC1 cysteine-rich domain counts multiple distinct regulatory epitopes thich control ras-dependent raf activation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6698-6710.
  - \* Davies, S.J., Shoemaker, C.B., Pearce, E.J., 1998. A divergent member of the transforming growth factor beta receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 11234-11240.
  - \* Davis, B.R., Brown, D.B., Prokopyshin, N.L., Yannariello-Brown, J., 2000. Microinjection-mediated hematopoietic stem cell gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2, 412-419.
  - \* Davis, R.E., Parra, A., LoVerde, P.T., Ribeiro, E., Glorioso, G., 1999. Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8687-8692.
  - \* DeBont, J., Vercruyse, J., 1998. Schistosomiasis in cattle. *J. Adv. Parasitol.* 41, 285-364.
  - \* DeCaprio, J.A., 1999. The role of the J domain of SV40 large T in cellular transformation. *Biologicals* 27, 23-28.
  - \* Der, C., Finkel, T., Cooper, G.M. (1986) Biological and Biochemical properties of human *ras*<sup>H</sup> genes mutated at codon 61. *Cell* 44, 167-176.
  - \* deKoning-Ward, T.F., Janse, C.J., Waters, A.P., 2000. The development of genetic tools for dissecting the biology of Malaria parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 157-185.
  - \* Dettmann, C.D., Higgins-Opitz, S.B., Saikoolal, A., 1989. Enhanced efficiency of the paddling method for schistosome infection of rodents by a four-step pre-soaking procedure. *Parasitol. Res.* 76, 183-184.
  - \* deVries, J.E., ten Kate, J., Bosmann, F.T., 1996. p21 ras in cancerogenesis. *Pathol. Res. Pract.* 192, 658-686.
  - \* deWet et al., 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 725.
  - \* Dresden, M.H., Sung, C.K., Deelder, A.M. 1983. A monoclonal antibody from infected mice to a *Schistosoma mansoni* egg proteinase. *J. Immunol.* 130, 1-3.
  - \* Drew, A.C., Brindley, P.J., 1997. A retrotransposon of the non-long terminal repeat class from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Similarities to the chicken-repeat-1-like elements of vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* 14, 602-610.
  - \* Dumont, D.J., Branton, P.E., 1992. Phosphorylation of adenovirus E1A proteins by the p34cdc25 protein kinase. *Virology* 189, 111-120.

- \* Duncan, E.L., Reddel, R.R., 1997. Genetic changes associated with immortalization. A review. *Biochemistry* 62, 1263-1274.
- \* Finken-Eigen, M., Kunz, W., 1997. *Schistosoma mansoni*: gene structure and localization of a homologue to cysteine protease ER60. *Exp. Parasitol.* 86, 1-7.
- \* Fire, A., 1986. Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 5, 2673-2680.
- \* Fiori, P.L., Monaco, G., Scapaticci, S., Puglies, A., Cana, N., Cappuccinelli, P., 1988. Establishment of a cell culture from hydatid cysts of *Echinococcus granulosus*. *Int. J. Parasitol.* 18, 297-305.
- \* Freebern, W.J., Osman, A., Niles, E.G., Christen, L., LoVerde, P.T., 1999. Identification of a cDNA encoding a retinoid X receptor homologue from *Schistosoma mansoni*. Evidence for a role in female-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* 274, 4577-4585.
- \* Frydman, J., 2001. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperons. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 603-649.
- \* Fu, H.W., Casey, P.J., 1999. Enzymology and biology of CaaX protein prenylation. *Recent Prog. Horm. Res.* 54, 315-342.
- \* Furuya, K., 1991. An established cell line of larval *Echinococcus multilocularis*. *Int. J. Parasitol.* 21, 233-240.
- \* Gassen, H.G., Minol, K., 1996. *Gentechnik (Einführung in Prinzipien und Methoden)*. Fischer Verlag, Stuttgart.
- \* Gillingham, A.K., Munro, S., 2000. The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep.* 1, 524-529.
- \* Grant, W.N., 1992. Transformation of *C.elegans* with genes from parasitic nematodes. *Parasitol. Today* 8, 344-346.
- \* Grevelding, C.G., 1999. Genomic instability in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem Parasitol.* 101, 207-216.
- \* Grimba, E.R.P., Chemale, G., Farias, S.S., Zaha, A., 2000. Cloning and characterization of *Echinococcus granulosus* (Cestode) *EgactI* and *EgactII* actin gene promoters and their functional analysis in the NIH3T3 mouse cell line. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 1283-1292.
- \* Gould, S.J., Subramani, S., 1988. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analyt. Biochem.* 175, 5-13.
- \* Gutierrez, J.A., 2000. Genomics: from novel genes to new therapeutics in parasitology. *Int. J. Parasitol.* 30, 247-252.
- \* Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., Weinberg, R.A., 1999. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.
- \* Hall, A., 1998. G proteins and small GTPases: Distant relatives keep in touch. *Science* 280, 2074-2075.

- \* Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *E.coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- \* Hansen, E.L., 1976. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (*Pulmonata*): establishment and characteristics. *Invertebrate tissue collection*; Academic press, NY.
- \* Hara, T., Yasuda, K., Fukuma, T., 2002. Effective gene transfer into *Trypanosoma brucei* bloodstream forms by particle bombardment. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 117-119.
- \* Hashmi, S., Tawe, W., Lustigmann, S., 2001. *C. elegans* and the study of gene function in parasite. *Trends Parasitol.* 17, 387-393.
- \* Hay, R.J., Caputo, J., Macy, M.L., 1988. American type culture collection catalogue of cell lines and hybridomas. American Typ Culture Collection, Rockville, MD.
- \* Hedstrom, R., Culpepper, J., Harrison, R.A., Agabian, N., Newport, G.J., 1987. A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat shock protein hsp70. *J. Exp. Med.* 165, 1430-1435.
- \* Hink, F., 1979. Cell lines from Invertebrates. *Methods Enzymol.* 63, 450-466.
- \* Hobbs, D.J., Fryer, S.E., Duimstra, J.R., Hedstrom, O.R., Brodie, A.E., Collodi, P.A., Menino, J.S., Bayne, C.J., Barnes, D.W., 1993. Culture of cells from juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 79, 913-921
- \* Hofmann, M.C., Narisawa, S., Hess, R.A., Millan, J.L., 1992. Immortalization of germ cells and somatic testicular cells using sv40 Large T antigen. *Exp. Cell. Res.* 201, 417-435.
- \* Horrocks, P., Dechering, K., Lanzer, M., 1998. Control of gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95, 171-181.
- \* Hsieh, J., Fire, A., 2000. Recognition and silencing of repeated DNA. *Annu. Rev. Genet.* 34, 187-204.
- \* Inal, J.M., Sim, R.B., 2000. A *Schistosoma* protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Lett.* 470, 131-134.
- \* Ivanchenko, M.G., Lerner, J.P., McCormick, R.S., Toumadje, A., Allen, B., Fischer, K., Hedstrom, O., Helmrich, A., Barnes, D.W., Bayne, C.J., 1999. Continuous *in vitro* propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4965-4970.
- \* Jackstadt, P., Wilm, T.P., Zahner, H., Hobom, G., 1999. Transformation of nematodes by ballistic DNA transfer. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103, 261-266.
- \* Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D., 1986.  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8447-8451.
- \* Jha, K.K., Banga, S., Palejwala, V., Ozer, H.L., 1998. SV40-mediated immortalization. *Exp. Cell. Res.* 245, 1-7.
- \* Johnston, D.A., Blaxter, M.L., Degrave, W.M., Foster, J., Ivens, A.C., Melville, S.E., 1999. Genomics and the biology of parasites. *BioEssays* 21, 131-147.

- \* Jourdane, J., Theron, A., 1987. Chapter 3: Larval development: Eggs to cercariae; in The biology of schistosomes from genes to latrines (Simpson & Rollins), Academic Press, NY.
- \* Kampkötter, A., 1999. Identifizierung und Charakterisierung eines ras-Homologes und ein Ansatz zur Untersuchung differentieller Genexpression bei *Schistosoma mansoni*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- \* Kampkötter, A., Ridges, I., Johnston, D.A., Rollins, D., Kunz, W., Grevelding, C.G., 1999. *Schistosoma mansoni*: Cloning and characterisation of the ras homologue. Exp. Parasitol. 91, 280-283.
- \* Kapp, K., 2000. *Schistosoma mansoni*: Charakterisierung von zwei Tyrosin-Kinasen und Ansätze zur Etablierung eines Gentransfer-Systems. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- \* Katakura, Y., Alam, S., Shirahata, S., 1998. Immortalization by gene transfection. Methods Cell Biol. 57, 69-91.
- \* Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Lindenmann, J., 1989. Medizinische Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart.
- \* Kelleher, M., Tomley, F.M., 1998. Transient expression of beta-galactosidase in differentiating sporocysts of *Eimeria tenella*. Mol. Biochem. Parasitol. 97, 21-31.
- \* Kern, F.G., McLeskey, S.W., Zhang, L., Kurebayashi, J., Liu, Y., Kharbamdan, S., Chen, D., Miller, D., Cullen, K., 1994. Transfected MCF-7 cells as a model for breast-cancer progression. Breast Cancer Res. Treat. 31, 153-165.
- \* Kiang, J.G., Tsokos, G.C., 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. Pharmacol. Ther. 80, 183-201.
- \* Knippers, R., 1997. Molekulare Genetik. Thieme Verl., Stuttgart.
- \* Koch-Brand, C., 1993. Gentransfer (Prinzipien-Experimente-Anwendung bei Säugern). Thieme Verlag, Stuttgart.
- \* Kondoh, H., Yasuda, K., Okada, T.S. 1983. Tissue-specific expression of a cloned chick delta-crystallin gene in mouse cells. Nature 301, 440-442.
- \* Köster, B., Dargatz, H., Schröder, J., Hirzmann, J., Haarmann, C., Symmons, P., Kunz, W., 1988. Identification and localisation of the products of a putativ egg shell precursor gene in the vitellarium of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 31, 183-198.
- \* Kusel, J., Hagan, P., 1999. Praziquantel: its use, cost and possible development of resistance. Parasitol. Today 15, 352-354.
- \* Kyhse-Anderson, J., 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Methods 10, 203-213.
- \* Lämmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

- \* Land, H., Parada, L.F., Weinberg, R.A., 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- \* Langer, T., Neupert, W., 1991. Heat shock proteins hsp60 and hsp70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167, 3-24.
- \* Lardans, V., Ram, D., Lantner, F., Ziv, E., Schechter, I., 2001. Differences in DNA-sequence recognition between the DNA-binding domain fragment and the full-length molecule of the heat-shock transcription factor of schistosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1519, 230-234.
- \* LeBrowitz, J.H., Coburn, C.M., McMahon-Pratt, D., Beverley, S.M., 1990. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 9736-9740.
- \* Levy-Holtzmann, R., Schechter, I., 1994. Schistosome extracts with heat shock foactor revealed by gel shift assay. *Parasitol.* 108, 35-42.
- \* Levy-Holtzmann, R., Schechter, I., 1995. Activity of the promoter of the hsp70 gene of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni* in the mammalian CHO cell-line. *Biochim. Biophys. Acta* 1263, 96-98.
- \* Levi-Holtzmann, R., Clos, J., Schechter, I., 1995. Differences in DNA sequences recognition by the heat-shock factors of *Drosophila melanogaster* and the parasitic heminth *Schistosoma mansoni*. *Biochim. Biophys. Acta.* 164, 134-140.
- \* Levy-Holtzmann, R., Schechter, I., 1996. Expression of different forms of the heat-shock factor during the life cycle ot the parasitic heminth *Schistosoma mansoni*. *Biochim. Biophys. Acta* 1317, 1-4.
- \* Lodes, M.J., Yoshino, T.P., 1989. Characterization of excretory- secretory proteins synthesized in vitro by *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. *J. Parasitol.* 75, 853-862.
- \* Loker, E.S., 1983. A comperative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitol.* 87, 343-369.
- \* Lowy, D.R., Willumsen, B.M., 1993. Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 851-891.
- \* MacKenzie, D.R., Anderson, P.M., Wernham, C.C., 1966. A mobile air blast inoculator for plot experiments with maize dwarf mosaic virus. *Plant Dis. Rep.* 50, 363-367.
- \* McCormick, F., 1996. Ras biology in atomic detail. *Nature in structural Biol.* 3, 653-655.
- \* McCormick, F., Wittinghofer, A., 1996. Interactions between Ras proteins and their effectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 449-456.
- \* McKerrow, J.H., 1999. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safty, target validation and mechanism of action. *Int. J. Parasitol.* 29, 833-837.
- \* McKerrow, J.H., Doenhoff, M.J., 1988. Schistosome proteases. *Parasitol. Today* 4, 334-340.



- \* McLaren, D.J., 1980. *Schistosoma mansoni*: The parasitic surface in relation to host immunity. Research Studies Press. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- \* McLean, J.S., 1993. Improved techniques for immortalizing animal cells. *Methods Biotech.* 11, 232-238.
- \* Mello C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., Ambros, V., 1991. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and intergration of transforming sequences. *EMBO J.* 10, 3959-3970.
- \* Morales et al., 1999. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genet.* 21, 115-119.
- \* Morris, R.L., Brown, H.M., Wright, B.D., Sharp, D.J., Sullivan, W., Scholey, J.M., 2001. Microinjection methods for analysing the function of kinesins in early embryos. *Methods Mol. Biol.* 164, 163-172.
- \* Moss, J.B., McQuinn, T.C., Schwartz, R.J., 1994. The avian cardiac alpha-actin promoter is regulated through a pair of complex elements that bind both positive- and negative-acting factors. *J. Biol. Chem.* 269, 12731-12740.
- \* Mottram, J.C., Brooks, D.R., Coombs, G.H., 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interaction. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 455-60.
- \* Mundodia, V., Somanaa, A., Farrellb, P., Gedamu, L., 2002. Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* 282, 257-265.
- \* Munro, S., Pelham, H.R.B., 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.
- \* Nabhan, J.F., Hamdan, F.F., Ribeiro, P., 2001. A *Schistosoma mansoni* Pad1 homologue stabilizes c-Jun. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116, 209-218.
- \* Neumann S, Ziv E, Lantner F, Schechter I., 1992. Cloning and sequencing of an hsp70 gene of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 357-360.
- \* Neumann, S., Ziv, E., Lantner, F., Schechter, I., 1993. Regulation of hsp70 gene expression during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Biochem.* 212, 589-596.
- \* Okamoto, T., Toyooka, K., Minamikawa, T., 2001. Identification of a membrane-associated cysteine protease with possible dual roles in the endoplasmic reticulum and proteine storage vacuole. *J. Biol. Chem.* 276, 742-751.
- \* Old, R.W., Primrose, S.B., 1992. *Gentechnologie (Eine Einführung)*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- \* Olesen, C.E.M., Fortin, J.J., Voyta, J.C., Bronstein, I., 1997. Detection of  $\beta$ -Galactosidase and  $\beta$ -Glucuronidase using chemoluminescent reporter gene assays. Human Press Inc. Totowa, NJ.
- \* Oliveira, G.C., Kemp, M., 1995. Cloning of two actin genes from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75, 119-122.

- \* Oro, G., 1984. Establishment of a mosquito cell line from *Haemagogus equinus* larvae. In *Vitro* 20, 153-160
- \* Ortega, M.A., Diaz-Guerra, M., Satre, L., 1996. Actin gene structure in two *Artemia* species, *A. franciscana* and *A. parthenogenetica*. *J. Mol. Evol.* 43, 224-235.
- \* Osman, A., Niles, E.G., LoVerde, P.T., 1999. Characterisation of the ras homologue of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100, 27-41.
- \* Pan, S.T., 1980. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. *J. Invertebr. Pathol.* 36, 307-372.
- \* Parsell, D.A., Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of demanged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437-496.
- \* Pereira, A., 2000. A transgenic perspective on plant functional genomics. *Transgenic Res.* 9, 245-260.
- \* Picard, D., 1994. Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 511-515.
- \* Piekarski, G., 1973. *Medizinische Parasitologie in Tafeln*. Springer Verlag, Berlin.
- \* Pino-Heiss, S., Brown, M., McKerrow, J.H., 1985. *Schistosoma mansoni*: degradation of host extracellular matrix by eggs and miracidia. *Exp. Parasitol.* 59, 217-221.
- \* Pollard, T.D., 1990. Actin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 33-40.
- \* Popiel, I., 1986. The reproductive biology of schistosomes. *Parasitol. Today* 2, 10-15.
- \* Prives, C., 1993. Doing the right thing: feedback control and p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 214-218.
- \* Que, X., Reed, S.L., 2000. Cysteine proteases and the pathogenesis of amoebiasis. *Clin. Microbiol. Rev* 13, 196-206.
- \* Quijada, L., Soto, M., Alonso, C., Requena, J.M., 2000. Identification of a putative element in the 3'-untranslated region that controls expression of hsp70 in *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 79-91.
- \* Ramachandran, H., Skelly, P., Shoemaker, C.B., 1996. The *Schistosoma mansoni* epidermal growth factor receptor homologue, SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 1-10.
- \* Razin, A., Chedar, H., 1991. DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.* 55, 451-458.
- \* Rekosh, D., Nygren, A., Flodby, P., Hammerskjöld, M.L., Wigzell, H., 1988. Coexpression of human immunodeficiency virus envelope proteins and tat from a single simian virus 40 late replacement vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 334-338.

- \* Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkaemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B., Maas, C., 1996. Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 5888-5893.
- \* Rochefort, H., Capony, F., Garcia, M., 1990. Cathepsin D in breast cancer: from molecular and cellular biology to clinical applications. Cancer Cells 2, 383-388.
- \* Rollinson, D., Blackwell, J., 1999. Exploring parasite genomes. Parasitol. 118, S1.
- \* Rollinson, D., Johnston, D.A., 1999. Genom analysis: helping to solve the molecular mysteries of schistosomes. Helminthologica 36, 147-158.
- \* Rubin, H., 2001. The role of selection in progressive neoplastic transformation. Adv. Cancer Res. 83, 159-207.
- \* Ruley, H., 1983. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. Nature 304, 602-606.
- \* Sajid, M., McKerrow, J.H., 2002. Cysteine protease of parasitic organisms. Mol. Biochem. Parasitol. 120, 1-21.
- \* Salter, J.P., Lim, K.C., Hansell, H., Hsieh, I., McKerrow, J.H., 2000. Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. J. Biol. Chem. 275, 38667-38673.
- \* Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- \* Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolff, E.D., Alan, N., 1987. Delivery of substances in cells and tissues using a particle bombardment process. Practic. Sci. Technol. 5, 27-37.
- \* Sanford, J.C., Smith, F.D. and Russel, J.A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods Enzymol. 217, 483-509.
- \* Sangster, N.C., 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. Int. J. Parasitol. 29, 115-124.
- \* Satou, Y., Satho, N., 1996. Two cis-regulatory elements are essential for the muscle-specific expression of an actin gene in the ascidian embryo. Dev. Growth. Differ. 38, 565-573.
- \* Savioli, L., Renganthan, E., Montresor, A., Davis, A., Behbehani, K., 1997. Control of schistosomiasis - a global picture. Parasitol. Today 13, 444-448.
- \* Scallon, B.J., Bogitsh, B.J., Clinton, C.E., 1987. Cloning of a *Schistosoma japonicum* gene encoding a major immunogen recognized by hyperinfected rabbits. Mol. Biochem. Parasitol. 24, 237-245.
- \* Schiedelmeier, B., Schmitt, R., Müller, W., Kirk, M.M., Gruber, H., Mages, W., Kirk, D.L., 1994. Nuclear transformation of *Volvox carteri*. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 5080-5084.

- \* Schoenenberger, C.A., Steinmetz, M.O., Stoffler, D., Mandinova, A., Aebi, U., 1999. Structure, assembly and dynamics of actin filaments *in situ* and *in vitro*. *Microscopy Res. Tech.* 47, 38-50.
- \* Schüßler, P., Pötters, E., Winnen, R., Bottke, W., Kunz, W., 1995. An isoform of ferritin as a component of protein yolk platelets in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Reprod. Dev.* 41, 325-330.
- \* Schütte, J., Minna, J.D., Birrer, M.J., 1989. Deregulated expression of human c-jun transforms primary rat embryo cells in cooperation with an activated Ha-ras gene and transforms rat-1a cells as a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2257-2261.
- \* Seydoux, G., Schedl, T., 2001. The germline in *C. elegans*: origins proliferation and silencing. *Int. Rev. Cytol.* 203, 139-185.
- \* Shields, J.M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., Der, C.J., 2000. Understanding ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol.* 10, 147-154.
- \* Simcox, A.A., Sobeih, M.M., Shearn, A., 1985. Establishment and characterization of continuous cell line derived from temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 11, 63-70.
- \* Simonsen, C.C., Levinson, A.D., 1983. Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2495-2499
- \* Soldati, D., Boothroyd, J.C., 1993. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* 260, 349-352.
- \* Spandidos, D.A., Wilke, N.M., 1984. Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 310, 469-475.
- \* Srinivasan, A., Peden, K.W.C., Pipas, J.M., 1989. The large tumor antigen of sv40 encodes at least two distinct transforming functions. *J. Virol.* 63, 5459-5463.
- \* Steinmetz, M.O., Stoffler, D., Hoenger, A., 1997. Actin: from cell biology to atomic detail. *J. Struct. Biol.* 119, 295-320.
- \* Stryer, L., 1994. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2. korr. Nachdruck, Heidelberg.
- \* Sutherland, J.D., Witke, W., 1999. Molecular genetic approaches to understanding the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 142-151.
- \* Tainsky, M.A., Bischoff, F.Z., Strong, L.C., 1995. Genomic instability due to germline p53 drives premalignant progression toward cancer in human cells. *Cancer Metastasis Rev.* 14, 43-48
- \* Tavernakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A., Driscoll, M., 2000. Heritable and induced genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genet.* 24, 180-183.
- \* Teixeira, S.M., 1998. Control of gene expression in *Trypanosomatidae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 1503-1516.
- \* Trap, C., Boireau, P., 2000. Proteases in heminthetic parasites. *Vet. Res.* 31, 461-471.

- 
- \* Valle, C., Festucci, A., Calogero, A., et al., 1999. Stage-specific expression of a *Schistosoma mansoni* polypeptide similar to the vertebrate regulatory protein stathmin. *J. Biol. Chem.* 274, 33869-33874.
  - \* Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tomkins, G.J., McCawley, P., 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera; Noctuidae*). *In Vitro* 13, 213-217.
  - \* Waller, S.J., Ratty, A., Burbach, J.P., Murphy, D., 1998. Transgenic and transcriptional studies on neuresecretory cell gene expression. *Cell. Mol. Neurobiol.* 18, 149-171.
  - \* Wang, H., Spillare, E.A., Wang, Q.S., Sabourin, C.L.K. and Stoner, G.D. (1998) p53-independent down-regulation of cyclin D1 and p21 (Waf1) in the process of immortalization of human esophageal epithelial cells. *Int. J. Oncology* 12, 325-328.
  - \* Weeler, T.H., Wheeldon, S.K., 1982. The cultivation in vitro of cells derived from adult *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 335-348.
  - \* Welch, M.D., Mallvarapu, A., Rosenblatt, J., Mitchison, T.J., 1997. Actin dynamics *in vivo*. *Curr. Cell Biol.* 9, 54-61.
  - \* Williams, R.S., Johnston, S.A., Riedy, M., DeVit, M.J., McEllington, S.G., Sanford, J.C., 1991. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 2726-2730.
  - \* Wood, K.V., 1990. Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists. *Promega Notes* 28, 1.
  - \* Wyss, C., 1982. *Chironomus tentans* epithelial cell lines sensitiv to ecdysteroids, juvenil hormone, insulin and heat shock. *Exp. Cell. Res.* 139, 309-319.
  - \* Yoshino, T.P., Lodes, M.J., Rege, A.A., Chappell, C.L., 1993. Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 79, 23-31.
  - \* Yoshino, T.P., 2001. Development of intramolluscan stages of blood and liver flukes: advances in in vitro cultivation. *Keystone Symposium: Molecular Helminthology*, Taos, NM (USA).
  - \* Zalvide, J., DeCaprio, J.A., 1995. Role of pRb-related proteins in simian virus 40 large T antigen mediated transformation. *Mol Cell. Biol.* 15, 5800-5810.
  - \* Zerda, K.S., Dresden, M.H., Chappell, C.L., 1988. *Schistosoma mansoni*: expression and role of cysteine proteinases in developing schistosomula. *Exp. Parasitol.* 67, 238-246.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Arbeiten auf dem Gebiet der funktionellen Genetik in Schistosomen konnten aufgrund des Mangels an etablierten Transformationssystemen bislang nicht durchgeführt werden. Um die Analyse von Genen in diesem humanpathogenen Organismus voranzubringen, war es ein Ziel dieser Arbeit, ein Gentransferprotokoll für *S. mansoni* zu entwickeln und seine Anwendbarkeit zu demonstrieren. Als Grundlage hierfür wurden zunächst Vektoren kloniert, die Reportergene unter der Kontrolle schistosomaler Regulationselemente (Promotor/Terminator) enthielten. Diese Konstrukte wurden anschließend in mammalischen Zellkulturen erfolgreich getestet. Der Vergleich verschiedener Techniken für den Gentransfer offenbarte, dass das Particle Bombardment die Methode der Wahl ist. Zwei verschiedene Geräte für den ballistischen Gentransfer (Helios Gene Gun, PDS 1000) wurden auf ihre Anwendbarkeit hin verglichen. Es stellte sich heraus, dass Versuche mit der Gene Gun zu unbefriedigenden Ergebnissen führten, wohingegen der Einsatz der PDS 1000 den Durchbruch bedeutete. Hiermit gelang die Transformation adulter und larvaler Schistosomen, wobei die Transformationseffizienz bei ca. 10% lag. Die Präsenz der Vektoren, sowie die Transkription und Translation der Reportergene konnte jeweils auf molekularer Ebene bewiesen werden. Durch mikroskopischen Analysen war nicht nur eine Identifizierung der Transgenaktivität möglich, sondern auch die Lokalisation gewebespezifischer Genaktivität. Hierbei zeigte sich z.B., dass GFP-induzierte Fluoreszenz unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des hsp70-Gens in Adulten nur im Tegument gefunden werden konnte. Dieses Resultat stützt die Vermutung, dass es sich bei Hsp70 um ein „major immunogen“ handelt. In Larven hingegen zeigten sich fluoreszierende Bereiche nur innerhalb der Individuen, was eine unterschiedliche Genregulation in den verschiedenen Entwicklungsstadien nahelegt. Erste Experimente zur Charakterisierung des hsp70-Promotors verdeutlichten, dass nur eins der zwei putativen „heat shock response elements“ (HSE) an der Hitzeschockantwort beteiligt ist. Durch die Verwendung der regulatorischen Einheiten der Cystein-Protease ER60 konnte eine gewebespezifische, jedoch entwicklungsunabhängige GFP-Expression im exkretorisch-sekretorischen System (ES) von *S. mansoni* gezeigt werden. Die Lokalisation in Larven lässt den Schluss zu, dass ER60 neben seiner bisher beschriebenen Funktion im ER an der Penetration der Miracidien in den Zwischenwirt und der Migration der Muttersporozysten innerhalb der Schnecke beteiligt sein könnte.

Die vorgestellten Resultate belegen die Verwendbarkeit der angewandten Methode für die Charakterisierung von Genen in Schistosomen, was beispielhaft für andere parasitische Helminthen sein könnte, für die es bislang kein Transformationsprotokoll gibt.

Neben der Etablierung eines Gentransfersystems für *S. mansoni*, wurden erste Versuche zur Immortalisierung von Zellen dieses Organismus unternommen. Durch den Gentransfer eines Fusionsproteins aus GFP und mutiertem Ras mit onkogener Potenz konnten Gewebeveränderungen in Schistosomen hervorgerufen werden, die an neoplastisches Wachstum erinnern. Zellen aus diesen Bereichen könnten in Zukunft die Grundlage zur Isolierung immortaler Schistosomen-Zellen sein.

---

## ABKÜRZUNGEN

Abb.:	Abbildung
Au:	Gold
bp:	Basenpaare
BSA:	Rinderserum-Albumin
BSS:	„balanced salt solution“
bspw.:	beispielsweise
ca.:	circa
CAT:	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
cfu:	„colony forming unit“
dNTP:	Desoxyribonukleotide
dH <sub>2</sub> O:	deionisiert Wasser
Del:	Deletion
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
ES:	„excretory-secretory system“
EtOH:	Ethanol
FCS:	„fetal calf serum“
GFP:	grün fluoreszierendes Protein
GUS:	β-Glucuronidase
h:	Stunde
HSE:	„heat shock response element“
kDa:	Kilodalton
LB-Medium:	LB Broth Base-Medium
LUC:	Luciferase
max.:	maximal
MCS:	„multi cloning site“
min:	Minute
mindest.:	mindestens
mRNA:	messenger RNA
NCS:	„new born calf serum“
nm:	Nanometer
OD:	optischen Dichte
ORF:	„open reading frame“
PBS:	„phosphat buffer saline“
RNA:	Ribonukleinsäure
RT:	Raumtemperatur/Reverse Transkription
RT Kontrolle:	RT-PCR ohne reverse Transkriptase
SSC:	„standard-saline-citrate“
SV40:	„simian virus 40“
Tab.:	Tabelle
TAE:	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
ü.N.:	über Nacht
UTR:	„untranslated region“
vgl.:	vergleiche
wt:	Wildtyp



---

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei PD Dr. Christoph Grevelding für die Betreuung der Arbeit und die Finanzierung meiner Stelle bedanken. Du hast mir das Vertrauen gegeben, diese Aufgabe bewältigen zu können und mich dabei tatkräftig unterstützt. Auch wenn wir nicht immer einer Meinung waren, so ergab sich in der Regel aus der Diskussion ein gutes Gespräch mit vielen neuen Ideen. Ich bedanke mich für den mentalen und handwerklichen Beistand während meiner Promotionsarbeit und die zahlreichen Hilfen mein Englisch, besonders in Bild und Schrift, zu verbessern („bombarded“ schreibt man übrigens mit „d“ am Ende).

Bei Herrn Prof. Ernst möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates und das Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt Prof. Zahner und Dr. Jackstadt für die Zusammenarbeit bei den Versuchen mit der Helios Gene Gun, Dr. Kroth und Fr. Abel für die Unterstützung bei den Experimenten mit der PDS 1000.

Dr. Schaal und Dr. Reichel danke ich für die Bereitstellung der Plasmide, Hr. Quack für die Durchführung der Transfektionsexperimente am MPI in Dortmund sowie Dr. Disso für die Rettung der *Bge*-Zellkultur.

Ich bedanke mich bei Prof. Kunz für die fundierten und erheiternden Diskussionen nicht nur auf dem Weg zu einem gemeinsamen Essen in die Mensa, sondern auch bei der ein oder anderen Veröffentlichung. Desweiteren möchte mich bei Dr. Katja Kapp bedanken, dass sie mir die ersten Einblicke in die tieferen Geheimnisse der Molekularbiologie gewährt hat. Es hat Spaß gemacht von Dir zu lernen und mit Dir zusammen gearbeitet zu haben. Ferner bedanke ich mich bei allen weiteren Mitgliedern des Institutes für Genetik für das angenehme Arbeitsklima. Andreas, Britta, Kim und Jürgen haben mir zudem immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden, so dass auch schwierige Aufgaben problemlos gemeistert werden konnten. Frau David gilt der Dank für ihren Einsatz bei der Schneckenzucht, so dass selten ein Engpass auftrat. Stefan und Thorsten haben mich sowohl molekularbiologisch, als auch computertechnisch hilfreich unterstützt.

Danke auch den Diplomandinnen Anja Buchheiser und Steffi Liedtke sowie den F-Praktikanten(-innen) Tobias Georgi, Michelle Hoffmann und Kyra de Miroschedji. Ihr habt mir nicht nur „den letzten Nerv“ geraubt, sondern auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie, die mich besonders in den letzten drei Jahren unterstützt hat und meine guten und schlechten Launen ertragen hat.

---

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe.

Essen, Mai 2002

Volker Wippersteg

---

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen veröffentlicht:

**Wippersteg, V.**, Kapp, K., Kunz, W., Jackstadt, P., Zahner, H., Grevelding, C.G., 2002. Hsp70-controlled GFP expression in transiently transformed schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 141-151

**Wippersteg, V.**, Kapp, K., Kunz, W., Grevelding, C.G., 2002. Characterization of the cysteine protease ER60 in transgenic *Schistosoma mansoni* larvae. *Int. J. Parasitol.* (in press)

**Wippersteg, V.**, Kapp, K., Kunz, W., Grevelding, C.G., 2002. Biolistic gene transfer to generate transgenic schistosomes. Bio-Rad tech note (in press)

Kapp, K., Cousteau, C., **Wippersteg, V.**, Jourdane, J., Kunz, W., Grevelding, C.G., 2002. Transplantation of in vitro-generated *Schistosoma mansoni* mother sporocysts into *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol.* (submitted)

**Wippersteg, V.**, Kapp, K., Kunz, W., Grevelding, C.G., 2001. Towards transgenic schistosomes. Keystone Symposia: Molecular Helminthology, Taos (New Mexico, USA); eingeladener Sprecher

**Wippersteg, V.**, Kapp, K., Kunz, W., Grevelding, C.G., 2001. Expression analyses of reporter-gene constructs in transgenic schistosomes. Spring meeting of the British society for parasitology, Keele (UK)

Grevelding, C.G., **Wippersteg, V.**, Kapp, K., Kunz, W., 2001. Ballistic DNA transfer to generate transgenic schistosomes. Spring meeting of the British society for parasitology, Keele (UK)

**Wippersteg V.**, Kapp K., Kunz W., Grevelding C.G. (2001) Transgenic schistosomes, not only a dream; 6<sup>th</sup> International symposium on schistosomiasis, Heidelberg

Kapp, K., **Wippersteg, V.**, Kunz, W., Grevelding, C.G., 2000. Gene transfer in *Schistosoma mansoni* by physical methods, an approach to study gene regulation; Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Stuttgart-Hohenheim