

**Lokalisations- und Inhibierungsstudien
dreier Protein-Tyrosinkinasen
und die Isolierung eines Interaktionspartners
der Src-Tyrosinkinase SmTK3
bei *Schistosoma***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Jürgen Knobloch
aus
Ratingen**

**Düsseldorf
2002**

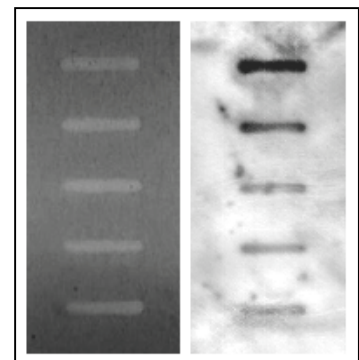
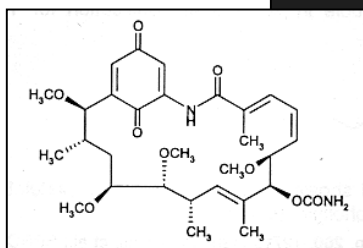
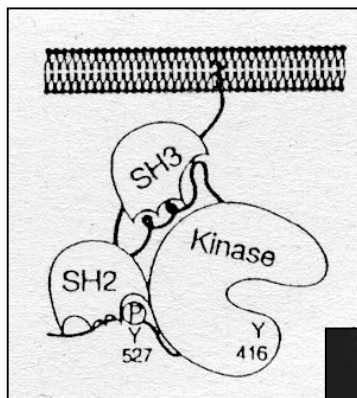
**Lokalisations- und Inhibierungsstudien
dreier Protein-Tyrosinkinasen
und die Isolierung eines Interaktionspartners
der Src-Tyrosinkinase SmTK3
bei *Schistosoma***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Jürgen Knobloch
aus Ratingen

Düsseldorf, 2002



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

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Kunz

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2002

für

N. Maaß

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL & METHODEN	10
2.1.	Material	10
2.1.1.	Puffer und Lösungen	10
2.1.2.	Medien und Zusätze	11
2.1.3.	Enzyme	12
2.1.4.	DNA-Molekulargewichtsstandard	12
2.1.5.	Protein-Molekulargewichtsstandard	12
2.1.6.	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	13
2.1.7.	Antiseren und Antikörper	13
2.1.8.	Bakterienstämme	13
2.1.9.	Hefestämme	14
2.1.10.	Genbanken	14
2.1.11.	Plasmide	14
2.1.12.	Rekombinante Plasmide	14
2.1.13.	PC-Hardware und -software, Internet-Programme	15
2.2.	Methoden	16
2.2.1.	Laborzyklus von <i>Schistosoma mansoni</i>	16
2.2.1.1.	Infektionen der Endwirte und Isolierung von adulten Schistosomen	16
2.2.1.2.	Präparation von Schistosomen-Eiern und Gewinnung von Miracidien	16
2.2.1.3.	Schneckenzucht und Infektion von Schnecken	17
2.2.1.4.	Gewinnung von Cercarien	17
2.2.1.5.	Lagerung der Larvenstadien	17
2.2.2.	<i>In vitro</i> Kultur von adulten Schistosomen	17
2.2.3.	Bakterien	18
2.2.3.1.	Anzucht und Aufbewahrung von Bakterienstämmen	18
2.2.3.2.	Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterienzellen	18
2.2.3.3.	Herstellung elektrokompeter Zellen	18
2.2.4.	Hefen	19
2.2.4.1.	Anzucht und Aufbewahrung von Hefestämmen	19
2.2.5.	Isolation von Nukleinsäuren	19
2.2.5.1.	Genomische DNA aus <i>Schistosoma mansoni</i>	19
2.2.5.2.	Gesamt-RNA aus <i>Schistosoma mansoni</i>	19
2.2.5.3.	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> , alkalische Lyse	19
2.2.5.4.	Die Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> via Kits (Macherey-Nagel, Qiagen)	20
2.2.5.5.	Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe	20
2.2.6.	Isolation von Proteinen	20
2.2.6.1.	Herstellung zellfreier, denaturierter Proteinrohextrakte aus <i>S. mansoni</i>	20
2.2.6.2.	Herstellung zellfreier, nativer Proteinrohextrakte aus <i>S. mansoni</i>	20
2.2.7.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	21
2.2.8.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	21
2.2.9.	Volumeneinengung von Proteinen	21

Inhaltsverzeichnis

2.2.10.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA	21
2.2.10.1	Agarose-Gele	21
2.2.10.2	Denaturierende Gele zur Auftrennung von RNA	22
2.2.11.	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen	22
2.2.12.	Isolation von DNA aus Agarose-Gelen	23
2.2.12.1.	Elektroelution von DNA aus Agarose-Gelen	23
2.2.12.2.	Kits zur Isolation von DNA aus Agarosegelen	23
2.2.13.	Enzymatische Reaktionen an DNA	24
2.2.13.1.	Restriktion von DNA	24
2.2.13.2.	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA	24
2.2.13.3.	Ligation von DNA-Molekülen	24
2.2.13.3.1.	<i>Ligation von DNA mit glatten DNA-Enden („blunt end“)</i>	24
2.2.13.3.2.	<i>Ligation von DNA mit überstehenden Enden</i>	24
2.2.13.4.	Klonierung von DNA mit kommerziell erhältlichen Kits	24
2.2.14.	Transformation	25
2.2.14.1.	Transformation von Bakterienzellen	25
2.2.14.1.1.	<i>Transformation von Bakterien via Hitzeschock</i>	25
2.2.14.1.2.	<i>Transformation von Bakterien via Elektroporation</i>	25
2.2.14.2.	Transformation von Hefezellen	25
2.2.14.2.1.	<i>Einfache Transformation von Hefezellen</i>	25
2.2.14.2.2.	<i>Sukzessive Co-Transformation von Hefezellen im Rahmen eines Yeast-Two-Hybrid-Screenings</i>	26
2.2.15.	DNA-Sequenzierung nach Sanger	26
2.2.16.	Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	26
2.2.16.1.	Transfer von DNA auf Membranen (Southern Blot)	26
2.2.16.2.	Transfer von RNA auf Membranen (Northern Blot)	27
2.2.16.3.	Transfer von DNA auf Membranen per Slot-Blot	27
2.2.16.4.	Transfer von RNA auf Membranen per Slot-Blot	27
2.2.17.	Transfer von Proteinen auf Membranen	27
2.2.17.1.	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	27
2.2.17.2.	Transfer von Proteinen auf Membranen per Slot-Blot	27
2.2.18.	Radioaktive und nicht-radioaktive Markierung von DNA	28
2.2.18.1.	„Random Priming“	28
2.2.18.2.	Radioaktive Markierung mittels PCR	28
2.2.18.3.	Direkte Markierung von DNA mit Alkalischer Phosphatase	29
2.2.18.4.	<i>In vitro</i> -Transkription (für <i>in-situ</i> -Hybridisierung)	29
2.2.19.	Hybridisierung	29
2.2.20.	Nachweis von Nukleinsäuren auf Membranen	30
2.2.20.1.	Radioaktiv-markierte Sonden	30
2.2.20.2.	DAPI-Färbung	30
2.2.20.3.	Methylenblau-Färbung	30
2.2.21.	Dehybridisierung von Membranen	31
2.2.22.	Nachweis filtergebundener Proteine	31
2.2.22.1.	Direkter Farbnachweis	31
2.2.22.2.	Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine	31
2.2.23.	„Polymerase Chain Reaction“ (PCR)	31
2.2.24.	Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)	32

Inhaltsverzeichnis

2.2.25.	<i>In vivo</i> Expression eines Proteins	32
2.2.26.	Isolierung monospezifischer Antikörper	33
2.2.26.1.	Immunoaffinitätsreinigung (Postadsorption)	33
2.2.27.	<i>In situ</i>-Hybridisierung	33
2.2.27.1.	Fixierung nach Bouin	33
2.2.27.2.	Einbettung in Paraffin	33
2.2.27.3.	Beschichtung der Objektträger	34
2.2.27.4.	Silikonisieren der Deckgläser	34
2.2.27.5.	Erstellung von Semidünnschnitten	34
2.2.27.6.	Hybridisierung	34
2.2.27.7.	Detektion	35
2.2.28.	Immunhistologie	35
2.2.28.1.	Antikörperumsetzung	35
2.2.28.2.	Detektion	36
2.2.29.	Histologische Färbung von Semidünnschnitten mit Toluidin-Blau	36
2.2.30.	Quantifizierung der DNA-Synthese bei Schistosomen	36
2.2.30.1.	Nachweis von eingebautem BrdU in filtergebundener DNA	36
2.2.30.2.	Bemerkungen zur Technik der DNA-Synthese-Quantifizierung	37
2.2.31.	Konstruktion einer Yeast-Two-Hybrid-Bank, Yeast-Two-Hybrid-Screen und Verifizierung von Interaktionen	37
2.2.32.	Phylogenetische Analysen	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1.	Die Src-Tyrosinkinase SmTK3	38
3.1.1.	Northern-Blot-Analyse von SmTK3 mit einer Sonde aus dem 3'-Bereich	38
3.1.2.	RT-PCR-Analyse zum Nachweis von SmTK3-Transkripten in verschiedenen Entwicklungsstadien	39
3.1.3.	<i>In-situ</i> -Hybridisierungen mit SmTK3	40
3.1.4.	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen SmTK3: Bakterielle Expression von SmTK3-Subklonen und anschließende Immunisierung	42
3.1.5.	Western-Blot-Analyse mit SmTK3: Vergleich von maturen Weibchen und Männchen	43
3.1.6.	Western-Blot-Analyse mit SmTK3: Vergleich von maturen und virginen Weibchen	44
3.1.7.	Immunlokalisation mit SmTK3 und der Vergleich mit den <i>in-situ</i> -Hybridisierungen	45
3.2.	Die Protein-Tyrosinkinasen SmTK4 und SmTK5	47
3.2.1.	Die Syk-Tyrosinkinase SmTK4	47
3.2.1.1.	<i>In-situ</i> -Hybridisierung und RT-PCR-Analysen mit SmTK4	47
3.2.1.2.	Phylogenetische Analyse von SmTK4	47
3.2.2.	Die Src-Tyrosinkinase SmTK5	49
3.2.2.1.	<i>In-situ</i> -Hybridisierung und phylogenetische Analyse von SmTK5	49

Inhaltsverzeichnis

3.3.	Die Isolierung von Bindungspartnern der Tyrosinkinase SmTK3	50
3.3.1.	Das Prinzip der Yeast-Two-Hybrid-Systeme Matchmaker II und III	50
3.3.2.	Die <i>bait</i>-Konstrukte	50
3.3.3.	Sukzessives Screening einer embryonalen <i>Drosophila</i>-Bank mit den Konstrukten TK3-US/SH3 und TK3-SH3	52
3.3.3.1.	Identifizierung der positiven Klone	53
3.3.3.2.	Verifizierung der Interaktionen	54
3.3.3.3.	Die Qualität der ermittelten Interaktionen und der Einfluss der SmTK3- <i>unique-site</i> auf die Bindungsstärke	56
3.3.4.	Die Konstruktion einer <i>Schistosoma</i>-Yeast-Two-Hybrid-Bank	57
3.3.5.	Screening der <i>Schistosoma</i>-Bank mit dem Konstrukt TK3-US/SH3	58
3.3.5.1.	Identifizierung der positiven Klone und Verifizierung der Interaktionen	58
3.3.6.	Ein <i>Schistosoma</i>-Homolog zum Diaphanous-Protein (SmDRF) als putativer Bindungspartner von SmTK3 - die Klongruppe B	61
3.3.6.1.	Die Qualität der SmTK3/SmDRF-Interaktion und der Einfluss der <i>unique-site</i> auf die Bindungsstärke	61
3.3.6.2.	Die kodierende Nukleinsäuresequenz von SmDRF (Sm-DRF-V)	61
3.3.6.3.	Die Aminosäuresequenz von SmDRF-V: Homologien und konservierte Domänen	64
3.3.6.4.	Charakterisierung der weiteren Klone der Gruppe B	68
3.3.6.5.	Northern-Blot-Analyse von Sm-DRF-V	69
3.4.	Die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von mitotischer Aktivität bei Schistosomen	71
3.4.1.	Die Methode in der Übersicht	71
3.4.2.	Quantifizierung von Filter-gebundener DNA durch DAPI-Färbung	72
3.4.2.1.	Voraussetzungen	72
3.4.2.2.	Hintergrundfärbung in Abhängigkeit von der Länge der Waschzeiten	72
3.4.2.3.	Die Stöchiometrie zwischen DNA-Menge und Intensität der DAPI-Färbung	74
3.4.3.	Der Vergleich von DNA-Syntheseraten: DAPI-Färbung kombiniert mit BrdU-Detektion	74
3.5.	Mitotische Aktivität adulter Schistosomen in Abhängigkeit von der Paarung	76
3.6.	Der Einfluss von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Reifung von <i>Schistosoma</i>-Weibchen	79
3.6.1.	Inhibitorstudien an Schistosomen: Vorüberlegungen und Voraussetzungen	79
3.6.1.1.	Wahl der Inhibitoren	79
3.6.1.2.	Klassen und Spezifitäten von PTK-Inhibitoren	79
3.6.1.3.	Phylogenetische Untersuchungen an SmTK3, SmTK4 und SmTK5	80
3.6.1.4.	Behandlung von Schistosomen mit Tyrosinkinase-Inhibitoren	81
3.6.2.	Der Tyrosinkinase-Inhibitor Butein	82
3.6.2.1.	Einfluss von Butein auf das Paarungsverhalten und auf die Morphologie von Schistosomen	83
3.6.2.2.	Einfluss von Butein auf die DNA-Synthese gepaarter Schistosomen	86
3.6.2.3.	Einfluss auf die p14-Expression	87
3.6.3.	Herbimycin A, ein selektiver Inhibitor für Tyrosinkinasen der Src-Familie	89
3.6.3.1.	Einfluss von Herbimycin A auf die Paarung von Schistosomen	89

Inhaltsverzeichnis

3.6.3.2.	Einfluss von Herbimycin A auf die DNA-Synthese gepaarter Schistosomen	90
3.6.3.3.	Einfluss von Herbimycin A auf die p14-Expression in gepaarten und entpaarten Weibchen	92
3.6.3.4.	Einfluss von Herbimycin A auf die Eiablage	94
3.6.3.5.	Tyrosinphosphorylierung bei gepaarten Schistosomen unter dem Einfluss von Herbimycin A	95
3.6.3.6.	Die Interaktion von Herbimycin A mit SmTK3	97
3.6.4.	Piceatannol, ein selektiver Inhibitor für Tyrosinkinasen der Syk-Familie	98
3.6.4.1.	Einfluss von Piceatannol auf die Paarung von Schistosomen	98
3.6.4.2.	Einfluss von Piceatannol auf die DNA-Synthese gepaarter Schistosomen	99
3.6.4.3.	Einfluss von Piceatannol auf die p14-Expression in gepaarten Weibchen	99
4.	DISKUSSION	101
4.1.	Struktur, Regulation und Funktion von Src-Tyrosinkinasen	101
4.2.	Die Charakterisierung von SmTK3 auf Nukleinsäure- und auf Proteinebene	103
4.3.	Das Expressionsmuster von SmTK5	105
4.4.	Interaktionspartner von SmTK3 und die Bindungseigenschaften der SH3-Domäne	105
4.4.1.	Interaktionspartner von SmTK3 im heterologen System	106
4.4.2.	Interaktionspartner von SmTK3 im homologen System	110
4.4.3.	Die Qualität der <i>Schistosoma</i> -Yeast-Two-Hybrid-Bank und des homologen Screenings	112
4.4.4.	Heterologer und Homologer Screen im Vergleich	114
4.4.5.	Die Bindungseigenschaften der SH3-Domäne von SmTK3	114
4.4.6.	Die Bindungseigenschaften der <i>unique-site</i> von SmTK3	116
4.5.	FH-Proteine, Diaphanous-Proteine und SmDRF	117
4.5.1.	Diaphanous-Proteine als Mitglieder der FH-Protein-Superfamilie	117
4.5.2.	SmDRF/SmDRF-V	119
4.5.3.	SmTK3 und SmDRF/SmDRF-V	120
4.6.	Die Entwicklung einer Technik zur Quantifizierung von DNA-Synthese in Schistosomen	122
4.7.	Einblicke in die Vitellarentwicklung durch Inhibitorstudien	123
4.7.1.	Der Src-selektive Tyrosinkinase-Inhibitor Herbimycin A	123
4.7.2.	Die Selektivität von Herbimycin A für Tyrosinkinasen der Src-Familie	123
4.7.3.	Die Veränderung der mitotischen Aktivität bei murenen Weibchen durch Herbimycin A	124
4.7.4.	Die Veränderung der p14-Expression und der Eiablage bei murenen Weibchen durch Herbimycin A	125

Inhaltsverzeichnis

4.7.5.	Die zeitliche Koordination der Stimulierung von Zellproliferation und p14-Expression im Vitellarium	126
4.7.6.	Der Regulation der p14-Genexpression	127
4.7.7.	Die Spezifität der Wirkung von Herbimycin A auf die DNA-Synthese, die p14-Expression und die Eiproduktion	130
4.7.8.	Herbimycin A und SmTK3	131
4.8.	SmTK3, SmDRF und die Vitellarentwicklung	133
4.9.	Der Tyrosinkinase-Inhibitor Butein	134
4.10.	Die Syk-Tyrosinkinase SmTK4	135
4.10.1.	Struktur, Regulation und Funktion von Syk-Tyrosinkinasen	135
4.10.2.	Die Charakterisierung von SmTK4 auf Nukleinsäureebene daraus abgeleitete putative Funktionen	135
4.10.3.	Erweiterte Erkenntnisse über SmTK4 durch den Einsatz von Piceatannol	136
4.11.	Der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren bei <i>Schistosoma</i>	137
4.12.	Ausblicke	137
5.	ANHANG: Partielle cDNA-Sequenzen der positiven Klone aus dem homologen Two-Hybrid-Screening mit SmTK3	139
6.	ZUSAMMENFASSUNG	149
7.	LITERATUR	150
8.	ABKÜRZUNGEN	162
	Eidesstattliche Erklärung	
	Veröffentlichungen	
	Danksagung	

1. EINLEITUNG

Der Pärchenegel *Schistosoma mansoni* verfügt in den adulten Entwicklungsstadien über einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus (Abb. 1-1). Diese Zweigeschlechtlichkeit ist ein Charakteristikum der *Schistosomatiidae* und unterscheidet sie von den sonst ausschließlich zwittrigen Mitgliedern ihrer Klasse (*Trematoda*). *Schistosoma mansoni* durchläuft einen komplexen Lebenszyklus mit Generations- und Wirtswechsel über zwei freilebende Larvenstadien (Miracidium, Cercarie), eine Süßwasserschnecke (*Biomphalaria glabrata*) als Zwischenwirt und dem Menschen als Endwirt. Im Blutgefäßsystem des Endwirtes umklammert das Männchen bei der oft lebenslangen Paarung das schlankere und längere Weibchen mittels seiner Bauchfalte, dem sogenannten *Canalis gynaecophorus* (Abb. 1-1; Mehlhorn & Piekarski, 2002; Ross, *et al.*, 2002). Dieser dauerhafte Paarungskontakt ist die essentielle Voraussetzung für die Reifung der Fortpflanzungsorgane bei adulten Weibchen. Dies betrifft hauptsächlich das Vitellarium und das Ovar (Abb. 1-2). Das Vitellarium (Dotterstock) produziert differenzierte Vitellozyten, deren Hauptaufgaben in der Expression von Eischalengenen und in der Bereitstellung von Dotterproteinen liegen. Ca. Vierzig Vitellozyten und eine Oozyte, die im Ovar heranreift, setzen sich zu einem fertigen Ei zusammen. Virgine Weibchen¹ bleiben in ihrer Entwicklung zurück, entwickeln nur Gonadenanlagen (Abb. 1-2) und produzieren (nahezu) keine Eier (Popiel, 1986; Kunz, 2001).



Abb. 1-1. Adulte *Schistosoma mansoni*. Das Männchen umklammert das Weibchen.

Morphologische Untersuchungen haben ergeben, dass Vitellarium und Ovar schon nach wenigen Tagen degenerieren, wenn mature Weibchen vom Männchen getrennt werden. Bei anschließender Re-Paarung tritt eine Regeneration der betroffenen Organe ein (Clough, 1981; Popiel *et al.*, 1984). Im reifen Weibchen werden vier Differenzierungsstadien von Vitellinzellen unterschieden: Die mitotisch aktiven S1-Zellen, zwei Übergangsstadien (S2, S3) und die differenzierten S4-Zellen (Abb. 1-3; Erasmus, 1973; Popiel, *et al.*, 1984; Rollinson & Simpson, 1987). Schon nach zwei Tagen Entpaarung sind die Übergangsstadien kaum noch zu detektieren, nach 35 Tagen ist auch die Zahl der S1-Zellen deutlich reduziert und differenzierte Zellen fehlen fast vollständig (Popiel, *et al.*, 1984). Die Vitellaranlagen virginer Weibchen enthalten ausschließlich S1-Zellen in geringer Zahl (Abb. 1-2). Den Hollander & Erasmus (1984) zeigten, dass bei virginen Weibchen signifikant weniger DNA repliziert wird als bei maturaen Weibchen. Also korreliert die Reifung des Weibchens mit der mitotischen Aktivität. Ein maturaes Weibchen produziert pro Tag durchschnittlich 300 Eier, also ca. 12.000 reife Vitellinzellen (Popiel, 1986). Aus diesen Daten folgt zunächst, dass der Großteil der mitotischen Aktivität im maturaen Weibchen auf Zellteilungen im Vitellar zurückzuführen ist. Also resultiert die deutliche Reduktion der mitotischen Aktivität bei virginen Weibchen vor allem aus der reduzierten Zellproliferation im Vitellar (Kunz, 2001). Weiterhin kann der Schluss gezogen werden, dass einige Gene, die für die Reifung des Weibchens essentiell sind, in die Steuerung von Zellteilungsprozessen involviert sind.

¹ Ab dem Zeitpunkt, an dem ein Weibchen zum ersten Mal Kontakt zu einem Männchen hat, ist es nicht mehr als virgin zu bezeichnen.

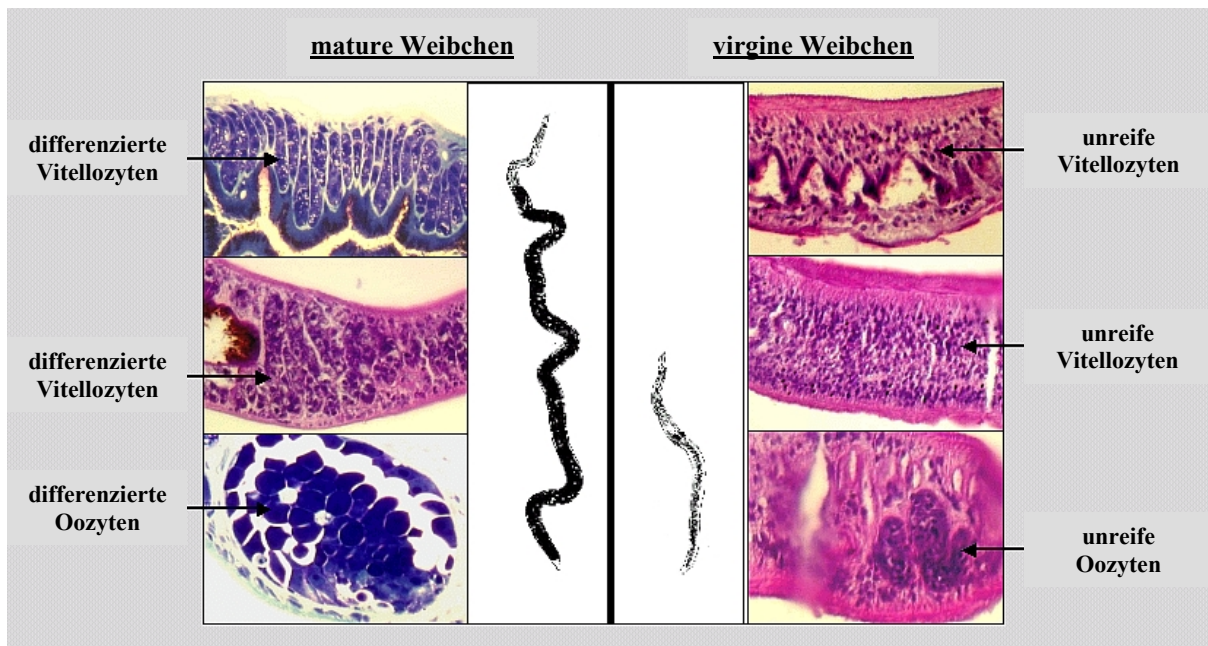


Abb. 1-2. Vergleich zwischen murenen und virginen Weibchen. *Innen:* Schematischer Größenvergleich; das Vitellar (schwarz) nimmt ca. $\frac{2}{3}$ des Körpervolumens eines reifen Weibchens ein, während es im virginen Weibchen nur als Anlage vorhanden ist. Daraus resultiert ein deutlicher Größenunterschied zwischen murenen und immaturenen Weibchen. *Außen:* Histologischer Vergleich von Vitellar (1:200) und Ovar (1:400) in den beiden Entwicklungsstadien der Adulten. Die Semidünnschnitte wurden mit Toluidin-Blau bzw. mit Haematoxylin/Eosin gefärbt. Das Vitellarium murenen Weibchen enthält viele undifferenzierte Zellen, Übergangsstadien und ausdifferenzierte Vitellozyten. Beim virginen Weibchen besteht die Vitellaranlage nur aus wenigen undifferenzierten Vitellozyten (Rollinson & Simpson, 1987). Entsprechendes gilt auch für das Ovar, auch wenn dort mikroskopisch keine Übergangsstadien nachweisbar sind.

Der Paarungskontakt ermöglicht den Austausch von Molekülen zwischen den beiden Geschlechtern (Männchen-Weibchen-Interaktion). Obwohl es einige Untersuchungen in diese Richtung gegeben hat, sind bisher kaum überzeugende Beispiele beschrieben worden. Möglicherweise findet ein bidirektionaler Austausch von Cholesterol zwischen beiden Geschlechtern statt (Haseeb, *et al.*, 1985; Popiel & Basch, 1986; Silveira *et al.*, 1986). Es wird postuliert, dass ein Faktor, der vom Männchen abgegeben wird, die Reifung der Schistosomen-Weibchen steuert (Popiel, 1986; Kunz, 2001). Paarungserfahrene Männchen² stimulieren innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Isolierung aus dem Endwirt in der *in vitro*-Kultur virgine Weibchen bei Paarungskontakt zu einer signifikant höheren DNA-Syntheseaktivität als unisexuelle Männchen³. Nach weiteren 24 Stunden lässt sich hingegen kein Unterschied mehr feststellen (Den Hollander & Erasmus, 1985). Diese Beobachtung legt nahe, dass das Männchen zunächst einmal die Kapazität erlangen muss, um den Stimulus, der die Reifung des Weibchens steuert, in den erforderlichen Mengen zu produzieren und/oder abzugeben. Der Faktor selbst ist bisher unbekannt, sowohl ein taktile Reiz als auch chemische Botenstoffe kommen in Frage. Ein taktile Reiz ergibt sich aus der engen Umklammerung des Weibchens, die neurosekretorische Prozesse auslösen

² Paarungserfahrene Männchen haben dauerhaften Kontakt zu einem Weibchen.

³ Unisexuelle Männchen haben keinen Kontakt zu Weibchen. Im Vergleich mit paarungserfahrenen Männchen können keine morphologischen Unterschiede festgestellt werden. Werden solche Männchen jedoch mit virginen Weibchen *in vitro* gepaart, so sind sie innerhalb der ersten 24 Stunden nicht in der Lage, die mitotische Aktivität in den Weibchen mit gleicher Effizienz wie paarungserfahrene Männchen zu stimulieren (Den Hollander & Erasmus, 1985).

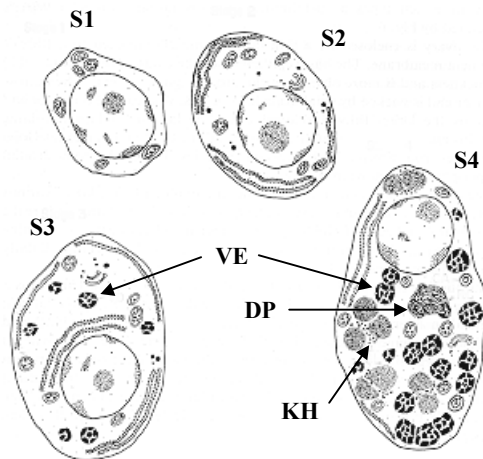


Abb. 1-3. Schematische Darstellung der verschiedenen Differenzierungsstadien von Vitellinzellen. Folgende mikroskopisch sichtbare Veränderungen treten im Laufe der Differenzierung (S1-S4) auf: Zunahme des Zytosplasma-Volumens; steigende Anzahl von Vakuolen-ähnlichen Organellen, die unvernetzte Eischalenproteine enthalten (VE); Zunahme des Gehaltes an Dotterproteinen, die vermutlich endogen durch den Abbau von zelleigenen Organellen produziert werden (DP); vermehrte Ansammlung von Kohlenhydraten (KH). Modifiziert nach Rollinson & Simpson (1987).

könnte. Chemische Botenstoffe könnten vom Männchen sekretiert und vom Weibchen aufgenommen werden. Paarungsexperimente mit Wurmsegmenten wiesen jedoch eindeutig eine örtlich begrenzte Wirkung des Stimulus nach (Popiel & Basch, 1984).

In allen vielzelligen Organismen wird durch ein kompliziertes interzelluläres Kommunikationssystem gewährleistet, dass Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel einer großen Zahl von Zellen in den verschiedenen Organen und Geweben aufeinander abgestimmt sind. Dabei spielen neben dem lokalen Austausch von Molekülen über Zell-Zell-Kontakte (z.B. Gap-Junctions) und der elektrischen Weiterleitung von Reizen über Veränderung der Membranpotentiale vor allem die Verständigung von Zellen mit Hilfe von extrazellulären Signalmolekülen eine entscheidende Rolle. Diese Signalmoleküle werden von bestimmten Signalzellen gebildet sowie sezerniert und lösen nur in solchen Zielzellen eine spezifische Reaktion aus, die spezifische Rezeptoren für diese Signale besitzen. Zur Kommunikation werden von Zellen meist niedermolekulare Substanzen, wie z.B. kleine lipophile Verbindungen, Aminosäurederivate oder Peptide verwendet. Die intrazelluläre Antwort auf ein extrazelluläres Signal besteht aus dessen Weiterleitung über einen Signalweg bis zum Zielort innerhalb der Zelle und der dortigen Auslösung einer chemischen Reaktion. Beispielsweise werden Transkriptionsfaktoren modifiziert und dadurch (in-) aktiviert. Viele dieser Signalwege sind miteinander verknüpft, so dass ein komplexes Netzwerk entsteht. Daher können durch ein Signal mehrere Reaktionen ausgelöst werden. Es ist ebenso möglich, dass ein bestimmter Vorgang die Präsenz von mehreren Signalen gleichzeitig oder zeitlich versetzt benötigt. Alle diese Vorgänge werden mit dem Begriff Signaltransduktion zusammengefasst (Lodish, 2001). Es ist anhand von zahlreichen Beispielen bei Invertebraten und bei Vertebraten gezeigt worden, dass Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse durch Signaltransduktion gesteuert werden (z.B. Duffy & Perrimon, 1996; Weber-Nordt *et al.*, 1998; Baek & Lee, 1999; Harwood, 2002). Die Männchen-abhängige Differenzierung der weiblichen Fortpflanzungsorgane ist durch das Zusammenspiel zweier Organismen ein entwicklungsbiologisch hochinteressantes Beispiel für eine Signaltransduktion bei Schistosomen.

Die humanpathogenen Schistosomen verursachen die Bilharziose (Schistosomiasis), eine (Sub-) Tropenkrankheit, die jährlich ca. 300-500.000 Todesfälle verursacht und daher von großer medizinischer Relevanz ist (Johnston *et al.* 1999; Ross *et al.*, 2002). Die Pathogenität der Endoparasiten ist hauptsächlich auf die große Anzahl an Eiern zurückzuführen, die vom Weibchen

produziert werden. Durch Medikamente wie Praziquantel können akute Infektionen bekämpft werden, das Risiko einer Reinfektion bleibt jedoch bestehen. Das Angebot an Pharmazeutika zur Vorsorge gegen die Schistosomiasis ist momentan nicht ausreichend. Daher sind in den letzten zwanzig Jahren viele Versuche mit dem Ziel durchgeführt worden, freigesetzte oder Oberflächenantigene von Schistosomen zu isolieren und anschließend ihr immun-protectives Potential zu ermitteln (Bergquist *et al.*, 2002). Die Resultate waren in der Regel unbefriedigend, da die meisten der identifizierten Moleküle keine ausreichende Protektivität gegen Schistosomen bieten und daher für die Erzeugung von Vakzinen nicht in Frage kommen. Daher ist es sinnvoll, sich nach alternativen Strategien umzusehen. Eine Möglichkeit besteht in der dauerhaften Unterbrechung des Paarungskontaktes oder - gleichbedeutend damit - in der Unterbrechung eines vom Männchen aktivierten Signalweges, der die Reifung des Weibchens einleitet. Daher ist die Erforschung der zentralen Signalwege, die zur Entwicklung und Differenzierung von Vitellar und Ovar führen, von entscheidender Bedeutung.

Moderne Forschung auf dem Gebiet der Signaltransduktion an Modellorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* sowie Resultate aus der Tumorbilogie haben gezeigt, dass einzelne Signalmoleküle und ganze Signaltransduktionskaskaden über die Gesamtheit der vielzelligen tierischen Organismen hochkonserviert sind. Ein Beispiel dafür ist der *wingless*-Signalweg bzw. dessen Homolog, der sowohl bei *Drosophila* als auch bei *Gallus gallus* eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Flügel einnimmt (Lodish, 2001). Ein anderes Beispiel ist der RTK/Ras/Map-Kinase-Signalweg, der u.a. bei *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* Zellproliferation und Differenzierungsereignisse steuert (Duffy & Perimon, 1996; Tan & Kin, 1999; Gomperts, 2002).

Es existieren verschiedene Wege, die Information des Signals in das Innere der Zelle zu übertragen und anschließend den Zielprozess auszulösen (Lodish, 2001). Welcher intrazelluläre Signalweg schließlich eingeschlagen wird, ist von den Eigenschaften des Signalmoleküls und dem passenden Rezeptor sowie dessen Verfügbarkeit abhängig. Verschiedene lipophile Hormone diffundieren durch die Plasmamembran und binden an intrazelluläre Rezeptoren - z.B. Steroidhormone/Steroidrezeptoren. Solche Steroidrezeptoren können an entsprechende regulatorische Elemente der DNA binden und die Transkription von Genen regulieren. Hydrophile Signalmoleküle - wie z.B. Wachstumsfaktoren - hingegen interagieren mit Transmembranrezeptoren, die sich grob in vier Klassen einteilen lassen. Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche die erste Klasse repräsentieren, erfolgt die Weiterleitung des Signals nach Bindung des Liganden über ein G-Protein, das seinerseits die Aktivität von Ionenkanälen oder Enzymen beeinflusst. Solche Effektorenzyme katalysieren in der Regel die Synthese von *second messengern*, wie z.B. cAMP. In der zweiten Klasse werden Rezeptoren zusammengefasst, die über eine eigene enzymatische Aktivität verfügen, die durch Ligandenbindung aktiviert wird. In diese Kategorie fallen z.B. Rezeptor-Proteinkinasen und -phosphatasen. Die Weiterleitung des Signals innerhalb der Zelle erfolgt z.B. über zytoplasmatische Proteinkinasen oder -phosphatasen und über kleine G-Proteine, z.B. Ras oder Rho. Bestimmte Rezeptoren verfügen über keine eigene katalytische Aktivität, interagieren jedoch bei Bindung eines Liganden mit cytosolischen Protein-Tyrosinkinasen und stellen die dritte Klasse dar. Über solche Rezeptoren reagieren Vertebraten-Zellen vor allem auf die Stimulation durch Cytokine und Interferone, so dass diese Klasse in der Immunologie von großer Bedeutung ist. Die vierte Klasse demonstriert das Zusammenspiel von elektrischer

und chemischer Reizweiterleitung und beinhaltet Ionenkanalrezeptoren, die das Membranpotential beeinflussen.

Viele Beispiele bei multizellulären Organismen zeigen, dass Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse außerhalb des Immunsystems hauptsächlich über Steroidhormonrezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und über Rezeptor-Proteinkinasen ablaufen (Alberts *et al.*, 1995; Lodish, 2001, Gomperts, 2002). Bei *Schistosoma mansoni* sind bisher noch keine vollständigen Signalwege, wohl aber einzelne (konservierte) Signalmoleküle bekannt: Fragmente mit Homologie zu diversen Steroidhormonrezeptoren (Escriva *et al.*, 1997), zwei Retinoid-Rezeptor-homologe Moleküle (Freebern *et al.*, 1999a; 1999b), eine EGFR-homologe Rezeptor-Tyrosinkinase (Schoemaker *et al.*, 1992), eine Rezeptor-Serin/Threoninkinase vom Typ I (TGF β -Rezeptor; Davis *et al.* 1998), ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (Hamdan *et al.*, 2002), die α -Untereinheit eines stimulierenden G-Proteins (Iltzsch *et al.*, 1992), die kleinen G-Proteine Ras (Kampkotter *et al.*, 1999; Osman *et al.*, 1999) und Rab (Loeffler & Bennett, 1996) und zwei Smad-homologe Proteine (Beall *et al.*, 2000; Osman *et al.*, 2001). Für keines der Moleküle gibt es jedoch überzeugende Hinweise auf eine Funktion in der Männchen-induzierten Reifung des Weibchens.

Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren in den Arbeitsgruppen von Prof. Kunz und PD Dr. Grevelding nach weiteren Signaltransduktionsmolekülen gesucht, mit dem finalen Ziel, einen Signalweg zu identifizieren, der für die Reifung des Weibchens von zentraler Bedeutung ist. Dabei richtete sich der Fokus hauptsächlich auf Protein-Tyrosinkinasen (PTKs). Unter der Bezeichnung PTK werden zwei Enzymklassen zusammengefasst: Die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen (TKs), die als gemeinsames Merkmal eine Tyrosinkinase-Domäne⁴ besitzen (Hubbard & Till, 2000). Die Klasse der TKs untergliedert sich in acht Familien, die hauptsächlich aufgrund der Präsenz und der Anordnung konservierter Domänen voneinander unterschieden werden (Abb. 1-4). Innerhalb der Familie der Src-Tyrosinkinasen (Src-TKs) kommt es bei Vertebraten zu einer weiteren Unterteilung in neun

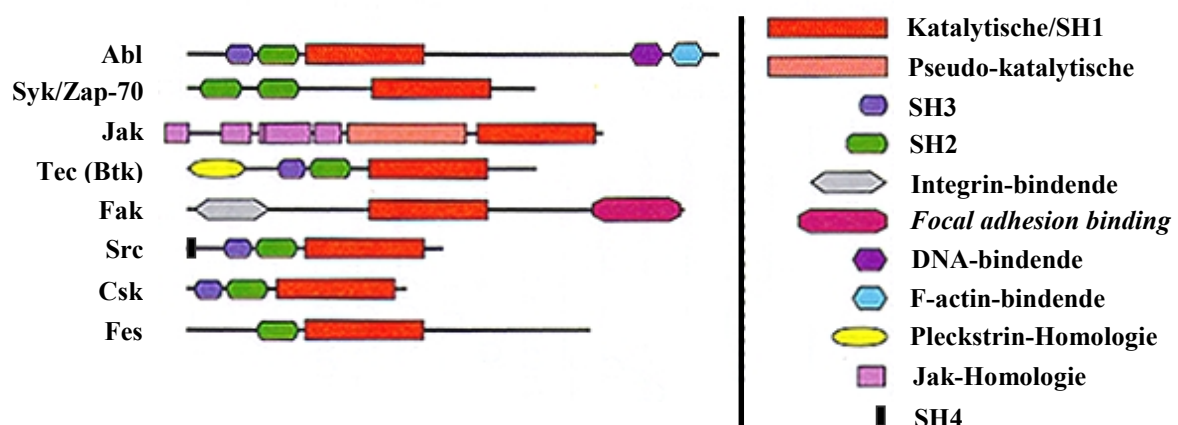


Abb. 1-4. Anordnung konservierter Domänen bei den wichtigsten Familien von zytoplasmatischen Protein-Tyrosinkinasen. Modifiziert nach Hubbard & Till (1997).

⁴ Die Tyrosinkinase-Domäne wird häufig auch als katalytische, TK- oder SH1-Domäne bezeichnet (Tatosyan & Mizenina, 1999).

Subfamilien (Thomas & Brugge, 1997; Hubbard & Till, 2000). TKs verschiedener Familien sind mehrfach als Komponenten von Signalwegen beschrieben worden, die oft von GPCRs und RTKs induziert werden und die Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse von Geweben und Organen regulieren (Brown & Cooper, 1996; Thomas & Brugge, 1997).

P. Schussler (1997) und M. Quack (1997) haben in ihren Promotions- bzw. Diplomarbeiten über die Methode der PCR mit degenerierten Primern, die gegen hochkonservierte Regionen innerhalb der katalytischen SH1-Domäne gerichtet waren, erfolgreich zytoplasmatische Tyrosinkinasen von *Schistosoma mansoni* isolieren können. Bisher konnte die komplette kodierende DNA-Sequenz für drei TKs ermittelt werden (Winnen, 1999; Kapp, 2000; Kapp *et al.*, 2001; Knobloch *et al.*, 2002). Zwei weitere Fragmente, die eine hohe Homologie zur SH1-Domäne von PTKs aufweisen, stehen noch zur Bearbeitung aus (Schussler, 1997). In vorherigen Arbeiten sind die drei vollständigen TKs auf Nukleinsäureebene zumindest teilweise charakterisiert worden (Schussler, 1997; Winnen, 1999; Kapp, 2000; Kapp *et al.*, 2001; Knobloch *et al.*, 2002). Durch Vergleiche mit Molekülen aus diversen Datenbanken konnte jede der drei TKs in bestehende TK-Familien eingeordnet werden. Diese Kategorisierung erfolgte sowohl auf der Basis von Präsenz und Anordnung konservierter Domänen als auch durch Homologie-Vergleiche mit der gesamten abgeleiteten Aminosäuresequenz. Demnach handelt es sich bei SmTK3 und SmTK5 um Tyrosinkinasen aus der Src-Familie, während SmTK4 den Syk-Tyrosinkinasen zuzuordnen ist. Die weitere Charakterisierung ergab, dass alle drei TKs wahrscheinlich als *single-copy*-Gen im Genom von *Schistosoma* vorliegen und dass jeweils ausschließlich Transkripte gebildet werden, welche die vollständige kodierende Nukleinsäuresequenz repräsentieren. Dabei werden die beiden Src-ähnlichen Tyrosinkinasen in adulten Männchen und Weibchen in gleichem Maße, SmTK4 hingegen signifikant stärker im Männchen als im Weibchen exprimiert. Zusätzlich konnte für SmTK5 eine Expression in allen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Weitestgehend ungeklärt ist hingegen die Funktion der drei TKs. Da bisher für keines der drei Moleküle abgeschlossene Lokalisations- und/oder Funktionalitätsstudien durchgeführt worden sind, ist auch eine mögliche Beteiligung eines der drei Enzyme an der Männchen-Weibchen-Interaktion nicht geklärt. Einige vage Hinweise liegen jedoch vor: SmTK3 wird möglicherweise gewebespezifisch in den weiblichen Gonaden exprimiert, jedoch wurden die entsprechenden *in-situ*-Hybridisierungen ohne Kontrollen durchgeführt (Schussler, 1997). Für SmTK4 konnten gewebespezifische Transkripte in den Testes nachgewiesen werden (Winnen, 1999). Eine mögliche Expression im Weibchen ist aber nicht untersucht worden.

Von Src-Tyrosinkinasen ist aus Untersuchungen an Vertebraten sowie Invertebraten bekannt, dass sie Schlüsselfunktionen in der Cytokinese und in Differenzierungsprozessen von Zellen einnehmen (Brown & Cooper, 1996; Thomas & Brugge, 1997; Tatosyan & Mizenina, 1999). Im humanen Organismus sind diverse Src-TKs Bestandteil von EGF- und PDGF-induzierten Signalwegen, die DNA-Synthese regulieren (Belsches *et al.* 1997). Das prominenteste Beispiel stellt sicherlich das Proto-Onkogen c-Src dar. Wird c-Src in immaturren, humanen Zellen durch das verkürzte und dadurch konstitutiv aktive v-Src ersetzt, resultiert daraus eine Stimulation der Zellteilung und eine Blockierung der Differenzierung; ein Vorgang, aus dem letztendlich ein Sarkom entstehen kann (Schwartzberg, 1998). Syk-Tyrosinkinasen hingegen spielen bei Vertebraten mehr im haematopoetischen System eine Rolle, wo sie z.B. im Zusammenspiel mit Immunrezeptoren auf Cytokine reagieren (Turner *et al.*, 2000; Sada *et al.*, 2001). Über die Funktion dieser Molekülklasse in Invertebraten ist bisher wenig bekannt.

An die Expression eines Moleküls, das eine Schlüsselfunktion in der Reifung der Reproduktionsorgane des adulten Weibchens einnimmt, werden zunächst einmal zwei Erwartungen gestellt: Das Protein sollte in den Gonaden lokalisiert sein und entwicklungspräferentiell oder -spezifisch in adulten, maturaen Weibchen exprimiert werden. Aufgrund der Hinweise auf eine gewebespezifische Expression im Vitellarium und im Ovar erscheint SmTK3 als vielversprechendster Kandidat für eine solche Funktion. Folglich besteht ein Ziel dieser Promotionsarbeit darin, die Transkription von SmTK3 in den Gonaden der Weibchen zu verifizieren. Um anschließend durch Immunhistologie die Lokalisation des Proteins ermitteln zu können, soll ein spezifischer, polyklonaler Antikörper gegen SmTK3 produziert werden. Die Expressionsorte der beiden weiteren TKs werden zunächst nur auf Nukleinsäureebene untersucht. Immunlokalisationsstudien stehen für den Fall an, dass die Ergebnisse auf eine mögliche Beteiligung an der Vitellarreifung hinweisen.

Aufgrund der hohen Konservierung von Signalmolekülen, ganzer Signalkaskaden und z.T. auch ihrer Zielproteine lässt die Kenntnis der *up-* und *downstream* in der Hierarchie des Signalwegs gelegenen Interaktionspartner eines Signalmoleküls Rückschlüsse auf dessen Funktion zu. Voraussetzung dafür ist, dass gleichartige Interaktionen in Signalwegen vorkommen, die bei Modellorganismen bereits eingehend untersucht worden sind. Allerdings müssen Aussagen über die Funktion von Signalproteinen auf der Basis von Homologie mit Vorsicht betrachtet werden. Im Zuge der Evolution können sowohl einzelne Moleküle, als auch ganze Kaskaden trotz eines hohen Verwandtschaftsgrades zu entsprechenden Proteinen/Signalwegen in anderen Organismen durchaus in ihrer Funktion verändert werden. Sollte schließlich ein Signalmolekül identifiziert und isoliert werden, das eine zentrale Funktion bei der Männchen-Weibchen-Interaktion einnimmt, ist es von großer Bedeutung, über eine Technik zu verfügen, welche die Identifizierung von Bindungspartnern erlaubt, um auf einen Signalweg schließen zu können. Deswegen ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu etablieren, mit der Bindungspartner für bekannte Proteine isoliert werden können. Dafür bietet sich in erster Linie das Yeast-Two-Hybrid-System an, das darauf basiert, Fusionsproteine in Hefen zu exprimieren und eine mögliche Interaktion anhand der Aktivität von Reporter genen nachzuweisen (Brachmann & Boeckle, 1997; Gietz & Woods, 2002). Da Yeast-Two-Hybrid-Banken für *Schistosoma mansoni* nicht kommerziell erhältlich sind, muss eine solche zunächst einmal konstruiert werden. Anschließend sollen durch die Isolierung eines Bindungspartners von SmTK3 zum einen die Qualität der Bank demonstriert und zum anderen Hinweise auf die Funktion dieser Tyrosinkinase erhalten werden.

Die einleitend zusammengefassten morphologisch/histologischen Unterschiede zwischen den Vitellarien und Ovarien maturaer und virginer Weibchen korrelieren auf molekularer Ebene nicht nur mit veränderten DNA-Syntheseraten sondern auch mit variierender Expressionentwicklungsspezifischer regulierter Gene. So konnte über quantitative Northern-Blot-Analysen gezeigt werden, dass diverse Eischalengene (p14, p48), das Eisenspeicherprotein Ferritin I und das Mucin-ähnliche-Protein A11 in maturaen, nicht aber in virginen Weibchen und außerdem noch paarungsabhängig exprimiert werden (Johnson *et al.*, 1987; Bobek *et al.*, 1988; Grevelding *et al.* 1997). Alle diese Daten führten zu einer Arbeitshypothese, nach der das Signal vom Männchen über einen zentralen Signalweg in undifferenzierten Vitellarzellen die Expression von Genen bewirkt, die Mitosen verursachen. Als Folgeprozesse werden die Ereignisse von der Differenzierung der Vitellarzellen bis hin zur Eiproduktion ausgelöst (Abb. 1-5; Kunz *et al.*, 1995).

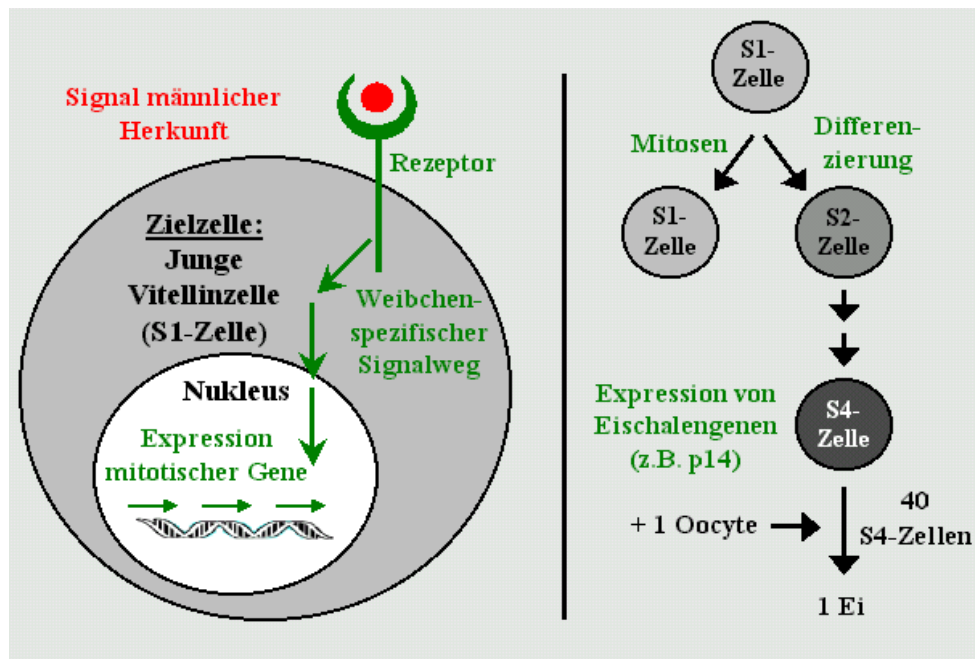


Abb. 1-5. Die Männchen-induzierte Reifung des Vitellars auf molekularer Ebene - eine Hypothese. Ein Signalmolekül vom Männchen aktiviert einen Rezeptor an der Oberfläche von jungen Vitellinzellen (S1-Zellen). Der Rezeptor aktiviert seinerseits einen möglicherweise weibchenspezifischen Signalweg, der die Expression von Genen bewirkt, die Mitosen auslösen. Alternativ oder zusätzlich können auch Zellzyklusproteine mit entsprechender Wirkung modifiziert werden. Als Folge der Zellteilungen werden Differenzierungsprozesse eingeleitet: Undifferenzierte S1-Zellen entwickeln sich zu differenzierten S4-Zellen, in denen u.a. Eischalengene exprimiert werden und die als Nährzellen zusammen mit der Oocyte das fertige Ei bilden.

Um eine Übersicht zu erhalten, welchen Klassen von Signalmolekülen bei dieser Männchen-Weibchen-Interaktion eine zentrale Bedeutung zukommt, sollen als drittes Ziel dieser Arbeit die Auswirkungen von kommerziell erhältlichen Inhibitoren auf die Entwicklung des Weibchens untersucht werden. Es gibt eine Reihe von Inhibitoren gegen diverse Signalmoleküle, von denen einige sehr spezifisch gegen bestimmte Klassen, Familien oder gar Subfamilien wirken - vorausgesetzt, es werden adäquate Konzentrationen eingesetzt (Chang & Geahlen, 1992; Levitzki, 1992; Levitzki, 1999; Hao & Rowinsky, 2002; McCluskey *et al.*, 2002). In der Regel entfalten solche Inhibitoren ihre Wirkung, indem sie entweder an oder in der Nähe des aktiven Zentrums eines (enzymatischen) Signalmoleküls binden und somit dessen katalytische Aktivität unterbinden, oder sie blockieren den Zugang zu einem Substrat durch eine Wechselwirkung mit entsprechenden Bindungsstellen. Da es sich gerade bei diesen Regionen um hochkonservierte Sequenzabschnitte handelt, können diese Inhibitoren, die ursprünglich für die Zellkultur von Vertebraten entwickelt worden sind, auch bei Invertebraten eingesetzt werden. Um Inhibitorstudien an *Schistosoma* durchzuführen, sind weitere Voraussetzungen notwendig:

1. Eine Methode, mit der die Inhibitoren Zugang zu den Parasiten bekommen. Dafür eignet sich die Haltung der Plattwürmer unter Zugabe von Inhibitoren in der *in-vitro*-Kultur⁵. Adulte Schistosomen besitzen als abschließende, äußere Gewebeschicht mit dem Tegument eine kernlose, syncytiale Neodermis, über die Nährstoffe resorbiert werden. Die weitere Verteilung im gesamten Körper beruht auf Stoffaustausch mit dem Parenchym (Mehlhorn & Pie-

⁵ In der Wurmkultur können adulte Schistosomen für mehrere Wochen lang kultiviert werden. Dabei sind die Weibchen durchaus in der Lage, Eier zu legen, aus denen sich anschließend Miracidien entwickeln (Grevelding *et al.*, 1997; Kapp, 2000).

karski, 2002). Daher ist anzunehmen, dass die für gewöhnlich hydrophoben Inhibitoren ohne weitere Manipulationen über das Tegument aufgenommen werden und alle Gewebe erreichen können.

2. Methoden, um Veränderungen von biologischen Prozessen nachzuweisen, welche den Reifungsstatus anzeigen (Zielprozesse). Die zuvor vorgestellte Hypothese (Abb. 1-5) besagt, dass ein Signal vom Männchen über einen oder mehrere zentrale Signalwege als erste und damit direkte Antwort die Zellproliferation im Vitellar induziert. Die weiteren Vorgänge sind Folgeprozesse und möglicherweise nur sekundäre Reaktionen auf diesen Stimulus. Also stellt die DNA-Synthese den bedeutendsten Zielprozess für die Inhibitorstudien dar. Für die präzise Messung von mitotischer Aktivität bei Schistosomen ist lediglich eine Technik beschrieben, die auf dem Einbau von Isotopen in die DNA von kultivierten Würmern basiert (Den Hollander & Erasmus, 1984). Aufgrund der Verwendung von radioaktiven Substanzen ist die Methode jedoch unkomfortabel und für Messungen im größeren Maßstab daher schlecht zu gebrauchen. Also bedarf es zunächst der Entwicklung einer neuen Methode, die einfacher zu handhaben ist, die eine Durchführung umfassender Messreihen ohne großen Arbeitsaufwand erlaubt und die ohne Radioaktivität auskommt.

Nach der Hypothese entwickeln sich die unreifen S1-Zellen im Anschluss an die erhöhte Zellteilungsaktivität zu differenzierten S4-Zellen. Erst in diesen differenzierten Vitellozyten werden Eischalengene exprimiert, eine wichtige Voraussetzung zur Eiformation und zur Eiablage. Auch auf diese Folgeprozesse soll der Einfluss diverser Inhibitoren untersucht werden. Um Aussagen über die Eischalenproteinsynthese machen zu können, wird stellvertretend die p14-Expression über quantitative Northern- und Western-Blot-Analysen ermittelt. Die Eiproduktion kann einfach durch Auszählen der abgelegten Eier in der *in vitro* Kultur bestimmt werden.

Letztendlich stellt sich die Frage, welche Inhibitoren eingesetzt werden. Das wird in erster Linie von dem Verlauf der Lokalisationsstudien abhängig sein. Wird auch nur eine der drei TKs gewebespezifisch im Vitellarium exprimiert, so werden Inhibitoren eingesetzt, die gegen die entsprechende Proteinfamilie gerichtet sind. Wird keine der Tyrosinkinasen im Vitellarium exprimiert, so ist geplant, sich zunächst auf die DNA-Synthese als Zielprozess zu beschränken und dafür mehrere Inhibitoren verschiedener Familien und Subfamilien von Signalmolekülen zu verwenden. Dabei wird der Fokus insbesondere auf die Blockierung von Signalmolekülen gerichtet, von denen aus Untersuchungen an Modellorganismen bekannt ist, dass sie Entwicklungsprozesse und speziell Mitosen steuern.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Puffer und Lösungen

30%-ige Acrylamidlösung:	290 g Acrylamid; 10 g N,N'-Methylenbisacrylamid; 600 ml dH ₂ O; bei 37°C lösen; ad 1 Liter einstellen; eventuell filtrieren
Anodenpuffer für WB:	200 mM Tris-Base, pH 10.4; 20% MeOH
Antikörperblockierlösung:	1-5% BSA in Antikörperwaschlösung
Antikörperinkubationslg.:	0.3-2.5% BSA in Antikörperwaschlösung
Antikörperwaschlösung:	1x PBS; 0.05% Tween 20; autoklavieren
Bind-Silan:	2% Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan
Bouin-Fixativ:	15% (v/v) gesättigte Pikrinsäure; 5% (v/v) Formaldehyd; 1% (v/v) Essigsäure; in dH ₂ O
Denhardt's (100x):	2x SSC; 2% (w/v) Ficoll; 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon; 2% (w/v) BSA; in dH ₂ O; filtrieren
DNA-Blaumarker:	50% Glycerin; 0.1% Bromphenolblau; 0.1% Xylencyanol FF; in 1x TBE
Hybridisierungslösung:	6x SSPE (oder 5x SSC); 0.5% SDS; 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA; 5x Denhardt's; ggf. 50% Formamid; in dH ₂ O
H ₂ O _{DEPC} :	dH ₂ O wird mit 0.1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, 12 h gerührt und zweimal autoklaviert
Kathodenpuffer für WB:	40 mM ε-Aminocapronsäure; 25 mM Tris-Base, pH 9.4; 20% MeOH
Maleinsäurepuffer:	0.1 M Maleinsäure; 0.15 M NaCl; pH: 7.5; in dH ₂ O; autoklavieren
Maleinsäurewaschpuffer:	0.3% Tween 20 in Maleinsäurepuffer
MOPS (10x):	0.2 M 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; in dH ₂ O; pH 7.0
PBS (10x):	1.37 M NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 65 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; pH-Wert 7.1 einstellen und autoklavieren
Phenol:	Kristallines Phenol wird bei 68°C im Wasserbad geschmolzen, das flüssige Phenol wird mit dem gleichen Volumen 0.5 M Tris/HCl (pH-Wert 8.0) versetzt und 15 min gerührt. Nach eingesetzter Phasentrennung wird die obere, wässrige Phase verworfen. Die Äquilibrierung/Sättigung wird solange wiederholt, bis die organische Phase einen pH-Wert von >7.8 hat. Die Lagerung erfolgt in geeigneten Aliquots bei -20°C oder bei 4°C mit 0.1 Volumen 0.1 M Tris/HCl (pH-Wert 8.0) zur Überschichtung.
Phenol/Chloroform:	Tris/HCl gesättigtes Phenol und Chloroform werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, die Lagerung erfolgt bei 4°C
Ponceau Rot S (10x):	2% Ponceau Rot S (Sigma); 30% Sulfosalizylsäure; 30% Trichloressigsäure; in dH ₂ O

Proteinase K-Puffer:	0.1 M Tris/HCl (pH-Wert 8.0); 0.05 M EDTA (pH-Wert 8.0); autoklavieren; Stammlösung von 10 mg/ml Proteinase K
Repel-Silan:	0.3% Methacryloxypropyltrimethylsilan; 0.3% Essigsäure; in 96% EtOH
RNA-Blaumarker:	900 µl deionisiertes Formamid; 100 µl 10x MOPS; 161 µl 37% Formaldehyd; 20 µl Bromphenolblau; 20 µl Xylencyanol FF; 10 µl (10mg/ml) Ethidiumbromid; lichtgeschützt bei 4°C lagern
RNase A-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH-Wert 7.5); 15 mM NaCl; autoklavieren, Stammlösung von 10 mg/ml RNase A und zur Inaktivierung von DNasen 15 min bei 100°C erhitzen, bei -20°C lagern
Sammelgelpuffer (4x):	0.5 M Tris-Base, pH 6.8; 0.4% SDS
SDS-Blaumarker:	1% Bromphenolblau in 1x SDS-Probenpuffer
SDS-Laufpuffer (1x):	200 ml 10x SDS-Laufpuffer; 20 ml 10% SDS; ad 2 Liter mit dH ₂ O
SDS-Laufpuffer (10x):	144.6 g Glycerin; 30 g Tris-Base; ad 1 Liter mit dH ₂ O
SDS-Probenpuffer:	8 ml Glycerin; 4 ml β-Mercaptoethanol; 12 ml 20% SDS; 16 ml 4x Sammelgelpuffer
SSC (20x):	3 M NaCl; 0.3 M Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O; pH-Wert 7.0 einstellen und autoklavieren
SSPE (20x):	3 M NaCl; 0.2 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 20 mM EDTA; pH 7.4 einstellen und autoklavieren
Substratpuffer:	100 mM Tris-Base, pH 8.0
TBE-Puffer (5x):	54 g Tris-Base; 27.5 g Borsäure; 20 ml 0.5 M EDTA; ad 1 Liter mit dH ₂ O; pH 8.0 (ggf. 10-20 µl (5 mg/ml) Ethidiumbromid)
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH-Wert 8.0); 1 mM EDTA (pH-Wert 8.0); autoklavieren
Trenngelpuffer (4x):	1.5 M Tris-Base; 0.4% SDS; in dH ₂ O; pH 8.8

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-Wert 7.5 ergibt sich; sofort autoklavieren
LB-Agar:	1.8% (w/v) Bactoagar in LB-Medium; sofort autoklavieren, abkühlen auf 60°C und in sterile Petrischalen gießen
SD-Medium:	6.7 g/l <i>yeast nitrogen base without amino acids</i> ; mit dH ₂ O bis 850 ml auffüllen; 10x <i>dropout solution</i> hinzugeben (für die hier verwendeten Hefestämme: L-Adenin-Hemisulfat, 200 mg/l; L-Histidin-HCl-Monohydrat, 200 mg/ml; L-Leucin, 1000 mg/l; L-Lysin-HCl, 300 mg/l; L-Methionin, 200 mg/l; L-Tryptophan, 200 mg/l; Aminosäuren, auf die selektiert wird, weglassen); autoklavieren, anschließend auf 55°C abkühlen lassen und 2% [v/v] Glucose (50 ml einer 40% sterilen Stocklösung) hinzugeben und mit sterilem dH ₂ O auf 1 l auffüllen
SD-Agar:	wie SD-Medium, vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar zugeben; nach dem Autoklavieren und der Glucose-Zugabe bei Bedarf die benötigte Menge 3-

	AT (1 M Stocklösung) zugeben und mit sterilem dH ₂ O auf 1 l auffüllen; in sterile Petrischalen gießen
YPD-Medium:	20 g/l Difco Peptone; 10 g/l Hefeextrakt; mit dH ₂ O bis 950 ml auffüllen, pH 5.8 einstellen, autoklavieren; anschließend auf 55°C abkühlen lassen und 2% [v/v] Glucose (50 ml einer 40% sterilen Stocklösung) hinzugeben
YPDA-Medium:	wie YPD, vor dem Autoklavieren 15 ml einer sterilen 0.2% L-Adenin-Hemisulfat-Stocklösung zugeben.
YPD(A)-Agar:	wie YPD(A), vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar zugeben; nach dem Autoklavieren und der Glucose-Zugabe in sterile Petrischalen gießen
Ampicillin:	(Ampicillin-Trihydrat) Stammlösung von 50 - 100 mg/ml, aliquotieren und bei -20°C lagern
Kanamycin:	Stammlösung von 25 mg/ml, aliquotieren und bei -20°C lagern
Tetrazyklin:	Stammlösung von 12.5 mg/ml, aliquotieren und bei -20°C lagern
Streptomycin:	Stammlösung von 10 mg/ml, aliquotieren und bei -20°C lagern
Antibiotika/Antimykotika-Lsg.:	10.000 Einheiten/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycinsulfat, 25 µg/ml Amphotericin B (Fungizone®) Lyophilisat in 20 ml sterilem dH ₂ O zu lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern

2.1.3. Enzyme

Restriktionsendonukleasen des Typs II, Klenow-Polymerase, Taq-Polymerase, MMLV-Reverse Transkriptase, Alkalische Phosphatase (CIP), Proteinase K (aus *Tritirachium album*), RNaseA, RNaseH, DNase, T3-RNA-Polymerase T4-Polynukleotid-Kinase, T4-DNA-Ligase und T7-RNA-Polymerase der Firmen Amersham, Appligene, Eppendorf, Fermentas, Genecraft, In-VitroGen, Merck, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Qiagen, Roche und Stratagene wurden nach Angaben der Hersteller verwendet.

2.1.4. DNA-Molekulargewichtsstandard

1 kB-Leiter (Gibco BRL): 12.216 / 11.198 / 10.180 / 9.162 / 8.144 / 7.126 / 6.108 / 5.090 / 4.072 / 3.054 / 2.036 / 1.636 / 1.018 / 516 / 507 / 396 / 344 / 298 / 220 / 201 / 154 / 134 / 75 bp

2.1.5. Protein-Molekulargewichtsstandard

10 kD-Leiter (Gibco BRL): 200 / 120 / 110 / 100 / 90 / 80 / 70 / 60 / 50 / 40 / 30 / 20 / 10 kD

2.1.6. Synthetische Oligonukleotide (Primer)

M13: 5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3'
M13rev: 5'- AAC AGC TAT GAC CAT G -3'
PAC-fw: 5'- GGC TTA CCC ATA CGA TGT TCC -3'
PAC-rev: 5'- GAT GGT GCA CGA TGC ACA G -3'
PQE-seq-fw: 5'- GCC ATA ACA ATT TCA CAC AG -3'
PQE-seq-rev: 5'- GTT CTG AGG TCA TTA CTG G -3'
T3: 5'- AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG -3'
T7: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
TK3-NT-1: 5'- GGG GAA TTC ACG GTT ACT CCT AAT GAC -3'
TK3-NT-2: 5'- CCC GGA TCC ACG GTT ACT CCT AAT GAC -3'
TK3-NT-3: 5'- GGA CTG CAG CCC TTC TGT AGG TAT CTG -3'
TK3-SH2-1: 5'- GGA GAA TTC GAA TGG TAT TTT GGA G -3'
TK3-SH2-2: 5'- TCC GTC GAC CGG TTT TCC CAA TCG AC -3'
TK3-SH3-1: 5'- GGA GAA TTC GGG CAG TTT GTT GCT TTA C -3'
TK3-SH3-2: 5'- TTC GTC GAC GGA TTC CAA ACT GGT AAC -3'

2.1.7. Antiseren und Antikörper

- anti-BrdU [Sigma, B-2531], monoklonaler IgG₁-AK, isoliert aus Maus
- anti-GAL4 (DBD) (RK5C1) [Santa Cruz Biotechnology, sc-510]; monoklonaler IgG_{2a}-AK, isoliert aus Maus
- anti-Kaninchen IgG (gegen das ganze Molekül) [Sigma, A-9919]; isoliert aus Ziege, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase
- anti-Maus IgG (Fab-spezifisch) [Sigma, A-2179]; isoliert aus Ziege, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase
- anti-p14 (anti-Sx1) isoliert aus Kaninchen (Menrath, 1989)
- anti-Phosphotyrosin (P-tyr-100) [Cell Signaling, #9411]; monoklonaler AK, isoliert aus Maus
- anti-SmTK3 isoliert aus Kaninchen

2.1.8. Bakterienstämme

DH5α (Hanahan, 1983)
HB101 (Kurabayashi *et al.*, 1997)
XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987)

2.1.9. Hefestämme

- AH109: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::Gal1_{UAS}-Gal1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ (James *et al.*, 1996)
- Y187: MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3,112, gal4 Δ , met⁻, gal80 Δ , URA3::Gal1_{UAS}-Gal1_{TATA}-lacZ (Clontech)
- Y190: MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , cyh^r2, LYS2::Gal1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3, URA3::GA1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ (Flick & Johnston, 1990)

2.1.10. Genbanken

Matchmaker GAL4 cDNA-Bank - *Drosophila melanogaster*, Embryo (Clontech; Kat.-Nr.: IL4003AH)

2.1.11. Plasmide

- pACT2: (Clontech, AcNr.: U29899)
- pBluescript SK⁻: (Short *et al.*, 1988)
- pCL1: (Fields & Song, 1989)
- pGADT7: (Clontech)
- pGBKT7: (Clontech)
- pGBT9: (Clontech, AcNr.: U07646)
- pGEM[®]-T Easy: (Promega)
- pLAM5': (Clontech)
- pSTBlue-1: (Novagen)

2.1.12. Rekombinante Plasmide

- D3-xx: Bezeichnung für positive Klone aus dem Screening der *Drosophila*-Yeast-Two-Hybrid-Bank mit TK3-SH3; Vektor: pACT2 (Tab. 3-1/Kap. 3.3.3.1)
- deltaTK3-10: SmTK3-Subklon; repräsentiert den 3'-UTR-Bereich von SH2-43 beginnend mit der *Sac*II-Schnittstelle bis zum Ende; umfasst 370 bp; Vektor: pBluescript SK⁻ (Abb. 3-1/Kap. 3.1, 3.1.1)
- DN-xx: Bezeichnung für positive Klone aus dem Screening der *Drosophila*-Yeast-Two-Hybrid-Bank mit TK3-US/SH3; Vektor: pACT2 (Tab. 3-1/Kap. 3.3.3.1)
- pQE-3-10: Expressionsklon von SmTK3 (Abb. 3-1/Kap. 3.1, 3.1.4; Winnen, 1999)
- pQE-CS12: Expressionsklon von SmTK3; repräsentiert die *unique-site*; Vektor: pQE-30 (Abb. 3-1/Kap. 3.1, 3.1.4)

SH2-43:	Volllängenklon von SmTK3 (Kapp, 2000) mit einer Nukleotidinsertion (T) an Pos. 947 (in der SH2-Domäne), woraus eine Verschiebung des Leserahfers resultiert; Vektor: pBluescript SK ⁻
Sxxx:	Bezeichnung für positive Klone aus dem Screening der <i>Schistosoma</i> -Yeast-Two-Hybrid-Bank mit TK3-US/SH3; Vektor: pGADT7 (Tab. 3.2/Kap. 3.3.5.1)
TK3-SH3:	SmTK3- <i>bait</i> -Konstrukt; enthält die SH3-Domäne; Vektor: pGBT9 (Abb. 3-11 /Kap. 3.3.2)
TK3-US/IS:	SmTK3 Subklon; repräsentiert die ersten 220 bp im 5'-Bereich von SH2-43 bis zur <i>Hind</i> III-Schnittstelle; Vektor: pBluescript SK ⁻ (Abb. 3-1/Kap. 3.1, 3.1.3)
TK3-US/SH3:	SmTK3- <i>bait</i> -Konstrukt; enthält die <i>unique-site</i> und die SH3-Domäne; Vektor: pGBT9 (Abb. 3-11 /Kap. 3.3.2)

x = variable Ziffern

2.1.13. Computerhardware und –software, Internetprogramme

Hardware:	HP Scanjet 4C (Hewlett Packard), Dia-Scanner COOLSCAN II (Nikon)																								
Software:	PC-Clone; Scientific & Educational Software Clone 4; Word 97 (Microsoft Inc.); Photo Editor (Microsoft Inc.); Excel (Microsoft Inc.); Adope Photoshop; Scion-Image (Densitometrie)																								
Internet:	<table> <tr> <td>BLAST:</td> <td>http://www.blast.genome.ad.jp</td> </tr> <tr> <td>CLUSTAL W:</td> <td>http://www.motif.genome.ad.jp</td> </tr> <tr> <td>CLUSTAL X:</td> <td>http://inn-prot.weizmann.ac.il/software/ClustalX.html (dl)</td> </tr> <tr> <td>ExpASy-ProtParam:</td> <td>http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam</td> </tr> <tr> <td></td> <td>http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool</td> </tr> <tr> <td>Fasta3:</td> <td>http://www.ebi.ac.uk/fasta3/?request/</td> </tr> <tr> <td>FLYBASE:</td> <td>http://flybase.bio.indiana.edu</td> </tr> <tr> <td>Multialign:</td> <td>http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html</td> </tr> <tr> <td>NCBI GenBank:</td> <td>http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</td> </tr> <tr> <td>NetPhos 2.0:</td> <td>http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</td> </tr> <tr> <td>SMART:</td> <td>http://smart.embl-heidelberg.de/</td> </tr> <tr> <td>TreeView:</td> <td>http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html (dl)</td> </tr> </table>	BLAST:	http://www.blast.genome.ad.jp	CLUSTAL W:	http://www.motif.genome.ad.jp	CLUSTAL X:	http://inn-prot.weizmann.ac.il/software/ClustalX.html (dl)	ExpASy-ProtParam:	http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam		http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool	Fasta3:	http://www.ebi.ac.uk/fasta3/?request/	FLYBASE:	http://flybase.bio.indiana.edu	Multialign:	http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html	NCBI GenBank:	http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/	NetPhos 2.0:	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	SMART:	http://smart.embl-heidelberg.de/	TreeView:	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html (dl)
BLAST:	http://www.blast.genome.ad.jp																								
CLUSTAL W:	http://www.motif.genome.ad.jp																								
CLUSTAL X:	http://inn-prot.weizmann.ac.il/software/ClustalX.html (dl)																								
ExpASy-ProtParam:	http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam																								
	http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool																								
Fasta3:	http://www.ebi.ac.uk/fasta3/?request/																								
FLYBASE:	http://flybase.bio.indiana.edu																								
Multialign:	http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html																								
NCBI GenBank:	http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/																								
NetPhos 2.0:	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/																								
SMART:	http://smart.embl-heidelberg.de/																								
TreeView:	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html (dl)																								

dl: *download*

2.2. Methoden

2.2.1. Laborzyklus von *Schistosoma mansoni*

Die verwendeten Tiere sind aus einem Liberia-Stamm (Bayer AG, Monheim).

2.2.1.1. Infektionen der Endwirte und Isolierung von adulten Schistosomen

Die Infektion der Endwirte (syrische Goldhamster [*Mesocricetus auratus*], Zentrale Tierversuchsanstalt, Universität Düsseldorf) erfolgt mit Cercarien, die durch den Ausstoß Miracidien-infizierter Süßwasserschnecken (*Biomphalaria glabrata*) gewonnen werden. Die Hamster werden 40 min in warmen Schneckenwasser (32°C) gebadet. Es werden 1500 - 2000 Cercarien pro Endwirt zugefügt, und die Tiere werden weitere 45 min inkubiert. Sechs bis sieben Wochen nach der Infektion werden die adulten Würmer durch Perfusion aus dem Pfortader- und Mesenterialbereich der Hamster gespült (mit Perfusionsmedium). Die Wirtstiere werden zunächst mit Äther betäubt und dann durch eine ins Peritoneum gespritzte Überdosis (3 - 4 ml) des Betäubungsmittels Nembutal (Ceva) eingeschlafert. Nach Aufpräparation der Tiere wird die Pfortader aufgeritzt und eine Perfusionskanüle in den linken Ventrikel gestochen. Mit dem Blutstrom werden die Würmer durch das Gefäßsystem in den Pfortader-Bereich transportiert und können dann aufgefangen werden. Die Würmer werden in Perfusionsmedium mit 10% neonatalem Kälberserum (NCS) gesammelt, nach dem Geschlecht sortiert, portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert.

Schneckenwasser: Lösung I: 55 g CaCl₂ x 2 H₂O, 35 g MgCl₂ x 6 H₂O, dH₂O ad 1 l, autoklavieren
(Stammlösung)
Lösung II: 3 g K₂CO₃, 23 g NaHCO₃, dH₂O ad 1 l, autoklavieren
Lösung III: 24 g NaOH, dH₂O ad 1 l, autoklavieren

fertiges Schneckenwasser: 3 ml Lösung I, 2 ml Lösung II, 0.4 ml Lösung III,
dH₂O ad 1 l

Perfusionsmedium: 1% M199 Pulvermedium (Life Technologies); 2% (v/v) 0.5 M Tris/HCl (pH-Wert 7.4); 0.1% Glucose; vor Gebrauch 10 mg/l (Endkonzentration) Heparin zugeben

2.2.1.2. Präparation von Schistosomen-Eiern und Gewinnung von Miracidien

Die Lebern infizierter Endwirte werden grob mit einer Schere zerkleinert und in 1x PBS in einem Sorvall-Omnimixer homogenisiert. Aus diesem Homogenat werden die Eier durch Zentrifugation für 15 min bei 5000x g und 4°C pelletiert. Der untere Teil des zweistufigen Pellets wird zweimal mit 0.9%iger NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in eine mit Leitungswasser gefüllte Schlupfflasche (ein Erlenmeyerkolben, an dessen Hals ein L-förmiges Glas-

röhrchen angesetzt ist) gegeben und bei 37°C inkubiert. Das Röhrchen wird mit einer Kaltlichtquelle beleuchtet, so dass sich die phototaktisch aktiven Miracidien dort sammeln.

Für eine Titerbestimmung werden Aliquots à 10 - 20 µl mit 96% Ethanol versetzt.

2.2.1.3. Schneckenzucht und Infektion von Schnecken

Die Süßwasserschnecken (*Biomphalaria glabrata*) werden in belüfteten Aquarien bei 26°C Raumtemperatur gehalten. Die Beleuchtung wird durch eine Zeitschaltuhr auf einen Tag-/Nacht-Rhythmus von 12 h geregelt. Die Schnecken werden mit handelsüblichem Salat (zweimal in demineralisierten Wasser gewaschen) und Fischfutter gefüttert.

Für die Infektion werden 10 - 15 Miracidien in Schneckenwasser in 12-well-Platten vorgelegt und einzelne Schnecken von circa 0.5 - 1 cm Ø für 12 h bei 26°C darin inkubiert. Die infizierten Schnecken werden in Aquarien gesetzt, die nach drei Wochen abgedunkelt werden.

2.2.1.4. Gewinnung von Cercarien

Vier bis fünf Wochen nach der Infektion werden die im Dunkeln gehaltenen, infizierten Schnecken in einem Becherglas mit Schneckenwasser ans Licht gesetzt. Nach ca. drei Stunden kann Cercarien-haltige Lösung abpipettiert werden, die erneute Zugabe von Schneckenwasser führt zu einem weiteren Cercarien-Ausstoß. Für die Titerbestimmung werden Aliquots genommen und mit 96% Ethanol versetzt. Die Infektion der Endwirte erfolgt direkt im Anschluss.

2.2.1.5. Lagerung der Larvenstadien

Nach Bestimmung des Titers werden die larvenhaltigen Lösungen für 30 min auf Eis inkubiert. Ca. 90% des Überstandes werden verworfen und die aufkonzentrierte, larvenhaltige Lösung wird in Kryo-Röhrchen portioniert. Solche Röhrchen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert.

2.2.2. *In vitro* Kultur von adulten Schistosomen

Frisch perfundierte adulte Schistosomen werden mit Hilfe eines Binokulars sortiert und in Petrischalen (60 mm Ø) mit 7.5 ml Kulturmedium überführt. Die Tiere werden durch zweimaliges Waschen unter sterilen Bedingungen von anhaftenden Haaren bzw. Gewebefetzen der Endwirte befreit und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Es erfolgt eine tägliche Kontrolle wobei nicht vitale Tiere aussortiert werden. Die Fütterung erfolgt alle 2 d durch Umsetzen in Petrischalen mit frischem Kulturmedium.

M 199-Medium (1 l): 10 g M 199 Pulvermedium; 20 ml 0.5 M Tris/HCl (pH-Wert 7.4); 1 g Glucose; 2.2 g NaHCO₃; dH₂O ad 1 l; sterilfiltrieren und in doppelt-

autoklavierte Flaschen überführen; die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

Kulturmedium: 12.5 mM HEPES (pH-Wert 7.4); 1.25% Antibiotika/Antimykotika-Lösung (Sigma); 10% NCS oder FCS; in M199-Medium; Herstellung unter sterilen Bedingungen, Lagerung bei 4°C für max. zwei Wochen

Um DNA-Syntheseraten bei kultivierten Tieren zu messen, wird zusätzlich 1 mM 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU; Serva) zum Medium hinzugegeben.

2.2.3. Bakterien

2.2.3.1. Anzucht und Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Die Herstellung von Stammplatten, Selektionsplatten, Glycerinkulturen, Übernachtskulturen, Hauptkulturen und die Durchführung der α -Komplementation (Blau-Weiss-Selektion) und Chloramphenicol-Wachstumshemmung erfolgt nach Sambrook *et al.* (1989).

2.2.3.2. Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung erfolgt nach dem Protokoll von Nishimura *et al.*, (1990). Die Transformationseffizienz sollte bei 10^7 - 10^8 cfu/ μ g Plasmid-DNA liegen.

2.2.3.3. Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung von kompetenten Zellen für die Elektroporation wird eine Kolonie des gewünschten Bakterienstamms unter Selektionsbedingungen bei 37°C und 225 rpm in 50 ml SOB-Medium über Nacht angezogen. 7.5 ml dieser Kultur werden in 750 ml angewärmtes SOB-Medium (ohne Zusatz eines Antibiotikums) überführt und bis zu einer OD₅₅₀ von 0.65 - 0.7 bei 37°C und 200 rpm angezogen. Die Kultur wird nun 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 2600x g und 1°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt, das Pellet auf Eis und in einem Kühlraum in 750 ml 10%igem Glycerol (steril, gekühlt) vollständig zur ersten Waschung resuspendiert. Die Bakterien werden durch eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 2600x g, 1°C pelletiert und der Überstand komplett verworfen. Nun wird der Waschschritt wiederholt. Erneut wird der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wird in den letzten Tropfen Flüssigkeit vollständig und gleichmäßig resuspendiert. Von dieser Suspension werden 3 μ l in 1 ml SOB-Medium verdünnt und bei OD₅₅₀ gemessen. Die OD₅₅₀ sollte 0.6-0.75 betragen; liegen die Bakterien in einer zu hohen Konzentration vor, so werden sie mit 10% Glycerol verdünnt. Abschließend werden Aliquots von 50 μ l erstellt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

2.2.4. Hefen

2.2.4.1. Anzucht und Aufbewahrung von Hefestämmen

Die Herstellung von Stammplatten, Selektionsplatten, Glycerinkulturen, Übernachtkulturen und Hauptkulturen erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers der Matchmaker-GAL4-Two-Hybrid-Systeme (Matchmaker 2, Matchmaker 3; Clontech). Die Protokolle sind für diese Systeme optimiert und im „Yeast-Protocol-Handbook“ (PT3024-1) dokumentiert. Das Handbuch ist unter <http://www.clontech.com> einzusehen.

2.2.5. Isolation von Nukleinsäuren

2.2.5.1. Genomische DNA aus *Schistosoma mansoni*

Die Isolation von genomischer DNA aus adulten Würmern oder den Larvenstadien (Miracidien und Cercarien) erfolgt nach einer Modifikation der von C. G. Grevelding beschriebenen Methode (1995). Bis zu 100 Würmer werden mit 360 µl Extraktionspuffer versetzt und dreimal für 15 sec mit einem ULTRA-TURRAX T8 (IKA Labortechnik) homogenisiert. Nach Zugabe von 40 µl 10% SDS erfolgt eine Inkubation bei 37°C für mindestens 4 h oder über Nacht (16 h). Die Aufreinigung der DNA erfolgt durch sukzessive Extraktion mit einem halben Volumen Phenol, einem halben Volumen Phenol/Chloroform (putativ) und einem halben Volumen Chloroform (Zentrifugation jeweils für 5 min bei 15.000x g). Der wäßrige Überstand wird mit 0.5 Volumen 7.5 M Ammonium-Acetat (pH-Wert 7.0) und 2.5 Volumen eiskaltem (-20°C) 96%igem Ethanol versetzt. Die Fällung der DNA erfolgt für mind. 20 min bei -20°C und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 15.000 g und 4°C. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 5 min, wie oben), getrocknet und in dH₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

Extraktionspuffer: 20 mM Tris/HCl (pH-Wert 8.0); 100 mM EDTA (pH-Wert 8.0); 500 µg/ml Proteinase K (werden frisch zugesetzt)

2.2.5.2. Gesamt-RNA aus *Schistosoma mansoni*

Gesamt-RNA wird mit Trizol[®] (Life Technologies), dem RNeasy[®] Kit (Qiagen) oder den Nucleospin[®] RNA II Kit (Machery-Nagel) nach Anweisung der Hersteller gewonnen. Der Aufschluss des Materials erfolgt mit einem ULTRA-TURRAX T8 Homogenisator (IKA Labortechnik).

2.2.5.3. Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*, alkalische Lyse

Diese Methode erfolgt gemäß der Beschreibung nach Sambrook *et al.* (1989).

Als Modifikation kann die RNaseA-Behandlung im Rahmen der Resuspension der Bakterienpellets mit Glucose-Mix erfolgen. Hierzu wird dem Glucose-Mix RNaseA in einer Endkonzentration von 0.1 µg/µl zugesetzt, die Inkubation des resuspendierten Bakterienpellets erfolgt für 5 min bei RT. Im Anschluss erfolgt die weitere Präparation nach der Beschreibung.

2.2.5.4. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* via Kits (Macherey-Nagel, Qiagen)

Die Durchführung von Mini- und Midi-Plasmid-DNA-Präparationen mit "Plasmid-Präparations-Kits" erfolgt gemäß den Angaben der Hersteller. Die Säulen können innerhalb von drei Stunden mehrfach verwendet werden.

2.2.5.5. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe erfolgt nach Robzyk & Kassier (1992). Für die anschließende Transformation der DNA in Bakterien werden HB101-Zellen verwendet.

Sollen positive Klone aus einem Two-Hybrid-Screen mit dem Matchmaker II-System isoliert werden, so erfolgt die weitere Vorgehensweise nach dem *Yeast-Protocol-Handbook* (Kap. VII/C, vgl. Kap. 2.2.4.1 u. 2.2.31).

2.2.6. Isolation von Proteinen

2.2.6.1. Herstellung zellfreier, denaturierter Proteinrohextrakte aus *S. mansoni*

Der Zellaufschluss der Schistosomen erfolgt in SDS-Probenpuffer mit zusätzlich 10 mM PMSF und *Complete, Mini, EDTA-free* Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche, Dosierung nach Angabe des Herstellers) versetzt. Hierzu werden die Schistosomen nach Entnahme aus flüsigem Stickstoff in mindestens 200 µl des oben beschriebenen Aufschlußpuffer resuspendiert und mit Ultraschall (ca. 400 W) viermal für 10 Sekunden aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Beschallungen werden die Ansätze für wenigstens 30 Sekunden auf Eis kaltgestellt. Anschließend werden die Extrakte für 10 Minuten gekocht und die Zellbestandteile durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C pelletiert.

2.2.6.2. Herstellung zellfreier, nativer Proteinrohextrakte aus *S. mansoni*

Für die Gewinnung von nativem Gesamtprotein aus Schistosomen wird das in Kapitel 2.2.6.1 beschriebene Protokoll angewendet. Jedoch wird der dortige Aufschlußpuffer durch den NP-Puffer ersetzt. Weiterhin werden die Proben nach der finale Zentrifugation für zwei Stunden bei RT inkubiert und alle 15 min die entsprechende Menge PMSF hinzugegeben.

NP-Puffer: 100 mM Imidazol; 50 mM NaH₂PO₄; pH 8.0

2.2.7. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgt unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes: $C = E \times \epsilon^{-1} \times d^{-1}$ (mit C: Konzentration der Lösung, E: Extinktion, ϵ : spezifischer Extinktionskoeffizient und d: Schichtdicke der Küvette)

Es gelten bei der Schichtdicke von $d = 1 \text{ cm}$ und der Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ folgende Werte für den Extinktionskoeffizienten (als Näherungswert zu verstehen):

doppelsträngige DNA:	1 OD _{260 nm} = 50 µg/ml
RNA/einzelsträngige DNA:	1 OD _{260 nm} = 40 µg/ml
Oligonukleotide:	1 OD _{260 nm} = 20 µg/ml

So berechnet sich z. B. die Konzentration von doppelsträngiger DNA wie folgt:
 $C [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Das Verhältnis der Absorptionswerte bei $\lambda_{260 \text{ nm}}$ und $\lambda_{280 \text{ nm}}$ wird als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren benutzt und sollte 1.8 bis 2.0 liegen. Es wurde mit einem UV-160A Photometer (Shimadzu) und einem *BioPhotometer* (Eppendorf) gearbeitet.

2.2.8. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Protein-Konzentrationen erfolgt durch Bradford-Assays (Harlow & Lane, 1988).

2.2.9. Volumeneinengung von Proteinen

Zur Aufkonzentration von Proteinen werden Centricon[®]-Filter-Einheiten mit gewünschtem *cut-off* verwendet (Amicon). Die Methode basiert auf dem Prinzip der Ultrafiltration und wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.10. Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA

2.2.10.1. Agarose-Gele

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 100 bp bis 20 kB werden 0.3 - 1.5 %ige horizontale Agarose-Gele in 1x Tris/HCl-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) unter Zusatz von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.5 µg/ml verwendet. Als Laufpuffer wird ebenfalls TBE-Puffer verwendet. Die Proben werden mit 0.1 - 0.2 Volumen DNA-Blaumarker versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 0.5 - 5 V/cm in Abhängigkeit von der Prozentigkeit des Gels und der verwendeten Gelapparatur. Die Visualisierung

erfolgt durch Anregung mit UV-Licht und wird mit einem Video-imaging-system (Phase) dokumentiert.

5x TBE-Puffer: 89 mM Tris/HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
(pH-Wert von 8.3 ergibt sich)

DNA-Blaumarker: 0.1% (w/v) Bromphenol-Blau; 0.1% (w/v) Xylencyanol FF; 50% (v/v) Glycerin in 1x TBE-Puffer

2.2.10.2. Denaturierende Gele zur Auftrennung von RNA

Die aufzutrennende RNA wird durch Hitze denaturiert, so dass ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis und eine hydrodynamisch äquivalente Konformation vorliegt, da eine korrekte Molekulargewichtsbestimmung nur unter diesen Bedingungen möglich ist. Hierfür werden 1.5%ige Agarose-Gele mit Morpholinopropansulfonsäure-Puffer (MOPS-Puffer) und Formaldehyd verwendet.

Pro 100 ml Agarose-Lösung werden 73.3 ml $\text{dH}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ mit 10 ml 10x MOPS gemischt, mit 1.5 g Agarose versetzt und aufgekocht. Unter Rühren werden 16.7 ml 37%iges Formaldehyd dazugegeben und das Gel gegossen. Die Proben werden mit 2 - 3 Volumen RNA-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 65°C denaturiert, sofort für 5 min auf Eis überführt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt mit 1x MOPS-Puffer bei 50 - 80 V, je nach Gelapparatur. Die Detektion und Dokumentation erfolgt wie oben beschrieben (Kap. 2.2.10.1).

10x MOPS-Puffer: 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH-Wert 7.0 einstellen und autoklavieren

RNA-Auftragspuffer: 900 μl deionisiertes Formamid, 100 μl 10x MOPS, 161 μl 37%iges Formaldehyd, 20 μl 1%iges (w/v) Bromphenolblau (in $\text{dH}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$), 20 μl 1%iges (w/v) Xylencyanol (in $\text{dH}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$), 10 μl Ethidiumbromid (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), lichtgeschützt bei 4°C lagern

2.2.11. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

(nach Lämmli, 1970)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgt in einem diskontinuierlichen Gelsystem (SDS-PAGE). Das 4.5%-ige Sammelgel wird mit Sammelgelpuffer angesetzt. In ihm wird die Proteinfront aufgrund der Verteilung der Ladungsträger komprimiert. Die eigentliche Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts findet im Trenngel, das mit Trenngelpuffer angesetzt wird, statt. Die verwendete Konzentration an Acrylamid richtet sich nach der Größe des aufzutrennenden Proteins. Sie kann zwischen 5 und 15% betragen. Die Elektrophorese findet in 1x SDS-Laufpuffer statt. Die Proteinproben werden mit mindestens einem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten gekocht und nach der Zugabe von 1/10 Volumen SDS-Blaumarker aufgetragen. Die aufgetrennten

Proteine werden mit Coomassie Brilliant Blue im Gel angefärbt (Sambrook *et al.*, 1989) oder unmittelbar im Anschluß an die Elektrophorese mittels eines Western Blots auf eine Membran transferiert (Kap. 2.2.17).

2.2.12. Isolation von DNA aus Agarose-Gelen

2.2.12.1. Elektroelution von DNA aus Agarose-Gelen

Der gewünschte, DNA-haltige Bereich wird aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten und zusammen mit 0.4 - 0.8 ml TEEL-Puffer in einen einseitig geklammerten Dialyse-Schlauch gegeben. Nach Entfernung sämtlicher Luftblasen wird der Schlauch auch an der zweiten Seite verschlossen. Die Elution erfolgt in einer mit TEEL-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer, wobei der Dialyse-Schlauch so orientiert wird, dass das Gelstück an der dem Pluspol abgewandten Seite liegt. In Abhängigkeit von der Größe des zu eluierenden Fragments wird für 10 - 20 min eine Spannung von 200 V angelegt. Anschließend wird kurz (Zeit der Elektroelution in Sekunden) die Polung umgekehrt, um die am Dialyse-Schlauch anhaftende DNA zu lösen. Der DNA-haltige TEEL-Puffer wird aus dem Schlauch pipettiert und dieser mit 200 µl TE-Puffer nachgespült.

Es schließt sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion an (vgl. Sambrook *et al.*, 1989; aber unter Verwendung von TEEL-gesättigtem Phenol). Die DNA wird mit 0.25 Volumen 7.5 M NH₄Acetat (pH-Wert 7.0) und 2 - 2.5 Volumen eiskaltem 96%igem Ethanol gefällt (Fällung für 20 min bei -20°C und Zentrifugation für 30 min bei 15.000x g und 4°C). Das Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 10 min bei 4°C, 15.000x g), getrocknet und in dH₂O resuspendiert.

Dialyse-Schlauch:	Ca. 20 cm lange Dialyse-Schläuche werden für 10 min in 1 mM EDTA (pH-Wert 8.0), 2% Na ₂ CO ₃ gekocht, wobei die Oberfläche der Lösung mit Styropor bedeckt wird. Die Schläuche werden mit dH ₂ O gespült und weitere 10 min in 1 mM EDTA (pH-Wert 8.0) gekocht. Nach dem Abkühlen erfolgt die Lagerung bei 4°C.
TEEL-Puffer:	50 mM Tris/HCl; 0.1 mM EDTA; pH-Wert 7 - 8 mit konz. Essigsäure einstellen
TEEL gesättigtes Phenol:	wird analog zu TE-Puffer gesättigtem Phenol aufbereitet, jedoch wird der TE-Puffer durch TEEL-Puffer ersetzt; Aliquots werden bei -20°C gelagert

2.2.12.2. Kits zur Isolation von DNA aus Agarose-Gelen

Zur schnellen DNA-Elution aus Agarose-Gelen wird das kommerziell erhältliche „NucleoSpin Extract 2in1-Kit“ (Macherey & Nagel) nach Angabe der Hersteller benutzt.

2.2.13. Enzymatische Reaktionen an DNA

2.2.13.1. Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgt nach den Vorgaben der Hersteller der Restriktionsendonukleasen. Die Inkubationsdauer beträgt bei Plasmid-DNA 1 - 6 Stunden.

2.2.13.2. Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA

Die 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen wird durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdärmen (CIP; Fa. Boehringer) nach der Herstellervorschrift durchgeführt.

2.2.13.3. Ligation von DNA-Molekülen

2.2.13.3.1. Ligation von DNA mit glatten DNA-Enden („blunt end“)

Die Ligation eines DNA-Inserts mit glatten Enden in einen *blunt end*-restringierten Plasmid-Vektor mit T4 DNA-Ligase (Gibco BRL) erfolgt entsprechend den Herstellerangaben mit einem molaren Insert/Vektor-Verhältnis von 3:1 für 24 Stunden bei 4°C oder 16°C. Zur Verminderung der Religationsrate des Vektors wird ggf. vor der Ligation eine Dephosphorylierung durchgeführt.

2.2.13.3.2. Ligation von DNA mit überstehenden Enden

Um eine Ligation mit überstehenden Enden zu gewährleisten, müssen das Insert und der Vektor zueinander komplementäre Überhänge aufweisen. Die Ligation mit der T4 DNA-Ligase (Gibco BRL) erfolgt entsprechend den Vorgaben des Herstellers mit einem molaren Insert/Vektor-Verhältnis von mindestens 3:1 bei 4°C, 12°C oder RT für 2-16 Stunden. Sind die beiden Enden des Vektors zueinander komplementär, empfiehlt sich hier ebenfalls eine Dephosphorylierung, um die Religationsrate zu verringern.

2.2.13.4. Klonierung von DNA mit kommerziell erhältlichen Kits

Zur Klonierung von PCR-Produkten werden das „Perfectly Blunt™ Kit“ (Novagen) und das „pGEM®-T Easy Kit“ (Promega) verwendet. Das erstgenannte Kit basiert auf einer „blunt end“-Ligation, während beim zweiten Kit ein Vektor mit 3' überhängenden dTTPs zur effizienten Klonierung eingesetzt wird.

2.2.14. Transformation

2.2.14.1. Transformation von Bakterienzellen

2.2.14.1.1. Transformation von Bakterien via Hitzeschock

Ein Aliquot kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut und sofort mit 0.5 - 5 μ l Ligationsansatz beziehungsweise 1 - 5 ng Plasmid-DNA versetzt. Die Zellen werden 15 min auf Eis inkubiert, dann für 30 sec (DH5 α) oder 90 sec (XL1-Blue) einem Hitzeschock von 42°C unterzogen und sofort wieder auf Eis gesetzt. Nach der Zugabe von LB-Medium zu 1 ml Endvolumen werden die Zellen unter leichtem Schütteln für 30 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wird die gewünschte Menge dieses Ansatzes auf geeigneten Selektionsplatten mit einem Drigalsky-Spatel verteilt, bis die Oberfläche abgetrocknet ist. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 12 - 16 h.

2.2.14.1.2. Transformation von Bakterien via Elektroporation

Für einen Ansatz wird ein Aliquot (50 μ l) elektrokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 0.1-1 μ l der Ligationsansatzes versetzt. Die weitere Vorgehensweise ist der dem Elektroporator beiliegenden Anleitung zu entnehmen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde mit einem Elektroporator der Firma BioradTM gearbeitet. Zur Elektroporation wurde eine Spannung von 1.8 kV eingestellt.

2.2.14.2. Transformation von Hefezellen

2.2.14.2.1. Einfache Transformation von Hefezellen

Zunächst wird die entsprechende Menge einer 50 ml Übernachtskultur (in Selektionsmedium, 220 rpm, 30°C) auf eine OD₆₀₀ von 0.2 in YPD-Medium (oder in YPDA-Medium, falls der verwendete Hefestamm zusätzliches Adenin benötigt) verdünnt, so dass letztendlich ein Gesamtvolumen von 20 ml entsteht. Die verdünnte Kultur wird erneut bei 30°C inkubiert bis eine OD₆₀₀ zwischen 0.6 und 1.0 erreicht ist. Es folgt eine Zentrifugation für 5 min bei 6500 rpm und RT. Das Pellet wird erst mit 10 ml sterilem dH₂O und nach erneuter Zentrifugation mit 10 ml 0.1 M Licum-Acetat gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 300 μ l 0.1 M Licum-Acetat resuspendiert und für 15 min bei 30°C inkubiert. Pro Transformationsansatz werden 3 μ l Heringssperma DNA (20 mg/ml) durch Kochen für mindestens 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Für die eigentliche Transformation werden nun folgende Komponenten vereinigt: 300 μ l PTL-Lösung, 3 μ l denaturierte Heringssperma DNA, 1 μ g Plasmid-DNA und 50 μ l der Hefezellsuspension. Nach kurzem Vortexen (max. 3 sec) wird der Transformationsmix für 30 min bei 30°C und anschließend für 20 min bei 42°C inkubiert. Die Hefezellen werden kurz und vorsichtig bei 7000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml YPD-Medium resuspendiert. Anschließend wird der Zentrifugationsschritt wiederholt und das Pellet mit 1 ml SD-Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet schließlich in 400

µl SD-Medium aufgenommen. Die 400 µl werden dann auf zur Selektion geeignetem SD-Medium ausplattiert und die Platten bei 30°C inkubiert. Nach 2-5 Tagen Inkubationszeit werden die Kolonien sichtbar.

PTL-Lösung: 4 ml 50% PEG3350 in 1x TE-Puffer
0.5 ml 1M Licium-Acetat
0.5 ml dH₂O
frisch ansetzen

2.2.14.2.2. Sukzessive Co-Transformation von Hefezellen im Rahmen eines Yeast-Two-Hybrid-Screenings

Für ein Yeast-Two-Hybrid-Screening wird zunächst nach obigem Protokoll das *bait*-Plasmid in die Hefe transformiert. Die eigentliche Screening-Prozedur erfolgt, indem das *library*-Plasmid in dieselben Hefezellen transformiert wird (sukzessive Co-Transformation). Dazu wird ebenfalls obiges Protokoll befolgt, mit der Ausnahme, dass alle Komponenten des "Transformationsmixes" außer die Menge an Plasmid-DNA verdreifacht werden. Je nach Komplexität der *Two-Hybrid*-Bank, sollten mindestens 10 µg Plasmid-DNA für das Screening eingesetzt werden.

2.2.15. DNA-Sequenzierung nach Sanger

Sequenzierungen nach Sanger *et al.* (1977) wurden durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem automatischen Sequenziergerät (ALF [Pharmacia] oder ABI [Applied Biosystems]) durchgeführt.

2.2.16. Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen

2.2.16.1. Transfer von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Der Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham) erfolgt nach Sambrook *et al.* (1989) mit einigen Modifikationen.

DNA-haltige Gele für Southern Blot Analysen werden nach der Gelelektrophorese für 10 min mit 0.2 M HCl behandelt und erst dann einer Denaturierung unterzogen. Die Denaturierung von DNA-haltigen Gelen erfolgt für dreimal 15 min mit Denaturierungspuffer (1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH; pH-Wert von 12 - 13 ergibt sich). Die Neutralisierung erfolgt durch Inkubation in Neutralisierungspuffer (1.0 M Tris/HCl, pH-Wert 7 - 8; 1.5 M NaCl) für dreimal 20 min. Die Äquilibration erfolgt durch Inkubation in 10x SSPE (oder 10x SSC). Der Southern Blot wird als Kapillartransfer aufgebaut und die Membran wird zuerst in dH₂O inkubiert. Als Transferpuffer wird 10x SSPE (oder 10x SSC) verwendet. Nach dem Transfer (12-16 h) werden die Filter mind. 30 min an Luft getrocknet. Zur Fixierung erfolgt ein „UV-Crosslinking“ (12.000 Joule) und (optional) ein 30-minütiges Backen bei 80°C.

2.2.16.2. Transfer von RNA auf Membranen (Northern Blot)

RNA-haltige Gele werden durch 45 minütige Inkubation mit 10x SSC vorbehandelt. Der Northern Blot wird als Kapillartransfer aufgebaut und die Membran wird zuerst in dH₂O inkubiert. Als Transferpuffer wird 20x SSC verwendet. Nach dem Transfer (12-16 h) werden die Filter mind. 30 min an Luft getrocknet. Zur Fixierung erfolgt ein „UV-Crosslinking“ (8.000 Joule) und (optional) ein 30-minütiges Backen bei 80°C.

2.2.16.3. Transfer von DNA auf Membranen per Slot-Blot

Der Transfer von DNA auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher & Schuell) per Slot-Blotting erfolgt nach Sambrook *et al.* (1989) mit einigen Modifikationen.

Zur Erstellung von DNA-Slot-Blots wird die *SRC 072/0 Minifold II*-Apparatur der Firma SCHLEICHER & SCHUELL verwendet. Die Transferpapiere (Whatman) und die Membran werden für 5 min in 10x SSC inkubiert. Die Apparatur wird nach den Angaben des Herstellers zusammengebaut. Die zu transferierende DNA wird in mindestens 50 µl dH₂O verdünnt und unter leichtem Vakuum auf die Membran übertragen. Um einen vollständigen Transfer zu gewährleisten, werden die Slots mit mindestens 100 µl dH₂O oder 10x SSC ausgespült. Die Membran wird für mindestens 15 min an der Luft getrocknet, und die DNA durch „UV-Crosslinking“ (12.000 Joule) auf der Membran fixiert.

Soll *single-stranded*- (ss-) DNA übertragen werden, so wird die DNA vor dem Transfer durch 5 minütiges Kochen denaturiert und bis zum Transfer auf Eis gelagert.

2.2.16.4. Transfer von RNA auf Membranen per Slot-Blot

Der Transfer von RNA auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher & Schuell) per Slot-Blotting erfolgt analog zum entsprechenden DNA-Transfer (Kap. 2.2.16.3) mit folgender Modifikation: Die RNA wird zur Denaturierung vor dem Transfer mit 2.9 µl Denaturierungsmix pro 1 µl Probe versetzt, für 15 min bei 68°C inkubiert und bis zum Transfer auf Eis gelagert.

Denaturierungsmix: 50% deionisiertes Formamid, 7% Formaldehyd, 1x SSC

2.2.17. Transfer von Proteinen auf Membranen

2.2.17.1. Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Die in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine werden auf Immobilon P-Membranen (Fa. Millipore), die entsprechend den Herstellerangaben vorbehandelt werden, elektrotransferiert. Der Transfer erfolgt nach dem „semi dry blotting“-Verfahren in einem Zwei-Puffer-System aus Anoden- und Kathodenpuffer für 1 - 3 Stunden bei einer Stromstärke von 0.8

mA/cm² Membranfläche. Nach dem Transfer können die Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden oder für einen immunologischen Nachweis genutzt werden (Kap. 2.2.22).

2.2.17.2. Transfer von Proteinen auf Membranen per Slot-Blot

Der Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (SCHLEICHER & SCHUELL) per Slot-Blotting erfolgt nach Kapitel 2.2.16.3 mit einigen Modifikationen. Anstelle von 10x SSC wird 1x PBS verwendet. Die zu transferierenden Proteine werden in mindestens 100 µl 1x PBS verdünnt bevor sie auf die Membran übertragen werden. Nach dem Transfer findet keine weitere Fixierung mehr statt.

2.2.18. Radioaktive und nicht-radioaktive Markierung von DNA

2.2.18.1. „Random Priming“

Diese Markierung wird mit Hilfe des „Random primed DNA labeling Kit“ (Boehringer) oder des „NEBlot™ Kit“ (New England Biolabs) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Beide Protokolle beruhen auf der Methode von Feinberg & Vogelstein (1983). Pro Ansatz werden 5 µl [α -³²P]dATP oder [α -³²P]dCTP (50 µCi, 3000 Ci/mmol) eingesetzt.

Zur Aufreinigung der Sonden werden Ultrafree[®]-MC - Zentrifugiereinheiten, 30.000 NMWL (Millipore) oder MWG 30000-Zentrifugier-Einheiten (MWG) verwendet. Alternativ erfolgt die Reinigung über Sephadex G50-Säulen.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der aufgereinigten Sonden wird mit Hilfe eines Szintillationszählers die Cherenkov-Strahlung in der wässrigen Lösung gemessen. Für Hybridisierungen werden nur Sonden verwendet, die eine spezifische Aktivität von mindestens 1x 10⁷ cpm/µg haben.

Sephadex G50-Säulen: Eine sterile 2 ml Plastikpipette wird mit etwas steriler Watte unten abgedichtet. Sephadex-G50-Suspension (3.3%ige Lsg. in G50-Puffer, DNA grade Sephadex G50-Puder) wird ohne Luftblasen eingefüllt und mit ca. 2 ml G50-Puffer gespült. Die markierte Probe wird aufgetragen und die Auftrennung mit einem Zählrohr verfolgt. Die Sonde sollte ein Volumen von 400 µl nicht überschreiten.

G50-Puffer: 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0.1% SDS, 50 mM Tris/HCl; pH-Wert von 8.0 einstellen und autoklavieren

2.2.18.2. Radioaktive Markierung mittels PCR

Diese Variante der PCR unterscheidet sich von der in Kapitel 2.2.23 beschriebenen Methode nur durch die Änderung der Zusammensetzung der Nukleotide. Es werden pro 25 µl Reaktion 5 µl radioaktiv markiertes Nukleotid (110 *10¹² Bq/mmol und 10 MBq/25 µl) sowie 0.1

mM Endkonzentration des nicht radioaktiv markierten Nukleotids eingesetzt. Die drei weiteren Nukleotide werden wie üblich in einer Endkonzentration von 0.2 mM verwendet. Die Aufreinigung und Messung der Sonde erfolgt nach der Beschreibung in Kapitel 2.2.18.1.

2.2.18.3. Direkte Markierung von DNA mit Alkalischer Phosphatase

Hierfür wird das „AlkPhos Direct Kit“ (Amersham) nach Angaben der Hersteller verwendet. Dabei wird einzelsträngige DNA durch eine enzymatische Reaktion direkt mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt und mit CDP-Star nachgewiesen.

2.2.18.4. *In vitro*-Transkription (für *in-situ*-Hybridisierung)

Die als „Matrize“ für die Transkription dienende rekombinante Plasmid-DNA wird auf der vom zu verwendenden Promotor abgewandten Seite mittels Restriktionsendonukleasen linearisiert. Um ausschließlich *run-off*-Transkripte zu produzieren, sollten für die Linearisierung nur Enzyme verwendet werden, die glatte oder 5'-überhängende Enden erzeugen. Nach einer Aufreinigung und Fällung der DNA wird diese in H₂O_{DEPC} aufgenommen.

Für die Herstellung nicht-radioaktiver *in vitro*-Transkripte wird das Digoxigenin-Kit der Fa. Boehringer, Mannheim verwendet. Der Reaktionsansatz wird nach der Vorschrift des Herstellers zusammengesetzt. Der Reaktionsansatz wird für 1 - 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der DNA wird eine DNase-Behandlung (20 U DNaseI [RNase-frei] für 30 Minuten bei 37°C) durchgeführt. Es folgt eine Präzipitation der Transkripte durch Zugabe von 2 µl 2 M NH₄-Acetat und 2.5 Volumen 96%-igem EtOH für eine Stunde bei -80°C und anschließender Pelletierung der RNA durch Zentrifugation (15.000x g für 30 Minuten bei 4°C). Das bei RT getrocknete Pellet wird in 10 - 20 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert.

Zur Überprüfung der Qualität wird ein Aliquot der Sonde in einem denaturierenden Gel aufgetrennt (Kap. 2.2.10.2), geblottet (Kap. 2.2.16.2) und mit einem anti-DIG-Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase umgesetzt (vgl. Kap. 2.2.27.7.: Blockierungslösung nur 2%; Inkubationszeit mit dem Antikörper nur 30 min). Der Nachweis der Alkalischen Phosphatase erfolgt über Fast-Farbstoffe nach Anleitung der Hersteller (Roche oder Sigma).

2.2.19. Hybridisierung

Die Hybridisierung Filtergebundener DNA oder RNA mit radioaktiv markierten Sonden und die sich anschließenden Waschschriffe erfolgen nach Sambrook *et al.* (1989).

Die Hybridisierung mit nicht radioaktiven markierten Sonden erfolgt nach Angaben des Herstellers der entsprechenden Sonde (Amersham, Roche) (vgl. Kap. 2.2.18.3).

2.2.20. Nachweis von Nukleinsäuren auf Membranen

2.2.20.1. Radioaktiv-markierte Sonden

Die Filter werden mit Röntgenfilmen (Fuji Medical X-Ray oder Kodak X-Omat AR5) unter Verwendung von „Intensifying Screens“ (Kodak oder DuPont) bei -70°C exponiert.

2.2.20.2. DAPI-Färbung

Hierbei handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht, doppel- und einzelsträngige DNA, die per Slot-Blotting auf Nitrocellulose-Membran transferiert worden ist, zu quantifizieren. Da 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ein DNA-spezifischer Farbstoff ist, werden Ungenauigkeiten in der Quantifizierung durch vorhandene Rest-RNA vermieden (Kapuscinski & Yanagi, 1979; Kapuscinski J., 1995). DNA, die auf Nylonmembran fixiert worden ist, kann ebenfalls durch DAPI detektiert werden.

Der Filter mit der fixierten DNA wird zunächst für 5 min bei RT in Lösung I inkubiert. Die DAPI-Färbung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Lösung II) wird für 20 min bei leichtem Schütteln (60 rpm) bei RT in einer geschlossenen Box durchgeführt, da DAPI lichtempfindlich ist. Es folgt ein kurzer Waschschrift in dH_2O für 5 min bei RT und ein weiterer in Lösung I, um den Hintergrund zu entfernen. Die Dauer des letzten Waschschriftes kann in verschiedenen Experimenten stark variieren (1-16 h). DNA-spezifische Signale sind weiss-fluoreszierend und werden mit einem UV-Tisch (Herolab 2020, Wellenlänge: 302 nm) detektiert, mit einem Video-Imaging-System (Phase) dokumentiert und bei Bedarf densitometrisch ausgewertet.

Lösung I: 0.2 M Tris-Base, pH 7.5

Lösung II: Lösung I + 0.2 M Na_2SO_4

2.2.20.3. Methylenblau-Färbung

An Filter gebundene Nukleinsäuren lassen sich zum Nachweis eines gelungenen Transfers oder auch zur Quantifizierung (bei Slot-Blots) durch Methylenblau anfärben.

Bei **Nylonmembranen** wird der Filter 15 min in 5% Essigsäure vorinkubiert, anschließend 10 min in Methylenblau-Färbelösung inkubiert und für 10 min in dH_2O unter mehrfachem Wechsel entfärbt.

Methylenblau-Färbelösung: 0.04% Methylenblau in 0.5 M Na-Acetat (pH-Wert 5.2)

Die Methylenblau-Färbung und ggf. die vollständige Entfärbung von **Nitrocellulose-Membranen** erfolgt hingegen nach Wilkinson *et al.* (1990).

2.2.21. Dehybridisierung von Membranen

Diese Methode kann nur für Membranen angewendet werden, die mit radioaktiv markierten Sonden umgesetzt worden sind. Die Membran wird für 3 h in 0.1% SDS gewaschen. Zur Überprüfung der vollständigen Entfernung der Hybridisierungsprobe wird die Membran einer erneuten Autoradiographie unterzogen.

2.2.22. Nachweis filtergebundener Proteine

2.2.22.1. Direkter Farbnachweis

Membranen, die zum immunologischen Nachweis spezifischer Proteine weiter verwendet werden (Kap. 2.2.22.2), werden zur Kontrolle der Transfereffektivität mit Ponceau S (Fa. Sigma) behandelt, wobei die Färbung der Proteine reversibel ist. Die Entfärbung erfolgt in dH₂O. Dauerhaft können Proteine mit Amidoschwarz angefärbt werden (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.22.2. Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine

Nach dem Elektrotransfer auf eine Membran können Proteine durch die Umsetzung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wird die Membran zunächst für mindestens 30 Minuten bei RT mit Antikörper- (AK-) Blockierlösung behandelt und dann für mindestens 12 Stunden mit dem spezifischen Antikörper (verdünnt in AK-Inkubationslösung) unter ständigem Drehen bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für je 15 Minuten in AK-Waschpuffer erfolgt eine 1- bis 2-stündige Inkubation mit einem mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten Zweitantikörper (1:10.000 bis 1:20.000 verdünnt in AK-Inkubationslösung). Dem erneuten zweimaligen Waschen für je 15 Minuten in AK-Waschpuffer folgt eine 5-minütige Präinkubation in Substratpuffer. Die durch den Zweitantikörper vermittelte Detektion der spezifischen Proteine erfolgt mit verschiedenen Substratkombinationen von 0.02% (v/v) Fast Farbstoffen und 0.006% (v/v) Naphthol-Phosphaten oder mit dem chemolumineszierenden AP-Substrat CDP-Star (Life Science) und Autoradiographie. In letzterem Fall wird die Inkubation in Substratpuffer durch eine Inkubation in 1x PBS ersetzt.

2.2.23. „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)

Für die zyklische Amplifikation von DNA unter Verwendung von zwei Primern werden in einem 25 µl Ansatz folgende Komponenten eingesetzt: 2.5 µl 10x Reaktionspuffer (entsprechend der Angaben der Hersteller des Enzyms Taq-Polymerase, inklusive Mg²⁺-Ionen in einer Endkonzentration von 1 - 1.5 mMol); 0.2 mM Endkonzentration dNTPs (Ultrapure dNTP Set, Pharmacia); 1 µM Endkonzentration jedes Primers; 0.1 – 10 ng DNA (genomische DNA oder linearisierte Plasmid-DNA) und 2.5 U Taq-Polymerase (Appligene, Eppendorf, Genecraft, InVivoGen, Promega).

Der Ansatz wird ohne Enzym zusammenpipettiert und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Nach einer Denaturierung von 5 min bei 95°C erfolgt eine Inkubation auf Eis für 2 min und die Zugabe des Enzyms (Hot-Start). Dieser Ansatz wird einem 35-fachen Zyklus von Denaturierung (1 min bei 95°C), Primer-Annealing (1 - 2 min, 40 - 60°C) und Elongation (10 sec - 3 min, bei 72°C) unterzogen (MiniCycler™ [Biozym]). Die Annealing-Temperatur ist dabei von den jeweiligen Primern abhängig und wird nach der Formel [$T_M (^{\circ}C) = 2x (A + T) + 4x (G + C)$] berechnet. Nach den Zyklen kann ein terminaler Schritt von 10 min bei 72°C angeschlossen werden. Die Amplifikationsprodukte werden durch Gelelektrophorese nachgewiesen.

2.2.24. Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)

Hierbei wird RNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase und einem Primer in cDNA umgeschrieben. Dazu wird die RNA [~100-300 ng Gesamt-RNA] zusammen mit dem Primer (1 µM Endkonzentration) für 10 min bei 65-70°C denaturiert und dann auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des Enzym-spezifischen 10x Puffers; dNTPs (Endkonz. 0.5 mM); 1 µl RNasin® (Promega) und 200 U Enzym (i.a. MMLV-RT) erfolgt die Reaktion in einem Volumen von 20 µl bei 37°C für mind. 1 h. Es schließt sich eine RNase H Behandlung (nach Angaben des Herstellers) an. 1/10 bis 1/5 dieser Reaktion werden als Matrize für eine PCR (Kap. 2.2.23) eingesetzt.

2.2.25. *In vivo* Expression eines Proteins

Die *in vivo* Expression von Proteinen wird mit den pQE-Vektoren gemäß den Vorschriften des Handbuchs („The QIAexpressionist“ 06/98) der Herstellerfirma QIAGEN durchgeführt.

Zu Beginn der Klonierung wird ein Vektor und das DNA-Fragment, das die kodierende Sequenz für das zu exprimierende Protein enthält, mit entsprechenden Enzymen restringiert, so dass eine gerichtete Ligation möglich ist. Dabei ist darauf zu achten, daß das Fragment im richtigen Leseraster integriert wird. Das Ligationsprodukt wird in M15-Zellen transformiert (Protokoll 2), die entsprechend den Vorgaben des Herstellers (Protokoll 1) kompetent gemacht wurden. Zur Überprüfung der Ligation und des Leserasters kann eine Sequenzierung durchgeführt werden.

Positive Transformanten werden über einen Kolonie Blot (Protokoll 3) mit einem Antikörper (Fa. QIAGEN) gegen den „Histidin-Tag“ entsprechend der Herstellerangaben identifiziert. Die positiven Klone können daraufhin durch Sequenzierung erneut überprüft werden.

Mit ihnen werden 100 ml Expressions-Kulturen angesetzt und induziert (Protokoll 6). Nach der Präparation der zellfreien Proteinrohextrakte unter denaturierenden Bedingungen (Protokoll 9) erfolgt die Aufreinigung des exprimierten Proteins im „batch-Verfahren“ unter denaturierenden Bedingungen (Protokoll 14). Dabei bindet der „Histidin-Tag“ des exprimierten Proteins an die Ni-NTA-Agarose und kann unter entsprechenden Pufferbedingungen eluiert werden.

2.2.26 Isolierung monospezifischer Antikörper

Die Immunisierung eines Kaninchens mit dem Antigen und die anschließende Isolierung der polyklonalen Antikörper wurde von der Firma Eurogentec durchgeführt.

2.2.26.1. Immunoaffinitätsreinigung (Postadsorption)

Das *in vivo* exprimierte und aufgereinigte Protein (s. Kap. 2.2.25) bzw. Gesamtprotein (s. Kap. 2.2.6) wird nach einer SDS-PAGE (Kap. 2.2.11) auf eine Immobilon P-Membran (Millipore) transferiert (Kap. 2.2.17). Die Membran wird mit Ponceau S angefärbt (Kap. 2.2.22.1) und das exprimierte bzw. gewünschte Protein möglichst exakt ausgeschnitten. Die Membranstreifen werden in AK-Blockierlösung für mindestens 30 Minuten inkubiert und anschließend mit dem entsprechenden Antiserum (unverdünnt) ü/N bei RT unter ständigem Drehen umgesetzt. Nach zweimaligem Waschen in AK-Waschlösung für 15 Minuten werden die gebundenen Antikörper durch Inkubation in 2 ml 0.1 M Glycin oder Zitronensäure pH 2.5 abgelöst. Die desorbierten Antikörper werden sofort durch Zugabe von 2 ml 1 M Tris/HCl pH 8.0 neutralisiert. Zur Stabilisierung der affinitätsgereinigten Antikörper kann der Lösung BSA in einer Endkonzentration von 0.1 mg/ml zugegeben werden.

2.2.27. *In-situ*-Hybridisierung

2.2.27.1. Fixierung nach Bouin

Adulte Wurmpaare werden für 90 min bei RT in Bouin-Fixativ fixiert. Es folgt eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 1 h [30%, 50%, 70%, 90%, 96% (+ 2 Tropfen Chromotrop 2R), 100% EtOH]. Für die Einbettung in Paraffin (s. Kap. 2.2.27.2) werden die Würmer über Nacht zusätzlich noch in Methylbenzoat und anschließend für 2x 5 min in Benzol inkubiert.

2.2.27.2. Einbettung in Paraffin

Die Würmer werden für 1-2 h in 60°C-warmem Paraplast (Reichert-Jung Histowax) vorinkubiert und anschließend in Schälchen mit neuem, filtriertem, 60°C-warmem Paraplast überführt. Nach einer Gewebeeinfiltration ü/N erfolgt die Aushärtung des Einbettmediums auf Eis oder bei 4°C. Die Blöcke werden trapezförmig getrimmt, wobei die eigentliche Schnittfläche (+ Gewebe) nicht größer als 5 x 5 mm sein sollte.

2.2.27.3. Beschichtung der Objektträger

Die Entfettung der Objektträger (OT) geschieht ü/N in Ethanol/Aceton (je 50%). Die OT werden mit dH₂O gespült und anschließend getrocknet. Danach folgt die Silikonisierung der OT mittels TESPA (3-Aminopropyltriethoxysilan, Sigma) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.27.4. Silikonisieren der Deckgläser

Die Deckgläser, die zur *in-situ*-Hybridisierung verwendet werden, müssen mit Repel-Silanol behandelt worden sein. Dazu werden die Deckgläser in dieser Lösung 10 min inkubiert, 2x mit dH₂O gespült und für 2 h, eingeschlagen in Aluminiumfolie, bei 180°C sterilisiert.

2.2.27.5. Erstellung von Semidünnschnitten

Von den Paraffinwachsblöcken werden 5 µm-Schnittpräparate an einem Biocut 2030-Mikrotom (Reichert-Jung) hergestellt, auf die Oberfläche eines Wassertropfens auf einem 40°C warmem OT (Heizplatte) überführt und dort gespreitet. Zur Fixierung der Schnittpräparate auf dem OT folgt eine ü/N-Inkubation bei 60°C. Die OT können bei RT gelagert werden.

2.2.27.6. Hybridisierung

Die Schnittpräparate werden für 2x 5 min in Xylol deparaffiniert. Es schließt sich die Hydrierung des Gewebes in einer absteigenden Alkoholreihe [2x Isopropanol, je 1x 96%, 70%, 50%, 30% EtOH] für je 5 min an. Es folgt eine 5-minütige Äquibrierung in 37°C-warmem Proteinase K-Puffer, der sich eine Proteinase K-Behandlung (Endkonzentration: 1 µg/ml) für 30 min bei 37°C anschließt. Danach werden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 5 min dehydriert (s.o.) und an der Luft getrocknet. Anschließend werden die Schnitte in 20 µl vorgewärmte Hybridisierungslösung S bei 52°C in einer feuchten Kammer für 1 h prähybridisiert. Danach wird die Prähybridisierungslösung vorsichtig abgezogen (Schnitte nicht austrocknen lassen) und durch die Hybridisierungsprobe ersetzt (Richtwert: 1µg Digoxygenin-*in-vitro*-Transkript in Hybridisierungslösung S pro Schnittpräparat). Ein silikonisiertes Deckglas wird aufgelegt und dieses mit Fixogum (Marabu) abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer bei 52°C (Richtwert) im Wasserbad ü/N (Proben nicht schwenken).

Hybridisierungslösung S: 5 ml deionisiertes Formamid; 2.5 ml 20x SSC; 30 µl t-RNA (33 mg/ml); 50 µl Tween 20 (20%); 50 µl Heringssperma-DNA (20 mg/ml); 100 µl 100x Denhardt's; mit H₂O_{DEPC} auf 10 ml auffüllen

2.2.27.7. Detektion

Nach Entfernen des Fixogums (Pinzette) werden die Deckgläser in Waschlösung I (2x SSC, 0.1% Tween 20) bei 52°C abgeschwemmt. Die Waschlösung I wird einmal gewechselt, die Waschzeit beträgt je 15 min. Die nachfolgenden Waschschriffe in Waschlösung II (1x SSC), Waschlösung III (0.5x SSC) und Waschlösung IV (0.1x SSC) werden jeweils für 20-30 min bei RT durchgeführt. Anschließend erfolgt die Waschung in Maleinsäurepuffer (0.1 M Maleinsäure; 0.15 M NaCl; pH 7.5; in dH₂O) bei RT für 5 min. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen werden die Schnitte in 4% Blockierlösung (*blocking-reagent* [Roche, Kat.-Nr. 1096175] verdünnt in Maleinsäurepuffer) für 30 min bei RT inkubiert. Die Detektion der Digoxigeninmarkierten Sonde wird mittels anti-Digoxigenin-AP-Konjugaten (1:2500) verdünnt in 2% Blockierlösung) durchgeführt. Die Inkubation findet in der feuchten Kammer bei RT für 1 bis 2 h statt. Im folgenden werden die OT 2x 20 min bei RT in Maleinsäurepuffer und 5 min in Substratpuffer 1 gewaschen. Der Farbnachweis erfolgt mit Naphthol-AS-Phosphat und Fast Red-Farbstoff in Substratpuffer 1 oder 2 für maximal 1 h bei RT. Dabei werden 100 mg eines Farbstoffs (gelöst in 100 ml Substratpuffer) und 20 mg eines passenden Naphthol-AS-Phosphats (gelöst in 500 µl DMSO) vermischt, filtriert und auf den OT gegeben. Die Farbentwicklung wird lichtmikroskopisch beobachtet. Eine Erneuerung der Farblösung nach ca. 30 min kann die Sensitivität erhöhen. Die Präparate werden zum Stoppen der Farbreaktion in dH₂O gespült und in Kaisers-Glycerin-Gelatine (Gemisch vor Gebrauch erhitzen und auf ca. 40°C abkühlen lassen) eingedeckelt.

Substratpuffer 1: 100 mM Tris-Base, pH 8.0 (langsame Farbreaktion)

Substratpuffer 2: 0.1 M NaCl; 0.1 M Tris-Base; 0.05 M MgSO₄; pH 9.5 (schnelle Farbreaktion)

2.2.28. Immunhistologie

2.2.28.1. Antikörperumsetzung

Die Fixierung und Einbettung der Schistosomen und die Erstellung von Semidünnschnitten entspricht der Vorgehensweise der *in situ*-Hybridisierung (Kap. 2.2.27). Eine Benutzung von beschichteten Objektträgern und silikonisierten Deckgläsern entfällt.

Die Schnitte auf den OT werden zweimal 5min in Xylol deparaffiniert und danach in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (2x Isopropanol, je 1x 96%, 70%, 50%, 30% EtOH für je 5 min). Es folgt eine 5minütige Äquilibration in AK-Inkubationspuffer und eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in 3% BSA (verdünnt in AK-Inkubationspuffer). Danach schließt sich eine ü/N-Inkubation mit dem Erstantikörper in einer feuchten Kammer bei 4°C an. Die Schnitte werden daraufhin mehrmals mit AK-Inkubationspuffer gewaschen (3x 10 min) und mit einem AP-gekoppelten Zweitantikörper umgesetzt. Die Inkubation erfolgt für ca. 2 h in einer feuchten Kammer. Anschließend werden die Schnitte erneut mehrmals in AK-Inkubationspuffer gewaschen. Zuletzt schließt sich eine fünfminütige Äquilibration in Substratpuffer an.

2.2.28.2. Detektion

Die Farbnachweismethoden der Immunhistologie entsprechen denen der *in situ*-Hybridisierung (Kap. 2.2.27.7).

2.2.29. Histologische Färbung von Semidünnschnitten mit Toluidin-Blau

Die Würmer werden zunächst mit Paraformaldehyd (1%)/Glutaraldehyd (0.1%) in Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7.3: 36 ml 0.2 M Na₂HPO₄; 14 ml 0.2 M NaH₂PO₄) für 30 min bei RT fixiert. Anschließend werden sie durch Behandlung mit einer Alkoholreihe (s. Kap. 2.2.27.1) dehydriert. Nach Behandlung für 2x 10 min in Aceton werden die Würmer ü/N bei 4°C in Aceton/Araldit (1:1) inkubiert. Am nächsten Tag lässt man das Aceton abdampfen und überführt die Würmer in frisches Araldit (für 4 h). Anschließend erfolgt die Polymerisation des Einbettungsmittels für zwei Tage bei 65°C. Semidünnschnitte werden angefertigt, wie in Kapitel 2.2.27.5 beschrieben. Die Färbung mit Toluidin-Blau (0.1% in 20% EtOH) bzw. die Entfärbung (80% EtOH) erfolgt bis zur gewünschten Intensität.

2.2.30. Quantifizierung der DNA-Synthese bei Schistosomen

Diese Methode ermöglicht es, DNA-Syntheseaktivität nachzuweisen und zu quantifizieren. Dafür werden zunächst adulte Schistosomen unter der Zugabe von 1 mM 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) für mindestens 24 Stunden (besser: 48 Stunden oder länger) in Kultur gehalten (vgl. Kap. 2.2.2). Anschließend werden die Würmer kurz in Medium ohne BrdU gewaschen. Die genomische DNA wird wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben extrahiert. Mit-extrahierte RNA wird durch eine RNase A-Behandlung (100 ng/μl, 20 min bei 37°C) entfernt, um Kreuzreaktionen des anti-BrdU-Antikörpers mit endogenem Uridin zu vermeiden (Haider *et al.*, 1997). Nach einer Konzentrationsbestimmung (Kap. 2.2.7) wird die DNA durch Kochen (5 min) denaturiert, da der Erstantikörper (s.u.) nur BrdU in einzelsträngiger DNA erkennt (Gratzner, 1982). Die DNA wird durch Slot-Blotting (Kap. 2.2.16.3) auf Nitrocellulose-Filter transferiert. Das Fixieren der DNA erfolgt ausschließlich durch UV-Crosslinking und keinesfalls durch „Backen“ (Kap. 2.2.16), um den Hintergrund möglichst gering zu halten (Kessler, 1992). Die Quantifizierung der fixierten DNA-Mengen erfolgt durch DAPI-Färbung (Kap. 2.2.20.3).

2.2.30.1. Nachweis von eingebautem BrdU in filtergebundener DNA

Für den eigentlichen BrdU-Nachweis wird die Methode von S. R. Haider (1997) mit einigen Modifikationen angewendet. Der Filter wird für 5 min bei RT in 1x PBS gewaschen. Die Blockierung erfolgt für 45 min in Lösung III ebenfalls bei RT. Die Umsetzung mit dem monoklonalen anti-BrdU-Antikörper (Sigma, B2531; 1:1000 verdünnt in Lösung III) wird für 12-16 Stunden unter langsamer Rotation bei 4°C durchgeführt. Es folgen drei Waschschrte für je 10

min in Lösung IV bei RT. Als Zweitantikörper wird ein polyklonaler anti-Maus IgG Antikörper verwendet, der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (Sigma A-2179). Der Filter wird mit einer 1:10.000 Verdünnung dieses Antikörpers in Lösung III für 2-3 Stunden bei RT und leichter Rotation inkubiert. Anschließend wird der Filter dreimal für je 10 min in Lösung IV und letztendlich einmal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wird das chemolumineszierende CDP-Star (Amersham LIFE SCIENCE, RPN 3682) verwendet. Die Inkubation erfolgt für maximal 5 min in einer Plastikfolie. Überschüssiges CDP-Star wird vorsichtig entfernt. Zur Detektion der Chemolumineszenz wird der Filter in eine neue Plastikfolie eingeschweisst und ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR5 oder Fuji RX Medical) aufgelegt. Die Expositionszeit beträgt 2-16 Stunden. Zur exakten Auswertung werden die resultierenden Signalintensitäten mittels Densitometrie bestimmt und mit den Signalintensitäten der DAPI-Färbung verrechnet.

Lösung III: 5% BSA [w/v] in 1x PBS, 0.05% Tween 20 [v/v]

Lösung IV: 1x PBS, 0.05 % Tween 20

2.2.30.2. Bemerkungen zur Technik der DNA-Synthese-Quantifizierung

Die Mindestzeit für die *in vitro* Kultur beträgt 24 Stunden. In der Regel ist es jedoch so, dass erst nach 48 Stunden ausreichend BrdU in die DNA der Würmer eingebaut worden ist, um Signale zu erhalten, die sich deutlich vom Hintergrund abheben und somit auswerten lassen.

Die Verwendung von Nylonmembranen sollte vermieden werden, da die Detektion mit anti-BrdU-Antikörpern dort oft einen starken Hintergrund ergibt (Kessler, 1992).

2.2.31. Die Konstruktion einer Yeast-Two-Hybrid-Bank, das Yeast-Two-Hybrid-Screening und die Verifizierung von Interaktionen

Für die Interaktionsstudien mit der Yeast-Two-Hybrid-Technik wurden die Gal4-basierenden Systeme Matchmaker II und III der Firma Clontech verwendet. Die in diesem Zusammenhang angewendeten Methoden bzw. Protokolle sind der entsprechenden Anleitung oder dem „Yeast-Protocol-Handbook“ (s. Kap. 2.2.4.1) zu entnehmen. Das gilt auch für die verschiedenen β -Galaktosidase-Assays. Ausnahmen bilden: „Transformation von Plasmid-DNA in Hefe“ (Kap. 2.2.14.2) und „Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe“ (Kap. 2.2.5.5).

2.2.32. Phylogenetische Analysen

Für phylogenetische Analysen von Aminosäuresequenzen wird zunächst ein Alignment mit dem Programm Clustal X erstellt. Anschließend erfolgt die Konstruktion des Dendogramms nach der NJ- (*neighbor joining*-) Methode. Ggf. wird die Signifikanz der Knotenpunkte des Phylogenetischen Trees statistisch durch Bootstrap-Werte ermittelt. Mittels des Programms TreeView wird der Tree letztendlich formatiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Die Src-Tyrosinkinase SmTK3

Die Src-Tyrosinkinase SmTK3 wurde in früheren Arbeiten über einen PCR-Ansatz mit degenerierten Primern kloniert und auf Nukleinsäureebene charakterisiert (Schussler, 1997; Kapp, 2000). SmTK3 enthält ein ORF von 1944 bp (inkl. Stopp-Codon), aus der abgeleiteten Protein-Sequenz von 647 Aminosäuren ergibt sich ein putatives Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 71 kD. Die Aminosäuresequenz enthält vier konservierte Domänen, die in dieser Zusammensetzung charakteristisch für Tyrosinkinasen der Src-Familie sind (Abb. 3-1; vgl. Kap. 1 u. 4.1). Im N-terminalen Bereich liegt eine *src homology-* (SH4-) Domäne, die Proteinen über eine Myristilierungs-Stelle die Assoziation mit der Plasmamembran durch kovalente Bindung an Lipide ermöglicht. In C-terminaler Richtung liegen hinter einer nicht-konservierten Region (*unique-site*) die zwei Proteinbindedomänen, SH3 und SH2. SH3-Domänen besitzen eine Affinität zu Prolin-reichen Regionen, die für gewöhnlich in den Substraten von Src-TKs vorkommen. SH2-Domänen binden hingegen an phosphorylierte Tyrosine und reagieren auf diese Weise beispielsweise mit RTKs. Im C-terminalen Bereich befindet sich schließlich eine TK-Domäne, die sowohl die Auto- als auch die Substratphosphorylierung von Tyrosinen katalysiert. Bisher ist bekannt, dass SmTK3 als *single-copy*-Gen im Genom von *Schistosoma* vorkommt (Kapp, 2000). Weitere Daten, welche die Charakterisierung auf Nukleinsäureebene betreffen, sind umstritten und/oder widersprüchlich (s.u.) und sollten im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden. Im Anschluß daran war geplant, SmTK3 auch auf Proteinebene zu charakterisieren.

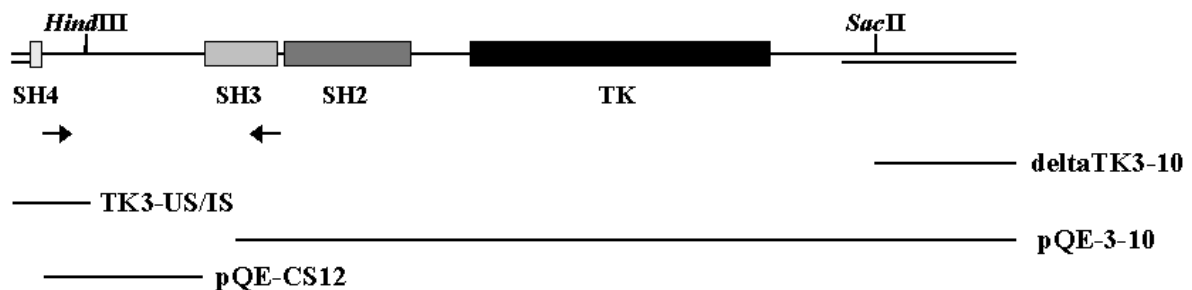


Abb. 3-1. Die komplette cDNA-Sequenz, Primer und Subklone von SmTK3. Die doppelten Linien markieren die 5'- bzw. die 3'-UTR. Die einfachen Linien stellen die Subklone dar. Relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Die Pfeile kennzeichnen Regionen, gegen die Primer für die RT-PCR-Analyse (Kap. 3.1.2) konzipiert worden sind.

3.1.1. Northern-Blot-Analyse von SmTK3 mit einer Sonde aus dem 3'-Bereich

Die ersten Northern-Blot-Analysen wurden von P. Schussler mit einer Sonde durchgeführt, die weite Bereiche aus dem 3'-Bereich der SmTK3-cDNA und die TK-Domäne repräsentiert (1997). Die resultierenden Daten wiesen auf eine geschlechts- und entwicklungspezifische Präsenz von SmTK3-Transkripten in maturaen Weibchen hin. Dabei wurden neben den erwartete-

ten Vollängen-Transkripten auch mehrere verkürzte Transkripte detektiert. Unter Verwendung einer Sonde aus dem 5'-Bereich, welche die *unique-site* abdeckt, konnten in einem weiteren Hybridisierungsexperiment von K. Kapp weder die Geschlechtsspezifität noch die verkürzten Transkripte bestätigt werden (pers. Mitteilung). Demnach produzieren adulte Männchen und mature Weibchen Vollängen-Transkripte in gleichen Mengen. Um eines der Ergebnisse zu bestätigen, wurde eine Northern-Blot-Analyse mit einer cDNA-Sonde aus der 3'-Region von SmTK3¹ (Abb. 3-1) durchgeführt. Dafür wurden gleiche Mengen von Total-RNA aus murenen Weibchen und aus adulten Männchen nebeneinander aufgetragen. Das Resultat zeigte, dass auch mit dieser Sonde nur eine Art von Transkripten in der Größenordnung von ca. 2.4 kB detektiert werden kann, was der vollständigen cDNA-Sequenz inkl. 5'- und 3'-UTR entspricht. Dieses Transkript wird zudem in beiden Geschlechtern in gleichen Mengen gebildet (Abb. 3-2).

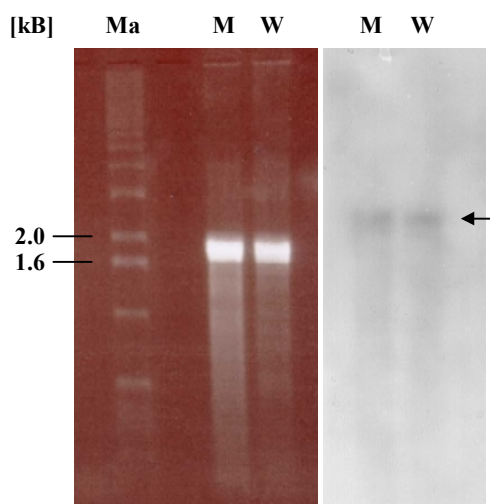


Abb. 3-2. Northern-Blot-Analyse von SmTK3 mit einer 3'-Sonde. Total-RNA aus 50 murenen Weibchen (W) und aus 40 adulten Männchen (M) wurden auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt (links) und auf einen Filter transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde aus dem 3'-Bereich von SmTK3 bei 42°C mit 50% Formamid. Die anschließenden Waschungen wurden bis zu einer Stringenz von 2x SSC / 0.1% SDS bei 56°C durchgeführt, die Expositionszeit der Autoradiographie (rechts) betrug 14 Tage. Der Pfeil markiert SmTK3-spezifische Signale. M, Männchen; W, Weibchen; Ma, 1 kB-Leiter.

3.1.2. RT-PCR-Analyse zum Nachweis von SmTK3-Transkripten in verschiedenen Entwicklungsstadien

Zur Klärung, in welchen Entwicklungsstadien SmTK3 exprimiert wird, wurden vergleichende RT-PCR-Analysen mit den SmTK3-spezifischen Primern TK-NT-1 und TK3-SH3-2 (Abb. 3-1) durchgeführt. Als Template wurde Total-RNA in separaten Ansätzen aus paarungserfahrenen und -unerfahrenen Männchen, aus murenen und virginen Weibchen sowie aus Miracidien und Cercarien eingesetzt. Als Negativkontrolle diente eine Mixtur aus RNA aller Entwicklungsstadien, jedoch wurde die RT-PCR-Reaktion ohne Zugabe von Reverser Transkriptase angesetzt. Alle RT-PCR-Reaktionen mit Ausnahme der Negativkontrolle führten ausschließlich zu einem Amplicon in der erwarteten Höhe von ca. 600 bp (Abb. 3-3). Da in der Negativkontrolle kein Amplifikationsprodukt erhalten wurde, konnte eine DNA-Kontamination der RNA-Extrakte aller Ansätze ausgeschlossen werden. Folglich sind die Amplicons auf das jeweilige RNA-

¹ Die Sonde entspricht dem Insert des SmTK3-Subklons deltaTK3-10 (Abb. 3-1). Dieser Subklon repräsentiert den 3'-UTR-Bereich des Vollängenklons SH2-43 (Kapp, 2000) beginnend mit der *SacII*-Schnittstelle bis zum Ende (370 bp).

Template zurückzuführen. Damit wurde gezeigt, dass SmTK3 in allen adulten und larvalen Entwicklungsstadien transkribiert wird. Über eine eventuelle entwicklungspräferentielle Expression kann auf der Basis dieser Versuchsreihe keine Aussage gemacht werden, da keine quantitativen Bedingungen zugrunde lagen.

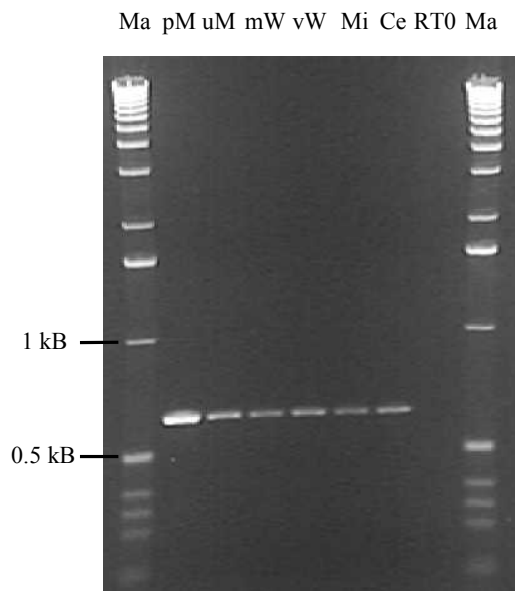


Abb. 3-3. Vergleichende RT-PCR zum Nachweis von SmTK3-Transkripten in verschiedenen Entwicklungsstadien. Als Template für die RT-PCRs dienten in separaten Ansätzen 500 ng Total-RNA aus Schistosomen verschiedener Entwicklungsstadien. Für die Negativkontrolle (RT0) wurde eine Mixtur aus je 50 ng Total-RNA aller Stadien eingesetzt. Das Bild zeigt die Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel. PCR-Profil: 1 min 93°C, 1 min 58°C, 45 sec 72°C, 35 Zyklen. pM, paarungserfahrene Männchen; uM, paarungsunerfahrene Männchen; mW, mature Weibchen; vW, virgine Weibchen; Mi, Miracidien; Ce, Cercarien; Ma, 1 kB-Leiter.

3.1.3. *In-situ*-Hybridisierungen mit SmTK3

Die ersten *in-situ*-Hybridisierungen von P. Schüssler wiesen auf eine gewebespezifische Expression von SmTK3 in den Gonaden der Weibchen hin (1997). Allerdings wurde bei diesen Versuchen auf die notwendigen Kontrollen verzichtet, weshalb die erhaltenen Ergebnisse nur als nicht abgesicherte Hinweise gewertet werden müssen. Zur Verifizierung dieser Daten wurden im Rahmen meiner Arbeit weitere *in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Als Sonde dienten *in-vitro*-generierte, Digoxigenin-markierte Transkripte, welche die SH4-Domäne und einen Teil der *unique-site* von SmTK3 abdecken (Abb. 3-1). Für die Erzeugung von *antisense*-orientierten Transkripten wurde der cDNA-Subklon TK3-US/IS² mit *Eco*RI linearisiert. Als Negativkontrolle wurden *sense*-Transkripte eingesetzt, dazu wurde der gleiche Subklon mit *Hind*III verdaut. Die Qualität der Transkripte wurde per Northern-Blot und Antikörperfärbung überprüft. Da jeweils ausschließlich eine Bande in der erwarteten Höhe detektiert werden konnte (Abb. 3-4), wurden die Transkripte für eine Hybridisierung auf Gewebeschnitte (5 µm) gepaarter Schistosomen eingesetzt. Drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsreihen unter stringenten Bedingungen zeigten schließlich, dass SmTK3 in beiden Geschlechtern gewebespezifisch in den Gonaden (Testes, Vitellarium, Ovar) und im Parenchym transkribiert wird. Dabei wurden Signale ausschließlich im Zytoplasma erhalten. Im Tegument und im Subtegument, in den Muskeln, in der Gastrodermis, wie auch in der Negativkontrolle wurden keine Hybridisierungsereignisse de-

² TK3-US/IS repräsentiert die ersten 220 bp im 5'-Bereich des Vollklons SH2-43 bis zur *Hind*III-Schnittstelle (Abb. 3-1). Die erzeugten Transkripte decken das vollständige Insert ab.

tektiert (Abb. 3-4). Zur Absicherung der erhaltenen Daten wurden drei weitere Versuchsreihen mit einer Sonde aus dem 3'-Bereich durchgeführt. Für die *in-vitro*-Transkription wurde der SmTK3-Subklon deltaTK3-10 (s. Abb. 3-1 u. Kap. 3.1.4) mit *SpeI* (*antisense*) bzw. *XhoI* (*sense*) linearisiert. Die Hybridisierungen von Gewebeschnitten mit qualitativ hochwertigen Sonden führten zum Nachweis von SmTK3-Transkripten in denselben Organen (Daten nicht gezeigt).

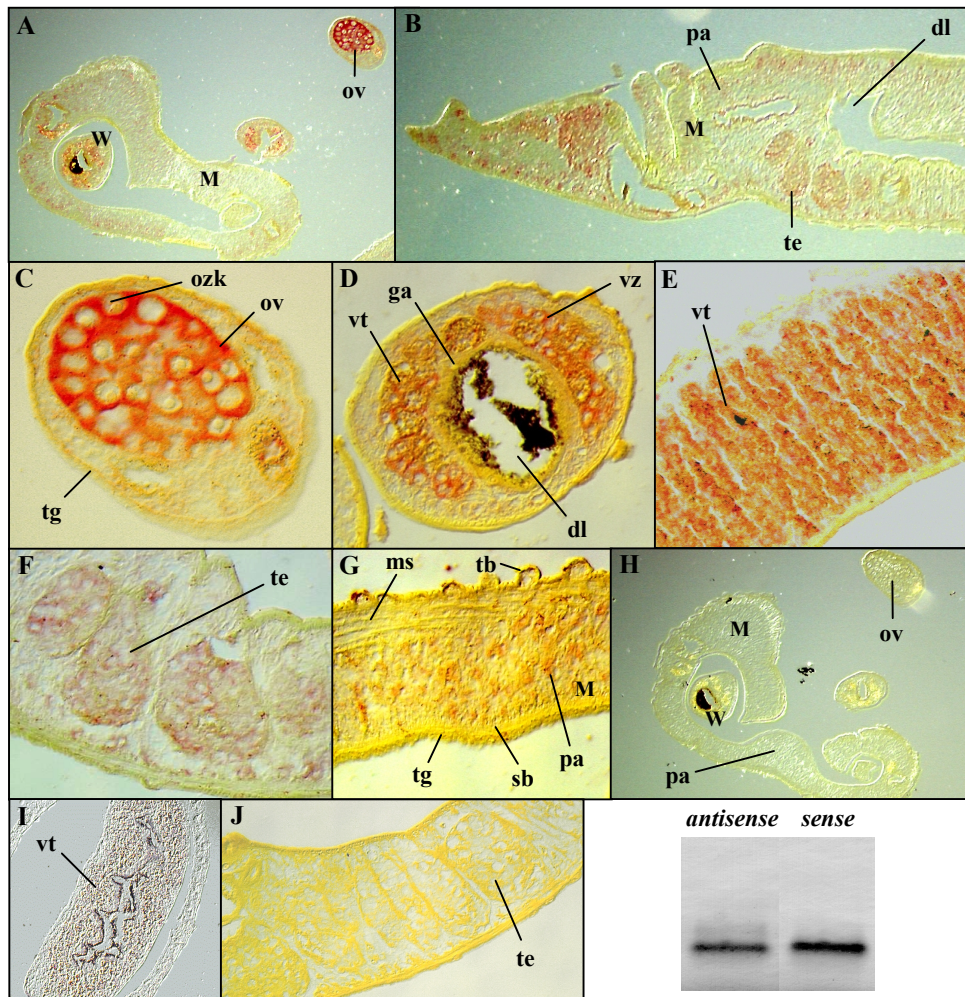


Abb. 3-4. In-situ-Hybridisierung von SmTK3 auf Gewebeschnitte gepaarter Schistosomen. Zur Überprüfung der Qualität wurden markierte *antisense*- und *sense*- Transkripte auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, anschließend auf einen Filter transferiert und mit einem mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper umgesetzt. Die Detektion erfolgte mit Fast-Farbstoffen (Bild rechts unten; Darstellung in s/w). Gepaarte Schistosomen wurden zunächst mit Bouin fixiert und in Paraffin eingebettet. Daraus hergestellte Semidünnschnitte wurden mit SmTK3 *antisense*- (A-G) oder *sense*- (H-J) Transkripten hybridisiert. Nach stringenter Waschung bis 0.1x SSC erfolgte die Detektion von Hybridisierungsereignissen wie oben beschrieben. Vergrößerungen: A, H, I, 1:15; B, 1:30; C-G, J, 1:90. M, Männchen; W, Weibchen; dl, Darmlumen; ga, Gastrodermis; ms, Muskeln; ov, Ovar; ozk, Oozytenkern; pa, Parenchym; sb, Subtegument; tb, Tuberkel; te, Testes; tg, Tegument; vt, Vitellarium; vz, Vitellozyte

3.1.4. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen SmTK3: Bakterielle Expression von SmTK3-Subklonen und anschließende Immunisierung

Die Voraussetzung für eine Charakterisierung von SmTK3 auf Proteinebene ist die Gewinnung von spezifischen Antikörpern gegen das Molekül, mit denen die angestrebten Western-Blot-Analysen und Immunlokalisationsstudien durchgeführt werden können. Für die Herstellung polyklonaler Antikörper mußten zunächst Teilbereiche von SmTK3 exprimiert werden, die im weiteren Verlauf als Antigene für eine Immunisierung eingesetzt wurden. Für die Expression wurde das QIAexpressionist-Kit (Qiagen) verwendet. Dabei handelt es sich um ein bakterielles Expressionssystem mit einem IPTG-induzierbaren Promotor. Die zu exprimierende cDNA-Sequenz wird *in frame* hinter einen „His-Tag“ in den geeigneten pQE-Vektor kloniert. Die Aufreinigung des Proteins erfolgt über eine Nickel-NTA-Säule, die den „Tag“ spezifisch bindet.

Der erste SmTK3-Subklon, der exprimiert wurde, war pQE-3-10. Dabei handelt es sich um ein 1867 bp langes cDNA-Fragment, dem von der Volllänge-Sequenz die 5'-UTR und die ersten 504 bp des kodierenden Bereichs fehlen (Winnen, 1999). Damit repräsentiert der Klon einen Teil der SH3-Domäne und jeweils vollständig die SH2- und die TK-Domäne (Abb. 3-1). Dieser Subklon wurde von R. Winnen während seiner Promotion konstruiert und sequenziert. Erste Versuche zeigten, dass das Expressionsprodukt nicht löslich in Zytoplasma sondern aufkonzentriert in *inclusion bodies* in der Bakterienzelle vorliegt. Daher musste zur Isolierung und zur Aufreinigung des Proteins auf ein modifiziertes Protokoll auf der Basis von 6 M Gu-HCl (Qiagen Handbuch, 1998) zurückgegriffen werden (Winnen, 1999). Des Weiteren war es notwendig, die Induktionszeit von 4 bis 5 Stunden auf 2 Stunden zu verkürzen. Die Expression von pQE-3-10 ergab nach erfolgreicher Aufreinigung und Western-Blot-Analyse mit einem anti-His-Tag-Antikörper hauptsächlich zwei Produkte: Das vollständige Expressionsprodukt mit einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 54 kD und ein partielles Produkt von ca. 30 kD (Abb. 3-5). Damit konnte die Anzahl der Abbruchprodukte im Vergleich zu früheren Versuchen (Winnen, 1999) durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen von über zehn auf eins reduziert werden. 25 µg der aufgereinigten und aufkonzentrierten Expressionsprodukte wurden zum Institute de Pasteur nach Lille (Frankreich) gesendet, wo in der Arbeitsgruppe von C. Dissous mit dem Antigen ein Kaninchen immunisiert wurde. Die resultierenden Antiseren wurden anschließend in verschiedenen Verdünnungen und unverdünnt an Gesamtprotein von *Schistosoma* auf die Bildung von Immunkomplexen getestet. Keine der durchgeführten Western-Blot-Analysen führte jedoch zu Signalen (Zemzoumi, pers. Mitteilung), so dass die Immunisierung als erfolglos bezeichnet werden muss.

Eine naheliegende Erklärung für die fehlgeschlagene Antikörpergewinnung gegen pQE-3-10-Proteine besteht darin, dass der gesamte Bereich nicht immunogen ist. Daher wurde für einen zweiten Versuch ein neuer Subklon (pQE-CS12) konstruiert, der mit der *unique-site* (NS-Pos. 46-471) einen anderen Bereich von SmTK3 abdeckt (Abb. 3-1). Ein Vorteil von Antikörpern, die gegen das Expressionsprodukt dieses Subklons gebildet werden, ist, dass sie gegen eine nicht-konservierte Region gerichtet sind. Das schließt Kreuzreaktionen mit anderen Tyrosinkinasen aus. Für die Konstruktion von pQE-CS12 wurde eine PCR-Reaktion mit den Primern TK3-NT-2 und TK3-NT-3 sowie dem SmTK3-cDNA-Klon SH2-43 als Template durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt wurde in den pQE-30-Vektor (Qiagen) kloniert und anschließend zur

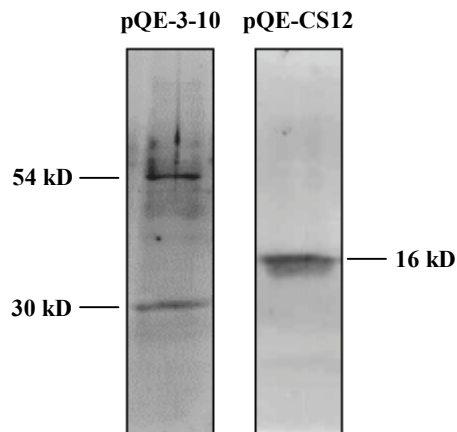


Abb. 3-5. Bakterielle Expression der SmTK3-Subklone pQE-3-10 und pQE-CS12. Aufgereinigte Proteine wurden auf einem 10%igen (pQE-3-10) bzw. 15% (pQE-CS12) SDS/PAA-Gel aufgetrennt und auf einen Filter transferiert. Der Umsetzung mit einem AP-gekoppelten anti-His-Tag-Antikörper folgte die Detektion mit Fast-Farbstoffen.

Kontrolle sequenziert. Expression, Isolierung und Aufreinigung erfolgten nach Standardbedingungen (Qiagen Handbuch, 1998), da das Protein löslich im Cytosol der Bakterienzelle vorliegt. Die Umsetzung des aufgereinigten Expressionsprodukts per Western-Blot mit einem anti-His-Tag-Antikörper zeigte, dass ausschließlich ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von 16 kD synthetisiert wird (Abb. 3-5). Von diesem Produkt wurden 50 µg an die Firma Eurogentec gesendet, um mit dem Antigen ein Kaninchen zu immunisieren. Durch mehrere Western-Blot-Analysen, bei denen *Schistosoma*-Gesamtprotein mit verschiedenen Immunsereen umgesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung in diesem Fall erfolgreich verlaufen war. Das unverdünnte Prä-Immunsereum reagierte nicht mit *Schistosoma*-Proteinen. Hingegen detektierten sowohl das Antiserum der 1. Blutung als auch das der 2. Blutung in einer Verdünnung von 1:500 ein Protein im Bereich von ca. 70 kD, der Größenbereich, der für SmTK3 erwartet wird. Der zur Detektion eingesetzte Zweitantikörper zeigte ohne den Erstantikörper keine Reaktion (Daten nicht gezeigt).

3.1.5. Western-Blot-Analyse mit SmTK3: Vergleich von murenen Weibchen und Männchen

Die erste Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen anti-SmTK3-Antikörper unter optimierten Bedingungen sollte verschiedene Sachverhalte klären. Zum einen ging es darum, zu ermitteln, ob der Antikörper spezifisch SmTK3 erkennt oder zusätzlich noch mit weiteren Proteinen kreuzreagiert. Als zweites sollte die Frage nach post-translationalen Modifikationen, wie z.B. die für TKs typische(n) Phosphorylierung(en), beantwortet werden, die u.U. an einem Shift im PAA-Gel zu erkennen sind. Des weiteren sollten die Northern-Blot-Analysen bestätigt werden, die nach einigen widersprüchlichen Aussagen letztendlich darauf hinweisen, dass SmTK3 in beiden Geschlechtern in gleichem Maße exprimiert wird. Dazu wurde Gesamtprotein aus murenen Weibchen und Männchen separat durch denaturierende PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und per Western-Blot auf einen Filter transferiert. Die Ponceau-Rot-Färbung der immobilisierten Proteine zeigte, dass in etwa gleiche Mengen transferiert worden waren. Die Proteine wurden mit dem polyklonalen anti-SmTK3-Antikörper (1:1.000) umgesetzt und die Immunkomplexe mit einem AP-gekoppelten Zweitantikörper, CDP-Star und Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 3-6). Es zeigte sich, dass der anti-SmTK3-Antikörper unter den optimierten Bedingungen bei beiden Geschlechtern zwei Proteine in gleichen Mengen detektiert: SmTK3, in der Höhe von 70

kD, und ein weiteres Protein bei 60 kD. Damit wird zunächst einmal die Northern-Blot-Analyse insofern bestätigt, dass SmTK3 weder geschlechtsspezifisch noch -präferentiell exprimiert wird.

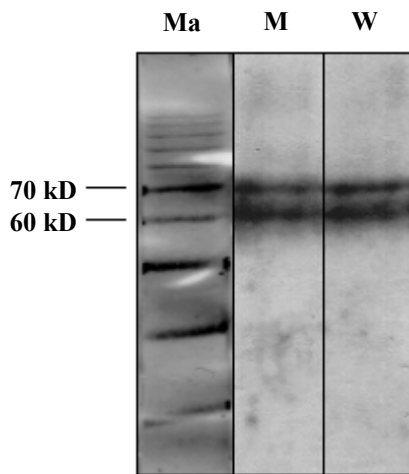


Abb. 3-6. SmTK3-Western-Blot-Analyse; Vergleich von maturen Weibchen mit adulten Männchen. Gesamtprotein aus 20 adulten Männchen (M) und 20 maturen Weibchen (W) wurden auf einem 10%igen SDS/PAA-Gel aufgetrennt, auf einen Filter transferiert und mit dem anti-SmTK3-Antikörper (1:1.000) umgesetzt. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte über einen AP-gekoppelten Zweitantikörper (anti-Kaninchen IgG, 1:20.000), CDP-Star und Autoradiographie. Die Expositionszeit betrug 60 min. Ma, Größenstandard, 10 kD-Leiter.

Um Hinweise auf das 60 kD-Protein zu erhalten, wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob der eher unwahrscheinliche Fall vorlag, dass nicht-phosphoryliertes SmTK3-Protein in einem PAA-Gel in der Höhe von 60 kD läuft und das Signal bei 70 kD auf einen Shift durch Phosphorylierung zurückzuführen ist. Dazu wurden Proteinextrakte mit Alkalischer Phosphatase behandelt, bevor sie einer Western-Blot-Analyse unterzogen wurden. Die Umsetzung mit dem Antikörper resultierte jedoch erneut in zwei Signalen bei 60 kD und 70 kD, so dass ein durch Phosphorylierung verursachter Shift (nicht jedoch eine Phosphorylierung an sich) auszuschließen ist. Die Northern-Blot-Analysen zeigten deutlich, dass keine verkürzten Transkripte gebildet werden, auf deren Basis ein verkürztes Protein translatiert werden könnte. In der Aminosäuresequenz gibt es keine Hinweise auf eine post-translationale Spaltung von SmTK3, so dass der Antikörper vermutlich mit einem anderen Protein kreuzreagiert. In dem Größenbereich von 60-70 kD kommt es bei einigen Antisera zu einer unspezifischen Reaktion mit BSA (67 kD). Die Würmer werden nach der Isolierung aus dem Endwirt in BSA-haltiges Medium überführt und dann für die Lagerung eingefroren. Eine Kreuzreaktion mit BSA konnte jedoch für den anti-SmTK3-Antikörper ausgeschlossen werden, da für eine weitere Umsetzung mit *Schistosoma*-Gesamtprotein auf die Verwendung von BSA im Medium verzichtet wurde. Dabei wurden erneut beiden Signale erhalten. Letztendlich brachte auch eine Post-Adsorption keine Lösung des Problems, so dass die Reaktion mit dem 60 kD-Protein weder erklärt noch verhindert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

3.1.6. Western-Blot-Analyse mit SmTK3: Vergleich von maturen und virginen Weibchen

Für den Fall, dass SmTK3 eine Schlüsselfunktion in der Reifung des Weibchens einnimmt, wird das Gen möglicherweise, aber nicht zwingend, stärker in maturen als in virginen Weibchen exprimiert. Eine entwicklungspezifisches Vorkommen des Proteins ist hingegen auf-

grund der RT-PCR-Analysen nahezu ausgeschlossen. Um eine entwicklungsabhängige Proteinsynthese in adulten Weibchen zu überprüfen, wurden gleiche Mengen an Proteinextrakten aus virginen und maturen Weibchen per Western-Blot-Analyse mit dem anti-SmTK3-Antikörper umgesetzt. Dabei konnte kein deutlicher Mengenunterschied von SmTK3-Protein zwischen den beiden Entwicklungsstadien festgestellt werden. Das gleiche gilt für das 60 kD-Protein (Abb. 3-7).

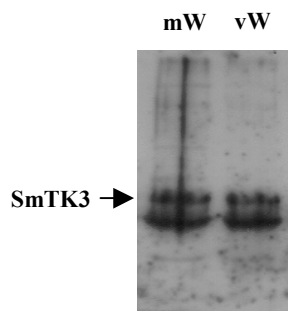


Abb. 3-7. SmTK3-Western-Blot-Analyse; Vergleich von muren mit virginen Weibchen. Je 20 µg Gesamtprotein aus muren (mW) und virginen (vW) Weibchen wurden auf einem 8%igen SDS/PAA-Gel aufgetrennt, auf einen Filter transferiert und mit dem anti-SmTK3-Antikörper (1:1.000) umgesetzt. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte über einen AP-gekoppelten Zweitantikörper (anti-Kaninchen IgG, 1:20.000), CDP-Star und Autoradiographie. Die Expositionszeit betrug 3.5 h.

3.1.7. Immunlokalisation mit SmTK3 und der Vergleich mit den *in-situ*-Hybridisierungen

Um die Lokalisation von SmTK3-Proteinen in adulten Schistosomen festzustellen und mit den Daten der *in-situ*-Hybridisierungen zu vergleichen, wurden Immunhistologien durchgeführt. Dazu wurden 5 µM Semidünnschnitte von Bouin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Wurmpaaren mit dem anti-SmTK3-Antikörper (1:1.000) umgesetzt. Die Immunkomplexe wurden durch einen AP-gekoppelten Zweitantikörper und Fast-Farbstoffe detektiert. Als Negativkontrollen wurden einzelne Schnitte ausschließlich mit dem Erst- oder dem Zweitantikörper vor der Farbreaktion umgesetzt. Es zeigte sich, dass SmTK3-Proteine gewebespezifisch in den Vitellarien, in den Ovarien, in den Testes und im Parenchym beider Geschlechter nachgewiesen werden können. In den Muskeln, im Tegument, im Subtegument und in der Gastrodermis, sowie in den Negativkontrollen wurden keine Signale erhalten (Abb. 3-8). Damit korrelieren diese Daten mit den Resultaten der *in-situ*-Hybridisierungen, ungeachtet des unbekanntes 60 kD-Proteins, mit dem der anti-SmTK3-Antikörper kreuzreagiert. Trotzdem sind einige erläuternde Worte zur Immunhistologie nötig. Es ist anhand der gezeigten Bilder nicht einfach zu erkennen, dass die Muskeln und das Subtegument nicht gefärbt sind. Nur in den Abbildungen 4D und 4E ist die Muskulatur in Form von Faserstrukturen eindeutig zu erkennen. Bei Betrachtung einzelner Fasern wird deutlich, dass diese Strukturen nicht gefärbt vorliegen. Tritt bei einer Immunlokalisation eine Färbung des Parenchyms auf, so ist es meistens schwer zu bestimmen, ob das Subtegument ebenfalls gefärbt ist oder ungefärbt bleibt. Das ist darauf zurückzuführen, dass die angewandte Technik es kaum erlaubt, die beiden Gewebe zu unterscheiden, wenn nicht eines von beiden durch Färbung hervorgehoben wird. Trotzdem deutet die Abbildung 4C darauf hin, dass das dorsale Subtegument ungefärbt bleibt. Möglicherweise entsteht durch Resultate der *in-situ*-Hybridisierung der Eindruck, dass SmTK3 deutlich stärker in den Gonaden als im Parenchym

exprimiert wird, während die Immunhistologie diesen Unterschied nicht bestätigt. Dazu muss angemerkt werden, dass die angewendete Methode der *in-situ*-Hybridisierung zwar qualitative aber keine quantitativen Aussagen zulässt (Wilkinson, 1994). Des weiteren ist es durchaus möglich, dass in verschiedenen Ansätzen trotz gleicher Vorgehensweise die Fixierung in unterschiedlicher Qualität abläuft. Diese Qualitätsunterschiede wirken sich wahrscheinlich vor allem auf Zytoplasma-arme Zellen (wie z.B. Parenchym- und Muskelzellen) aus, die bei stärkerer Fixierung regelrecht „schrumpfen“. Bei solchen Zellen haben Sonden und Antikörper im Vergleich mit Zytoplasma-reichen Zellen (wie z.B. Oozyten) einen erschwerten Zugang zu Zielmolekülen im Zytosol.

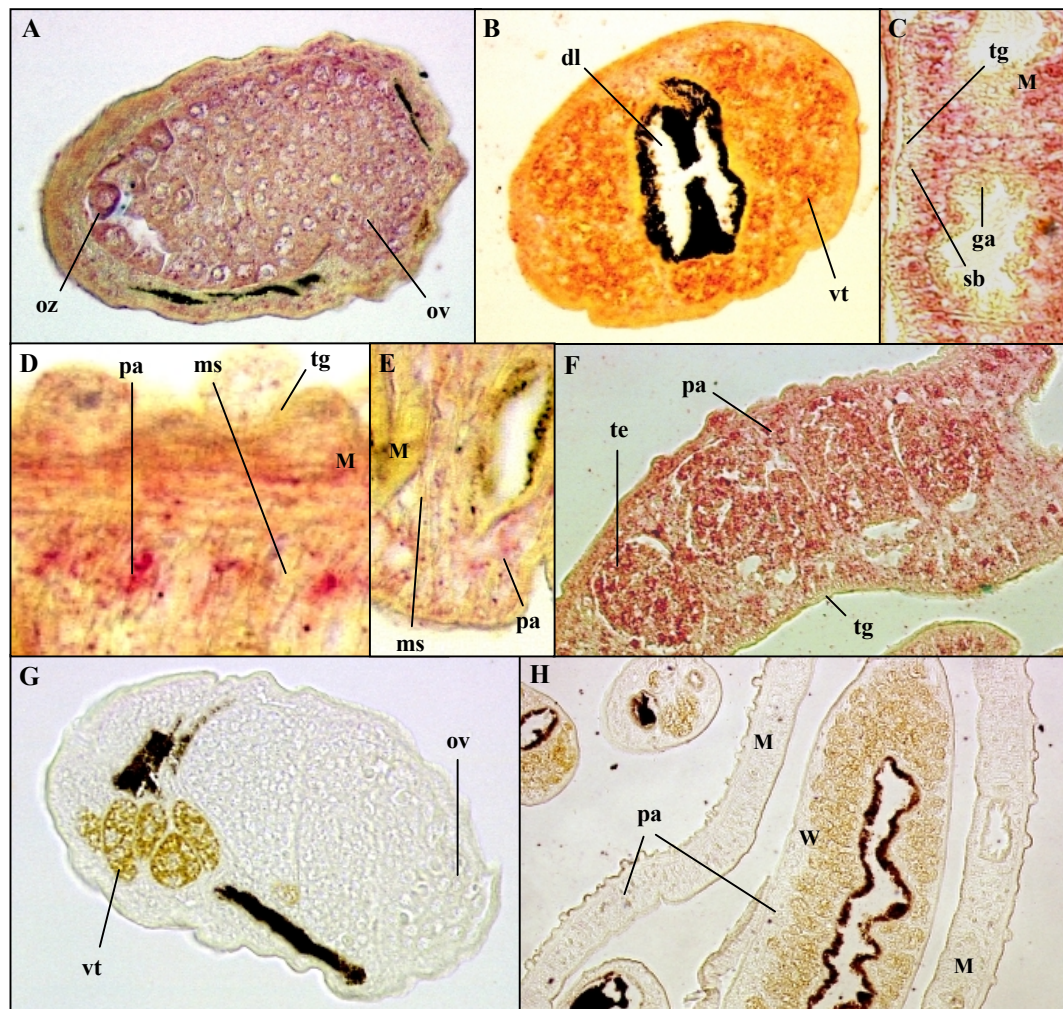


Abb. 3-8. Immunhistologie von SmTK3 an Gewebeschnitte gepaarter Schistosomen. Semi-Dünnschnitte gepaarter Schistosomen wurden zunächst mit anti-SmTK3-Antiserum (ü/N, 4°C) und anschließend mit einem AP-gekoppelten Zweitantikörper gegen Kaninchen IgG (1:10.000, 2 h, RT) umgesetzt (A-E). Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte mit Fast-Farbstoffen für 45 min. Die Negativ-Kontrollen wurden unter den gleichen Bedingungen nur mit dem Erstantikörper (G) oder dem Zweitantikörper (H) inkubiert. Vergrößerungen: A, B, F, G: 1:90; C: 1:75; D: 300; F: 200; H: 1:30. M, Männchen; W, Weibchen; dl, Darm-lumen; ga, Gastrodermis; ms, Muskeln; ov, Ovar; oz, Oozyte; pa, Parenchym; sb, Subtegument; tb, Tuberkel; te, Testes; tg, Tegument; vt, Vitellarium

3.2. Die Protein-Tyrosinkinase SmTK4 und SmTK5

3.2.1. Die Syk-Tyrosinkinase SmTK4

Während seiner Diplomarbeit modifizierte M. Quack den Ansatz von P Schübler zur Isolierung von PTKs aus *Schistosoma* und konnte dadurch ein weiteres cDNA-Fragment mit signifikanter Homologie zu zytoplasmatischen Tyrosinkinase klonieren (1997). R. Winnen ermittelte in seiner Promotionsarbeit die komplette kodierende Sequenz (3795 bp mit Stopp-Codon) des SmTK4-Gens (1999). Das abgeleitete Protein enthält zwei SH2-Domänen und eine TK-Domäne; damit gehört SmTK4 zur Familie der Syk-TKs. Southern- und Northern-Blot-Analysen zeigten, dass SmTK4 als *single-copy*-Gen im Genom von *Schistosoma mansoni* vorliegt und signifikant häufiger im Männchen als im Weibchen transkribiert wird. Erste Lokalisationsstudien führten zu Hinweisen auf eine Expression in den Testes der Männchen, für Weibchen lagen keine Resultate vor (Winnen, 1999).

3.2.1.1. *In-situ*-Hybridisierung und RT-PCR-Analysen mit SmTK4

Um Hinweise auf die Funktion von SmTK4 zu erlangen, stellte sich die Frage, in welchen Entwicklungsstadien das Gen exprimiert wird. In diesem Zusammenhang sollten auch die Lokalisationsstudien vervollständigt bzw. reproduziert werden. Vergleichende RT-PCR-Versuche zeigten, dass SmTK4 sowohl in allen larvalen als auch in allen adulten Entwicklungsstadien transkribiert wird (Abb. 3-9). Durch *in-situ*-Hybridisierung wurden Transkripte gewebe-spezifisch im Ovar und in den Testes sowie im Parenchym und im Subtegument beider Geschlechter detektiert. Im Vitellarium, im Tegument und in der Gastrodermis konnte keine SmTK4-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3-10).

3.2.1.2. Phylogenetische Analyse von SmTK4

SmTK4 ist die erste Tyrosinkinase der Syk-Familie, die bis zu diesem Zeitpunkt für die Gruppe der *Acoelomata*¹ beschrieben worden ist. Um die Klassifizierung durch Verwandtschaftsanalysen zu bestätigen, wurde auf der Basis von TK-Domänen verschiedener PTKs ein Cladogramm erstellt (Abb. 3-28/Kap. 3.6.1.3). Dadurch konnte ein hoher und signifikanter Verwandtschaftsgrad der TK-Domäne von SmTK4 zu TK-Domänen anderer Syk-TKs nachgewiesen werden, wobei die Ähnlichkeit zu den Vertretern von *Hydra* (Steele *et al.*, 1999) und *Ephydatia* (Suga *et al.*, 2001) am größten ist. Die TKs anderer Familien sind in dem Cladogramm deutlich von SmTK4 distanziert.

Alle relevanten Daten, die im Zusammenhang mit SmTK4 innerhalb dieser Promotionsarbeit ermittelt werden konnten, sind bereits publiziert: Knobloch *et al.* (2002).

¹ Die Gruppe der *Acoelomata* beinhaltet die Stämme der Plathelminthen und der Schnurwürmer.

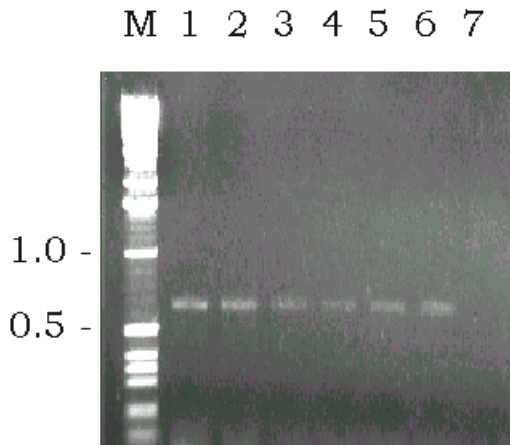


Abb. 3-9. Vergleichende RT-PCR zum Nachweis von SmTK4-Transkripten in verschiedenen Entwicklungsstadien. Als Template für die RT-PCRs dienten in separaten Ansätzen 500 ng Total-RNA aus Schistosomen verschiedener Entwicklungsstadien: Paarungserfahrene (1) und -unerfahrene (2) Männchen, reife (3) und virgine (4) Weibchen sowie Miracidien (5) und Cercarien (6). Für die Negativkontrolle (7) wurde eine Mixtur aus je 50 ng Total-RNA aller Stadien eingesetzt. Das Bild zeigt die Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Ethidiumbromid/Agarosegel. PCR-Profil: 1 min 93°C, 1 min 56°C, 45 sec 72°C, 35 Zyklen. M, Größenstandard (1 kB-Leiter). Die Größen sind in kB angegeben.

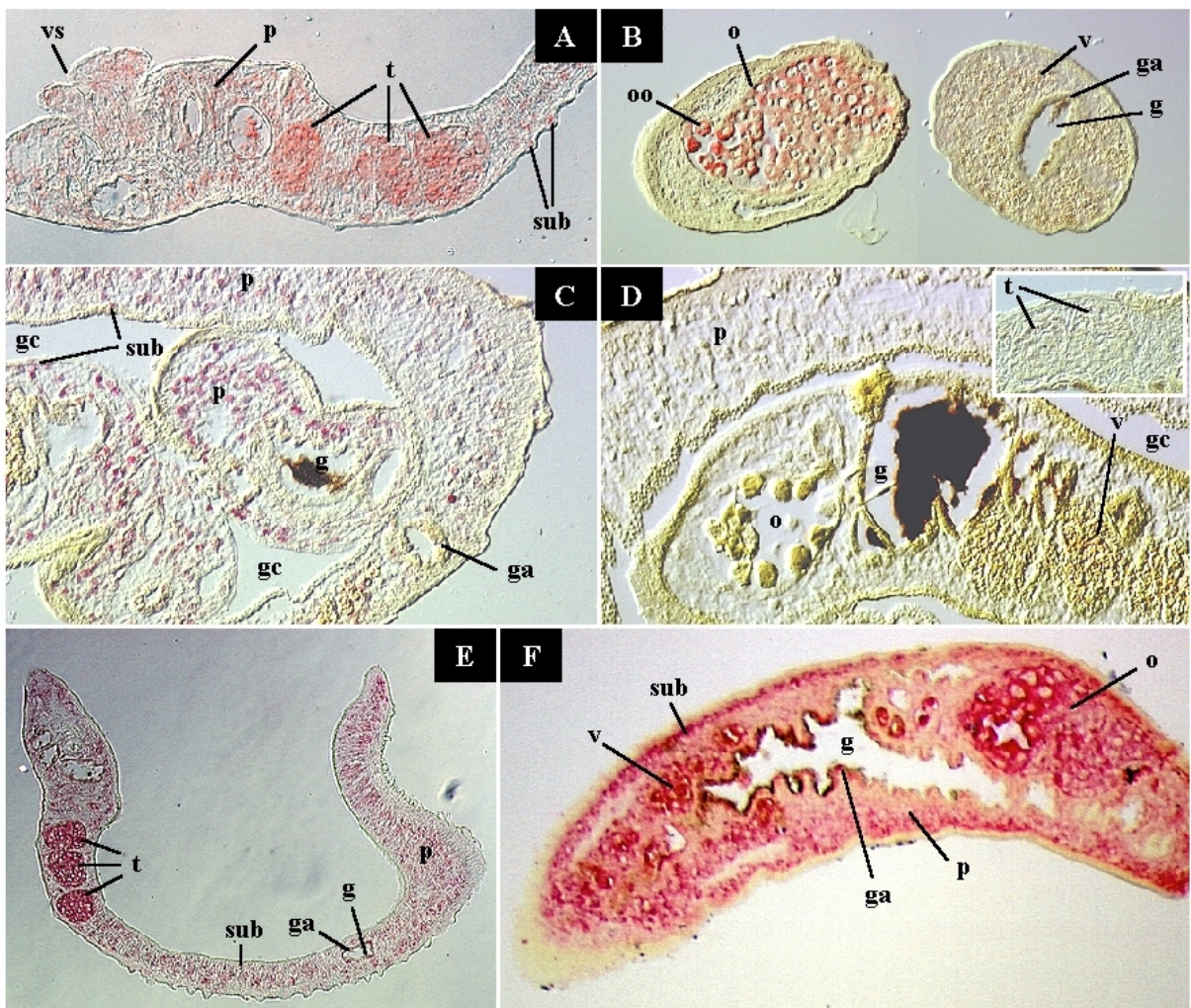


Abb. 3-10. In-situ-Hybridisierung von SmTK4 und SmTK5. Semidünnschnitte von *Schistosoma*-Pärchen wurden mit Digoxigenin-markierten SmTK4 *antisense*- (A-C) oder *sense*-Transkripten (Negativkontrolle, D) bzw. mit SmTK5 *antisense*-Transkripten (E, F) inkubiert. Der Nachweis von Hybridisierungsereignissen erfolgte mit einem AP-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper und Fast-Farbstoffen. Vergrößerungen: A, 1:30; B-D, 1:60; D_i, 1:30; E, 1:15; F, 1:40. g, Darmlumen; ga, Gastrodermis; gc, gynaecophorer Kanal; o, Ovar; oo, Oozyte; p, Parenchym; sub, Subtegument; t, Testes; v, Vitellarium; vs, ventraler Saugnapf

3.2.2. Die Src-Tyrosinkinase SmTK5

Eine weitere PTK, die von P. Schüssler und K. Kapp kloniert und charakterisiert wurde, ist SmTK5 (Schussler, 1997; Kapp, 2000; Kapp *et al.*, 2001). Das *single-copy*-Gen enthält ein ORF von knapp 2 kB und wird allen larvalen und adulten Entwicklungsstadien transkribiert. Das abgeleitete Protein gehört zu der Familie der Src-Tyrosinkinasen, da es über eine SH4-, eine SH3-, eine SH2- und eine TK-Domäne verfügt. Es besitzt einige Charakteristika, die Mitglieder der Fyn-Subfamilie² kennzeichnen.

3.2.2.1. *In-situ*-Hybridisierung und phylogenetische Analyse von SmTK5

Zu Beginn meiner Promotionsarbeit war noch nicht bekannt, in welchen Geweben SmTK5 exprimiert wird. Mittels *in-situ*-Hybridisierungen wurden Transkripte in den Gonaden (Vitellarium, Ovar, Testes), im Parenchym, im Subtegument und in der Gastrodermis beider Geschlechter nicht aber im Tegument und in den Muskeln nachgewiesen (Abb. 3-10). Des weiteren wurde auch die TK-Domäne von SmTK5 in die phylogenetische Analyse, die in Kapitel 3.6.1.3 beschrieben ist, einbezogen. Es zeigte sich, dass die katalytische Domäne von SmTK5 zwar signifikant in die Src-Familie, dort aber nicht in die Subfamilie der Fyn-Tyrosinkinasen eingeordnet wird (Abb. 3-28).

Alle relevanten Daten bezüglich SmTK5, die während dieser Promotionsarbeit ermittelt wurden, sind bereits publiziert: Knobloch *et al.* (2002).

² Die Unterteilung der Src-Familie in neun Subfamilien betrifft ausschließlich Tyrosinkinasen aus Vertebraten (Thomas & Brugge, 1997).

3.3. Die Isolierung von Bindungspartnern der Tyrosinkinase SmTK3

3.3.1. Das Prinzip der Yeast-Two-Hybrid-Systeme Matchmaker II und III

Die Matchmaker-Yeast-Two-Hybrid-Systeme der Fa. Clontech basieren auf dem Hefetranskriptionsfaktor GAL4. Zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen werden zwei Fusionsproteine, das *bait* und das *target*, in Hefezellen exprimiert. Das *bait*-Konstrukt besteht aus der GAL4-Bindedomäne (GAL4-BD) und dem Protein bzw. der Proteinbindedomäne, zu dem ein Interaktionspartner gesucht wird. *Target*-Konstrukte setzen sich jeweils aus der GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) und zufälligen cDNA-Sequenzen eines Organismus zusammen (Yeast-Two-Hybrid-Bank). In das Genom der verwendeten Hefezellen sind DNA-Abschnitte integriert, bei denen hinter einer *GAL4 upstream activation sequence* (UAS_{GAL4}) bestimmte Reportergene lokalisiert sind. Da den Zellen der intakte GAL4-Transkriptionsfaktor fehlt, können die Reportergene ausschließlich durch eine Rekonstruktion des vollständigen GAL4-Moleküls aktiviert werden. Eine solche Rekonstruktion findet in der Regel nur dann statt, wenn *bait* und *target* miteinander interagieren (Abb. 3-11). Die Expression solcher Reportergene - und damit auch die Interaktion der beiden Fusionsproteine - lässt sich durch eine Reihe von Tests nachweisen. Die Matchmaker-Systeme II und III unterscheiden sich hauptsächlich durch die Verwendung verschiedener Hefestämme und damit in der Anzahl der nutzbaren Reportergene voneinander. Die beiden Systeme sind aber in Bezug auf die *bait*-Konstrukte miteinander kompatibel.

Es bleibt anzumerken, dass mit dem Yeast-Two-Hybrid-System zwar Protein-Protein-Interaktionen detektiert, anschließend aber die entsprechenden cDNAs isoliert werden.

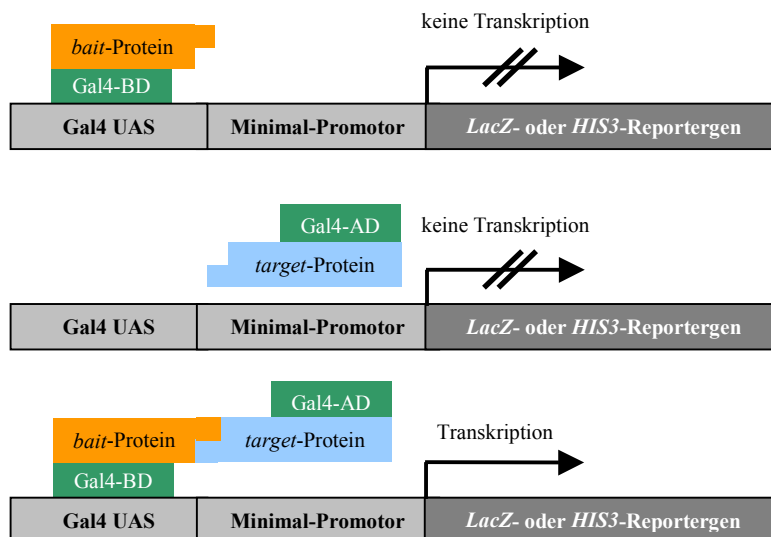


Abb. 3-11. Das Prinzip des auf Gal4 basierenden Yeast-Two-Hybrid-Systems. Die Reportergene werden nur dann transkribiert, wenn durch eine Interaktion zwischen *bait* und *target* der Transkriptionsfaktor Gal4 rekonstruiert wird.

3.3.2. Die *bait*-Konstrukte

Die spezifische Interaktion einer Src-Tyrosinkinase mit (Substrat-) Proteinen, die *downstream* im Signalweg gelegen sind, erfolgt in der Regel über ihre SH3-Domäne, die Prolin-reiche Regionen

in der Aminosäuresequenz des Bindungspartners erkennt (Thomas & Brugge, 1997). Es ist beschrieben, dass die isolierte SH3-Domäne ausreicht, um ein spezifisches Zielmolekül zu binden (Park *et al.*, 1998; Kay *et al.*, 2000). Dementsprechend wurde ein *bait*-Konstrukt erstellt, das ausschließlich die vollständige SH3-Domäne (NS-Pos.: 472-657) von SmTK3 enthält (TK3-SH3). Dazu wurde eine PCR mit den Primern TK3-SH3-1 und TK3-SH3-2 und dem SmTK3-Volllängenklon SH2-43 als Template durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SalI* *in frame* hinter die GAL4-BD in den Vektor pGBT9¹ kloniert. Es wird vermutet, dass in einigen Fällen die *unique-site* von Src-Tyrosinkinasen die Bindung zu einem Substrat positiv oder negativ beeinflusst (Thomas & Brugge, 1997). Daher besteht ein zweites *bait*-Konstrukt - TK3-US/SH3 - aus SH3-Domäne und vollständiger *unique-site* (NS-Pos.: 46-657). Hierzu wurde das Produkt einer PCR-Reaktion mit den Primern TK3-NT-1 und TK3-SH3-2 und dem Klon SH2-43 als Template ebenfalls über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SalI* in den Vektor pGBT9 kloniert (Abb. 3-12). Zur Kontrolle wurden die Nukleinsäuresequenzen beider *bait*-Konstrukte sequenziert.

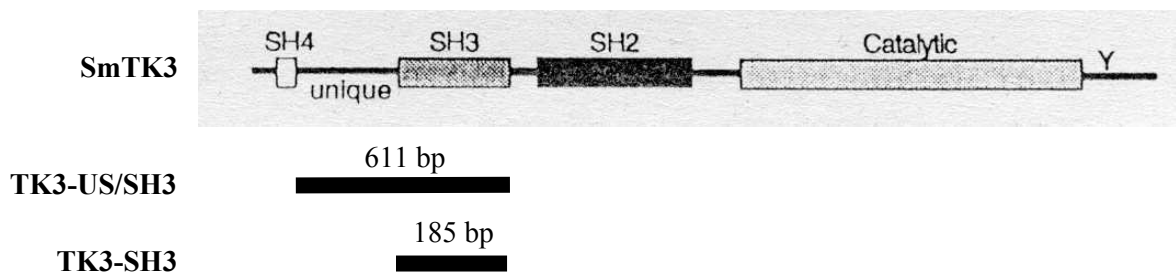


Abb. 3-12. Schematische Darstellung der *bait*-Konstrukte in Relation zur vollständigen SmTK3-Sequenz. Die konservierten Domänen, die *unique-site* und das regulatorische Tyrosin am C-Terminus sind dargestellt. Die Längen der *bait*-Konstrukte sind auf Nukleinsäureebene angegeben.

Die beiden *bait*-Konstrukte wurden jeweils separat in Y190-Hefezellen² transformiert. Daraus resultierten die Hefeklonen Y190-TK3-US/SH3 und Y190-TK3-SH3. Es schloss sich eine Reihe von Versuchen an, die zeigen sollten, ob diese Konstrukte auf der Basis des Matchmaker Gal4-Systems für das Screening von Two-Hybrid-Banken eingesetzt werden können. Via Western Blot und Antikörpernachweis konnte die Expression der beiden Gal4-Fusionsproteine TK3-US/SH3 (39 kD) und TK3-SH3 (24 kD) in Hefezellen demonstriert werden (Abb. 3-13). Da der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen im Matchmaker-System durch die Expression der Reportergene *HIS3* und *LacZ* erfolgt, ist es notwendig, zu prüfen, ob diese Gene möglicherweise durch ein *bait*-Protein autonom in den Hefezellen aktiviert werden. Dazu wurden beide Hefeklonen separat auf His⁻-Agarplatten mit 3-AT³ ausgestrichen. Da nach zwölf Tagen Inkubation kein Kolonienwachstum beobachtet werden konnte, kann eine autonome Aktivierung des *HIS3*-Gens durch die *bait*-Konstrukte ausgeschlossen werden. Anschließend wurde mit den Hefeklonen ein β -Galaktosidase-Filterassay durchgeführt. Die Expression des Reportergens *LacZ* wird durch die Umsetzung des Substrats X-Gal durch die β -Galaktosidase sichtbar (Blaufärbung). Da auch nach

¹ Der Shuttlevektor pGBT9 trägt das TRP1-Gen als Transformationsmarker. Shuttlevektoren können sowohl in Hefe als auch in Bakterien transformiert werden.

² Der Stamm Y190 trägt die Reportergene *HIS3* und *LacZ* und ist defizient für die Aminosäuren Trp und Leu.

³ 3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazol) inhibiert die endogene Histidin-Synthese des Stamms Y190. Die erforderliche Konzentration wurde in Testreihen bestimmt.

24-stündiger Inkubation keine Blaufärbung detektiert werden konnte, kann auch für dieses Reporterger eine autonome Aktivierung durch die *bait*-Konstrukte ausgeschlossen werden.

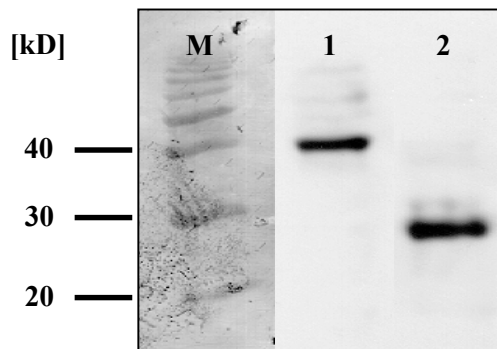


Abb. 3-13. Die Fusionsproteine TK3-US/SH3 und TK3-SH3 werden in Hefezellen exprimiert. Proteinextrakte der Hefeklone Y190-TK3-US/SH3 (1) und Y190-TK3-SH3 (2) wurden auf einem 15%igem PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Umsetzung erfolgte mit einem Anti-Gal4-Antikörper (gerichtet gegen die Gal4-BD; 1:500) und einem AP-gekoppelten Zweitantikörper, (gerichtet gegen Maus-IgG; 1:10.000). Für die Detektion wurde CDP-Star verwendet. M: 10 kD-Leiter.

3.3.3. Sukzessives Screening einer embryonalen *Drosophila*-Bank mit den Konstrukten TK3-US/SH3 und TK3-SH3

Zunächst wurde ein Screening mit einer kommerziell erhältlichen embryonalen *Drosophila melanogaster*-Bank⁴ (Clontech) durchgeführt. Das sollte zeigen, ob die *bait*-Konstrukte erfolgreich für solche Zwecke eingesetzt werden können. Aufgrund des hohen Homologiegrades der Src-TKs und auch der SH3-Domänen innerhalb des gesamten Tierreichs, birgt dieser Ansatz zusätzlich sowohl eine Absicherung als auch eine Alternative zum Screening einer *Schistosoma*-Bank. Die resultierenden *in vitro*-Interaktionspartner von *Drosophila melanogaster* können mit denen des *Schistosoma*-Screenings verglichen werden. Werden durch beide Screenings orthologe Gene kloniert, so ist dies ein weiterer Hinweis auf die Echtheit des Bindungspartners, der aus der *Schistosoma*-Bank isoliert worden ist. Werden aus der *Drosophila*-Bank zusätzliche Moleküle erhalten, so besteht die Möglichkeit, die orthologen *Schistosoma*-Gene über andere Methoden zu isolieren und eine mögliche Interaktion mit SmTK3 anschließend nachzuweisen.

Die embryonale *Drosophila*-Bank enthält cDNA-Fragmente gepoolter Embryonen der Stunden 0-18. Sie basiert auf reverser Transkription mit einem Oligo(dT)-Primer. Die amplifizierte cDNA wurde in den Vektor pACT2⁵ kloniert⁶. Die beiden Screenings erfolgten separat nach den Vorgaben des Matchmaker II-Systems. Demnach wurden die *bait*-Konstrukte und die Plasmide der *Drosophila*-Bank sukzessiv in den Hefestamm Y190 (s. Kap. 2.1.9) transformiert. Es wurden jeweils 5×10^5 Klone durchsucht, die Selektion erfolgte auf SD-Trp⁻/Leu⁻/His⁻-Agarplatten mit 50 mM 3-AT. Die Inkubationszeit betrug 10 Tage. Anschließend wurde mit putativ positiven Kolonien ein β -Galaktosidase-Filterassay durchgeführt (7 h Inkubationszeit). Nach Wiederholung der beiden Selektionen konnten schließlich 28 Kolonien aus dem Screening mit TK3-US/SH3 und sieben Kolonien aus dem Screening mit TK3-SH3 als positiv eingestuft werden.

⁴ Die Bank wurde mir freundlicherweise von Dr. A. Ramrath aus der Arbeitsgruppe von Prof. E. Knust in Form von isolierter Plasmid-DNA zur Verfügung gestellt.

⁵ Der Shuttlevektor pACT2 trägt das LEU2-Gen als Transformationsmarker.

⁶ Einzelne Plasmide der Bank werden im Folgenden als Bank-Plasmide bezeichnet.

3.3.3.1. Identifizierung der positiven Klone

Nach der Isolierung der Bank-Plasmide aus den positiven Hefekolonien wurden diese einer Restriktionsanalyse (*EcoRI/XhoI*) unterzogen, um die Insertgröße zu ermitteln. Anschließend wurden die Inserts im 5'-Bereich mit dem pACT2-Primer ansequenziert. Da das komplette Genom von *Drosophila melanogaster* entschlüsselt ist, konnten die cDNA-Fragmente durch Datenbankvergleiche über das Programm Blast X identifiziert werden. Neben Signalmolekülen und Proteinen des Zytoskeletts konnten auch Moleküle, die in Transkriptions-/Translationsabläufen involviert sind, als Bindungspartner für SmTK3 (im heterologen System) ermittelt werden.

Gruppe (G)	Identität	Homologie bzw. Domänen; Funktion	Klone	Insertgröße (bp)	sequenziert (bp)	Prolin-reiches Motiv
1	CG6046	SAP18 / Bin 1 (SIN3-assoziiertes Protein); Transkriptions-Co-Repressor	D3 - 02	680 (k)	vollständig	SITPPNRLPPTA
2	CG9005	Zell-Adhäsion	DN - 53	2500	500	LPHVEPLPSP (1)
3	CG9354	60s ribosomales Protein L31	DN - 10 DN - 20 DN - 27 DN - 54	600 (k) 600 (k) 650 (k) 600 (k)	vollständig vollständig 450 400	KKNPTVP (1)
4	CG13722	Mucin, EPPT; Strukturprotein	DN - 46	800	vollständig	viele
5	CG14419	Mucin, hmu-Gen	DN - 14 DN - 73	750 (k) 750 (k)	500 600	PSTTPSTTPSTTP
6	CG15021	Prolin-reiche Extensin-Domäne	DN - 12	1300	500	viele
7	CG15022	Prolin-reiche Extensin-Domäne	DN - 01 DN - 05 DN - 17 DN - 23 D3 - 04 D3 - 18	800 900 (k) 1050 (k) 1050 (k) 800 600	vollständig 500 600 400 600 vollständig	viele
8	CG15023	Prolin-reiche Extensin-Domäne	DN - 02 DN - 04 DN - 06 DN - 07 DN - 24 D3 - 11	800 (k) 800 (k) 850 (k) 750 (k) 800 (k) 750 (k)	700 700 620 vollständig 700 400	viele
9	CG17162	HCO ₃ ⁻ -Co-Transport-Domäne	DN - 21	3000 (Chimäre)	125	IDEPKHHPQK
10	CG18292	CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2) - assoziiertes protein 1	DN - 16	500	vollständig	PPPSTSP, PSVGP
11	GH06032	E1-E2 ATPase (Kationentransport)	D3 - 36	1200	600	KVAPLP, LAPPPR
12	abi-gene-product (Abi-GP)	Abi-1, Abi-2; interagiert mit abl-Tyrosinkinase	DN - 09	1600 (k)	600	HYAPNYP (1), PPLPPPPP (G)
13	β-Tubulin		D3 - 28	2700 (k)	800	PGFAP
14	SF1 Spleißfaktor		DN - 22 D3 - 01	1000 750	450 400	PPLPPPP (G), APPPMPPPLMP (G)
15	Tetraspanin	Integrales Membranprotein	DN - 19	1400	700	--
16	Vinculin	Aktin-bindendes Protein, zytoskeletales Ankerprotein	DN - 25	1500	400	RAPPRPLP (1), PPQPPPLP (G)
17	?		DN - 26 DN - 57	2200 1500	400 300	?

Tab. 3-1. Zusammenfassung der positiven Klone aus dem Screening der *Drosophila*-Bank mit den Konstrukten TK3-US/SH3 und TK3-SH3. *Identität:* Identität der klonierten Sequenz (BLAST). *Homologie bzw. Domänen; Funktion:* Gene mit dem höchsten Verwandtschaftsgrad (signifikante Homologie: $E < 0.01$) und/oder konservierte Domänen (BLAST) und/oder (postulierte) Funktion des abgeleiteten Proteins (FLYBASE). *Insertgröße:* ungefähre Größe der klonierten Inserts; (k), Insert enthält die komplette cDNA-Sequenz des Gens. *sequenziert:* sequenzierter Bereich des Inserts (vom 5'-Ende aus). *Prolin-reiches Motiv:* Prolin-reiche Motive als putative Bindungsstellen für die SH3-Domäne; (G), PxxP-Grundmotiv; (1), Klasse I-Motiv.

Die positiven Klone wurden bezüglich ihrer Identität in Gruppen (G) eingeteilt. Klone mit der Bezeichnung DN stammen aus dem Screening mit TK3-US/SH3, das Kürzel D3 kennzeichnet Klone aus dem Screening mit TK3-SH3. Die Tabelle 3-1 fasst alle positiven Klone zusammen. Die weiteren Analysen wurden jeweils mit dem Klon einer Gruppe durchgeführt, der das längste Insert beinhaltet. Durch weitere Restriktionsanalysen konnte für diese Klone bis auf eine Ausnahme (G9/DN-21) ausgeschlossen werden, dass es sich um Chimären handelt.

3.3.3.2. Verifizierung der Interaktionen

Es besteht die Möglichkeit, dass bei dem Screening-Verfahren mehrere verschiedene Bank-Plasmide neben dem *bait*-Plasmid simultan in eine Hefezelle transformiert werden. Das kann möglicherweise dazu führen, dass in einer als „positiv“ ermittelten Hefekolonie die Bank-Plasmide A und B vorhanden sind, Plasmid A ausschließlich die Interaktion mit dem *bait* eingeht, aber nur Plasmid B isoliert wird. In diesem Fall ist Plasmid B ein falsch-positiver Klon. Um solche Artefakte auszuschließen, wurde ein Klon jeder Gruppe jeweils in TK3-US/SH3 enthaltende und zusätzlich in TK3-SH3 enthaltende Y190-Zellen (re-) transformiert und die Selektionen wiederholt. In allen Fällen verlief sowohl die Selektion auf Histidin-Synthese als auch der β -Galaktosidase-Assay positiv (Bsp., s. Abb. 3-14). Damit ist auch gezeigt, dass alle als positiv ermittelten Expressionsprodukte, mit beiden *bait*-Konstrukten - also unabhängig von An- oder Abwesenheit der *unique-site* - interagieren.

Als nächstes wurde überprüft, ob diese Protein-Protein-Interaktionen (unter den Bedingungen des Matchmaker II Systems) als spezifisch bezeichnet werden können. Dazu wurden die putativ positiven Bank-Plasmide zusammen mit dem Plasmid pLAM5⁷, das einen Teil der kodierenden Sequenz des humanen Lamin C-Gens enthält, in Y190-Hefezellen co-transformiert. Die Selektion auf SD-Trp⁻/Leu⁻/His⁻-Agarplatten zeigte (im Gegensatz zur Selektion auf SD-Trp⁻/Leu⁻-Agarplatten) kein Wachstum von Kolonien, so dass die jeweiligen Bank-Plasmide nicht an Lamin C binden, die Interaktion mit TK3-US/SH3 bzw. TK3-SH3 also als spezifisch gelten muß (Bsp., s. Abb. 3-14).

SH3-Domänen binden an Prolin-reiche Motive des Interaktionspartners. Das Grundmotiv ist üblicherweise PxxP, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht (Kay *et al.*, 2000; Mayer, 2001). Es gibt allerdings auch Ausnahmen (z.B. PxxDY), die von dem Grundmotiv abweichen. Als Konsensus-Sequenzen, an die SH3-Domänen von Src-TKs binden, gelten die Motive RPLPPLP (Klasse I) und ϕ PPLPxR (Klasse 2, ϕ steht für eine hydrophobe AS), jedoch wird die Bindung auch durch die flankierenden Sequenzen beeinflusst. Da jedoch zahlreiche Abweichungen von diesen Motiven bekannt sind, werden diese auf die Konsensus-Sequenzen +xxPxxP (Klasse I-Motiv) und PxxPx+ (Klasse II-Motiv) reduziert (+ steht für eine positiv geladene AS: R, K oder H).⁸ Dementsprechend wurden die von den positiven Klonen abgeleiteten Aminosäuresequenzen nach Prolin-reichen Motiven durchsucht. Für den Fall, dass weder ein Klasse I- noch ein Klasse II und auch kein PxxP-Motiv in der Sequenz existiert, sind Sequenzen angegeben, die dem Grundmotiv am nächsten kommen. Die Gruppen G4, G6, G7 und G8 enthalten

⁷ Das Shuttleplasmid pLAM5⁷ trägt das TRP1-Gen als Transformationsmarker.

⁸ Hierbei ist zu beachten, dass die zugrunde liegenden Studien hauptsächlich an TKs von Vertebraten durchgeführt worden sind.

längere Prolin-reiche Domänen, die aus zahlreichen Prolin-reichen Motiven bestehen. Die Gruppen G2, G3, G12 (Abi-GP) und G16 (Vinculin) besitzen Klasse I-Motive. Die Gruppe G14 (SF1) weist zumindest das Grundmotiv auf. Die Aminosäuresequenz von G15 verfügt über kein Prolin-reiches Motiv (s. Tabelle 3-1).

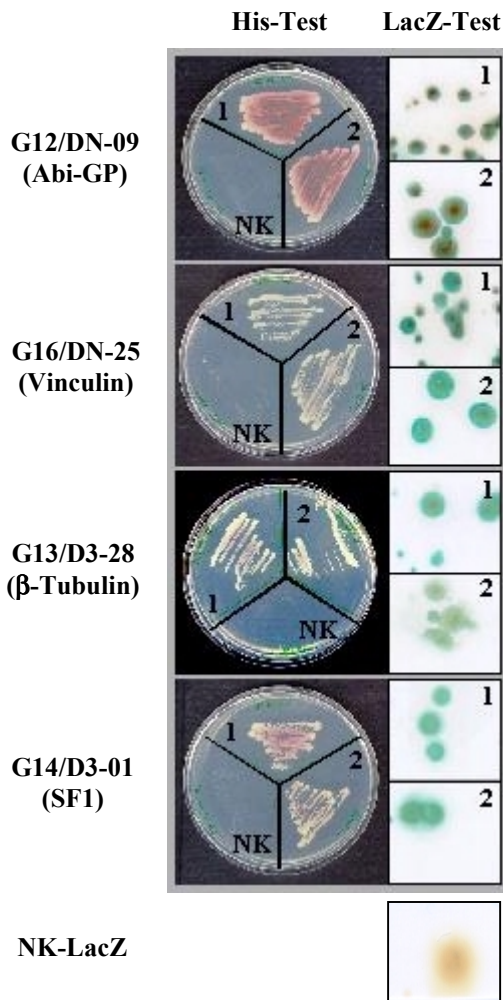


Abb. 3-14. Nachweis der Interaktion von Expressionsprodukten positiver Klone mit den *bait*-Konstrukten. Dargestellt sind für vier Klone jeweils die Selektion auf SD-Trp⁻/Leu⁻/His⁻-Agarplatten (7 d Inkubation, links) und der β-Galaktosidase-Filterassay (7 h Inkubation, rechts). Getestet wurden jeweils die Interaktionen mit den Konstrukten TK3-US/SH3 (1), TK3-SH3 (2) und Lamin C (NK, Negativkontrolle). Eine erfolgreiche HIS3- Selektion ist am deutlichen Wachstum von Hefezellen, ein positiver LacZ-Test an einer Blaufärbung der Hefekolonien zu erkennen. Die Negativkontrolle beim β-Galaktosidase-Assay besteht aus Hefekolonien, die ausschließlich TK3-US/SH3 beinhalten (NK-LacZ).

Protein-Protein-Interaktionen, die über das Yeast-Two-Hybrid-System ermittelt werden, sind nicht notwendiger Weise *in vivo* von Relevanz. Hinzu kommt, dass bei diesem Ansatz Interaktionen zwischen einer Tyrosinkinase aus *Schistosoma* und Proteinen aus *Drosophila* nachgewiesen worden sind („heterologe Interaktionen“). Daher sind vor allem solche Bindungspartner von Interesse, für die (oder für deren Homologe) bereits eine Wechselwirkung mit Src-TKs beschrieben worden ist. Das Aktin-bindende Protein Vinculin ist ebenso wie Tubulin als Substrat von Src-TKs bekannt (Sefton *et al.*, 1981; Mattan *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 2002). Des weiteren sind auch Interaktionen von SH3-Domänen mit den Signalmolekülen Abi1 und Abi2 bereits nachgewiesen worden (Dai & Pendergast, 1995). Ebenso ist beschrieben, dass diverse Spleißfaktoren, die sich als Shuttleproteine sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma aufhalten, durch Tyrosinkinasen reguliert werden. Daher sind die Interaktionen mit den Klonen der Gruppen G12, G13, G14 und vor allem G16 von bevorzugtem Interesse (siehe Tab. 3-1).

3.3.3.3. Die Qualität der ermittelten Interaktionen und der Einfluss der SmTK3-*unique-site* auf die Bindungsstärke

Um die Qualität der Interaktionen und den Einfluss der *unique-site* auf die Bindungsstärke zu ermitteln, wurden β -Galaktosidase-Assays in Flüssigkultur mit 2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) als Substrat durchgeführt. Eingesetzt wurden Y190-Hefezellen, die ein *bait*- und ein Bank-Plasmid enthielten. Als Positivkontrolle wurden pCL1-transformierte⁹ Hefezellen, für die Negativkontrolle TK3-US/SH3 transformierte Hefen verwendet. Abbildung 3-15 zeigt, dass die Interaktionen der TK3-Konstrukte mit den (partiellen) Expressionsprodukten von Abi-GP (G12/DN-09) und Vinculin (G16/DN-25) deutlich stärker sind, als mit SF1 (G13/D3-28) und β -Tubulin (G14/D3-01). Es ist jedoch zu beachten, dass auch die beiden letzteren Interaktionen signifikant sind, was durch den Vergleich mit der Negativkontrolle deutlich wird. Aus diesem Versuch geht außerdem hervor, dass die *unique-site* von SmTK3 die Bindungsstärken zu den jeweiligen Expressionsprodukten beeinflusst. Die Bindungsstärke wird bei Abi-GP, SF1 und β -Tubulin durch die *unique-site* um das 2 bis 3-fache erhöht, bei Vinculin um knapp die Hälfte reduziert.

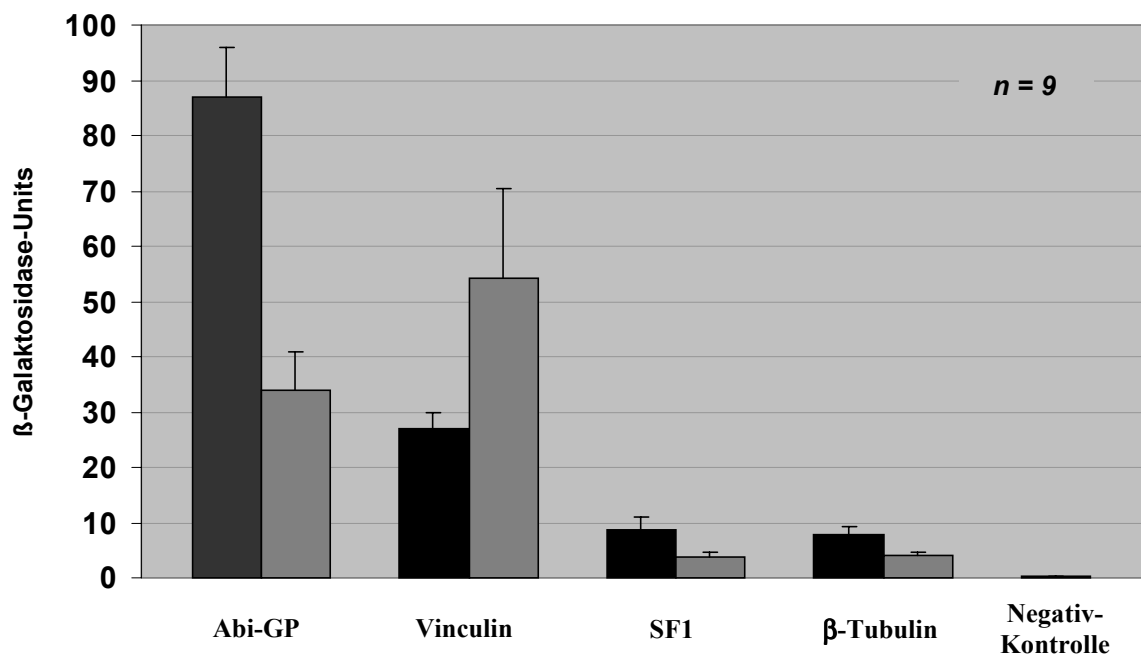


Abb. 3-15. Quantifizierung der Bindungsstärken von Protein-Protein-Interaktionen durch β -Galaktosidase-Assays in Flüssigkultur. Die eingesetzten Y190-Hefekone enthalten neben den *bait*-Konstrukten TK3-US/SH3 (schwarze Säulen) oder TK3-SH3 (graue Säulen) die in der Abszisse angegebenen Bank-Plasmide. n gibt die Anzahl der individuellen Experimente an. Standardabweichungen sind eingetragen.

⁹ Das Shuttleplasmid pCL1 kodiert für den vollständigen GAL4-Transkriptionsfaktor.

3.3.4. Die Konstruktion einer *Schistosoma*-Yeast-Two-Hybrid-Bank

Die *Schistosoma*-Bank wurde in Kollaboration mit J. Vicogne und Dr. C. Dissous vom „Institute de Pasteur“ in Lille (Frankreich) nach dem Protokoll des Matchmaker III-Systems erstellt. Als Startmaterial dienten jeweils 1.2 µg poly(A⁺)-RNA aus adulten Schistosomen für zwei getrennte Ansätze (Sm1, Sm2). Als Kontrolle wurde parallel ein weiterer Ansatz mit 1.0 µg poly(A⁺)-RNA aus der humanen Plazenta durchgeführt (HuPl). Für die Erststrangsynthese wurde jeweils der Oligo(dT)-Primer eingesetzt. Anschließend wurden die cDNA-Erststränge nach einer *tailing*-Reaktion durch eine *long-distance*-PCR (LD-PCR) amplifiziert und jeweils ein Aliquot zur Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt. Die heterogenen Amplicons deckten einen Größenbereich von ca. 50 bp bis mehr als 4 kB (Sm1, Sm2) bzw. mehr als 10 kB (HuPl) ab (Abb. 3-16) und entsprechen damit den Anforderungen für die Konstruktion einer qualitativ hochwertigen Bank. Aus den Ansätzen Sm1 und Sm2 wurden Fragmente bis zu 500 bp Größe (*cut-off*) durch Säulenchromatographie entfernt. Mit der HuPl-Kontrolle wurde hingegen nicht weitergearbeitet.

Anschließend wurden je 10 µl aus beiden Ansätzen simultan mit dem linearisierten Vektor pGADT7-Rec¹ in den Hefestamm AH109² transformiert. Die Effizienz der Transformation lag mit 9×10^6 cfu / 3 µg Vektor um das neunfache über dem angegebenen Mindestwert. Daraus errechnet sich die Zahl der unabhängigen Klone: ca. 9×10^8 . Anzumerken ist, dass bei der Erstellung der Bank die cDNA Sequenzen zwar gerichtet aber zufällig in die drei Leseraster kloniert werden, und somit eine Wahrscheinlichkeit von 1:3 besteht, dass die Sequenz auch exprimiert wird. Aber unter Berücksichtigung, dass für das *Schistosoma*-Genom eine Zahl von bis zu 2×10^5 Genen postuliert wird (Johnston *et al.*, 1999), kann davon ausgegangen werden, dass die Bank Teilbereiche nahezu aller Gene repräsentiert. Anschließend wurden sämtliche Hefekolonien in einer Suspension vereinigt, davon Aliquots erstellt und eingefroren. Die Titerbestimmung ergab 1.2×10^9 Zellen/ml (Stand: 7/2001) und liegt damit ca. 100-fach über dem Mindestwert, der für ein Screening notwendig ist.

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertgröße wurde die Plasmid-DNA aus 24 Hefeklonen isoliert und einer Restriktionsanalyse mit *Eco*RI und *Xho*I unterzogen. Alle untersuchten Klone enthielten je ein Insert von mindestens 500 bp Größe, gut 25% aller klonierten Fragmente waren größer als 1.5 kB. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt ca. 1.2 kB und liegt damit in einer brauchbaren Größenordnung.

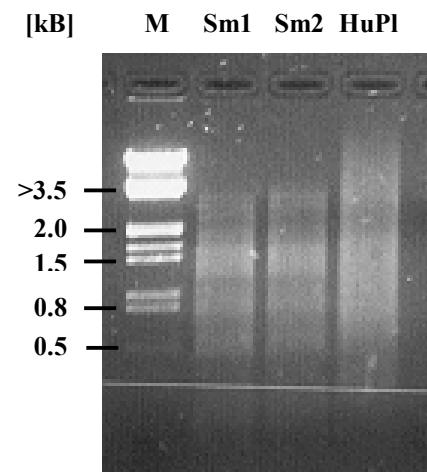


Abb. 3-16. Resultat der LD-PCR. Von jedem (100 µl-) Ansatz wurden 7 µl auf einem 1.2%igen EtBr/Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. M: Marker.

¹ Der Shuttlevektor pGADT7 trägt das LEU2-Gen als Transformationsmarker.

² Der Stamm AH109 beinhaltet die Reportergene HIS3, ADE2 und LacZ und ist defizient für die Aminosäuren Trp, Leu und Ura.

3.3.5. Screening der *Schistosoma*-Bank mit dem Konstrukt TK3-US/SH3

Das Screening der *Drosophila*-Bank hatte gezeigt, dass mit dem Konstrukt TK3-US/SH3 eine größere Anzahl verschiedener Klone als putative Interaktionspartner ermittelt werden konnten als mit TK3-SH3. Durch die quantitative Analyse der Bindungsstärken konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Interaktionen mit TK3-US/SH3 in mehreren Fällen deutlich stärker ist als mit TK3-SH3, unabhängig davon, aus welchem der beiden Screening-Experimente der jeweilige positive Klon erhalten worden ist. Letztendlich entspricht die Anwesenheit der *unique-site* im *bait*-Konstrukt eher dem Zustand *in vivo*, als wenn die Region fehlt. Aus diesen Gründen wurde das Screening der *Schistosoma*-Bank nach einem Substrat für SmTK3 ausschließlich mit TK3-US/SH3 nach dem Matchmaker III-Protokoll durchgeführt.

Dazu wurde zunächst das *bait*-Konstrukt in den Hefestamm Y187 und anschließend mittels *yeast mating* in die AH109-Hefezellen der *Schistosoma*-Bank transformiert. Bei dem Screening wurde eine Mating-Effizienz von 7.6% erreicht, die deutlich über dem geforderten Minimum von 2% liegt. Die Zahl der durchsuchten Klone betrug ca. 2.5×10^6 . Auch bei dieser Zahl muß berücksichtigt werden, dass im statistischen Mittel nur $\frac{1}{3}$ der Klone exprimiert wird, so dass effektiv ca. 8.3×10^5 Expressionsprodukte auf eine mögliche Interaktion mit SmTK3 geprüft worden sind. Die Selektion auf Interaktionen erfolgte zunächst auf SD-Trp⁻/Leu⁻/His⁻/Ade⁻-Agarplatten (ohne Zugabe von 3-AT) und anschließendem β -Galaktosidase-Filterassay. Nach Wiederholung beider Selektionen konnten 43 Klone als positiv für eine Interaktion mit dem *bait*-Konstrukt ermittelt werden.

3.3.5.1. Identifizierung der positiven Klone und Verifizierung der Interaktionen

Die Bank-Plasmide wurden zunächst aus den positiven Hefekolonien isoliert. Anschließend folgte die Bestimmung der Insertgrößen durch eine Restriktionsanalyse (*EcoRI/XhoI*). 39 Klone wurden (an-) sequenziert und die ermittelten Sequenzen daraufhin einem Datenbankvergleich mittels der Programme Blast X und Blast N unterzogen. Klone, deren abgeleitete Aminosäuresequenz signifikante Homologien³ zu gleichen Proteinen aufzeigten, wurden in Gruppen (G) zusammengefasst. Positive Klone, die nicht ansequenziert worden waren, konnten durch Restriktionsanalyse mit *DraI* den entsprechenden Gruppen zugeordnet werden. Tabelle 3-2 fasst die Ergebnisse zusammen.

Die Gruppe A beinhaltet die größte Anzahl an Klonen. Der Klon S017 repräsentiert mit ca. 1.5 kB das größte Insert. 629 bp dieses Inserts wurden vom 5'-Ende aus sequenziert, dabei konnte ein ORF im Leseraster 2 bestimmt werden, zudem sich jedoch keine signifikanten Homologien zu Proteinen oder Domänen aus den Datenbanken ermitteln ließen. Da sich die Sequenzinformationen der Klone mit größeren Inserts und derjenigen mit kleineren Inserts überlappten, wurden diese zu einer knapp 1.0 kB großen Sequenz vereinigt. Mit dieser Sequenz konnte eine schwache Homologie zu der Serin/Threoninkinase PTK1 aus Hefe (AcNr.: D63851) ermittelt werden, die jedoch nicht signifikant war.

³ E-value < 0.01

Klon-gruppe	Homologie (Accession number)	E-Value	Klone	Insert-Größe (bp)	sequenziert (bp)
A	k. s. H.	---	S017	1.400	629
			S023	1.100	678
			S026	1.100	628
			S030	1.050	540
			S047	1.300	636
			S076	1.200	656
			S090	1.200	701
			S108	1.400	627
			S130	1.200	RS
			S142	1.100	RS
			S277	1.100	RS
			S281	1.100	723
			S308	1.200	619
			S329	1.200	630
			S378	1.100	RS
			S445	1.100	742
S448	1.100	740			
S455	1.100	662			
S456	1.100	519			
B	Diaphanous homolog 3; [<i>Mus musculus</i>] (NP_062644)	e-112	S010	2.000 (1.945)	684
			S141	2.400 (2.326)	662
			S283	2.425	vollständig
			S340	2.600 (2.485)	582
			S428	2.100 (2.013)	779
			S433	1.300 (1.309)	488
			S439	2.719	vollständig
			S440	1.950 (1.865)	672
C	Translations-Initiationsfaktor eIF-4 γ 2 [<i>Homo sapiens</i>] (S49172)	2e-12	S009	2.700	674
			S037	2.800	451
			S096	900	859
			S129	1.400	745
			S279	1.400	674
D	60 kD Untereinheit vom SWI/SNF-Komplex [<i>Mus musculus</i>] (AAH26783)	3e-52	S052	1.400	545
			S138	1.400	674
E	k. s. H.	---	S114	1.200	458
			S288	1.100	529
F	YME1-Homolog / ATP-abhängige Metalloprotease [<i>Schistosoma mansoni</i>] (P46508)	2e-83	S139	1.200	657
G	k. s. H.	---	S011	1.700	693
H	k. s. H.	---	S021	2.400	458
I	mRNA (Guanin-7)-Methyltransferase [<i>Homo sapiens</i>] (NP_003790)	2e-19	S039	1.150	671
J	Nikotinat-Nukleotid-Pyrophosphorylase [<i>Neurospora crassa</i>] (CAB97281)	1e-14	S083	1.700	636
K	Verprolin [Yeast] (S51342)	1e-08	S085	2.000	646
	Myosin I-Heavy-chain-Kinase [<i>Dictyostelium discoideum</i>] (AAC71063)	2e-06			
L	k. s. H.	---	S301	1.350	551

Tab. 3-2. Zusammenfassung der positiven Klone aus dem Screening der *Schistosoma*-Bank mit dem Konstrukt TK3-US/SH3. *Homologie*: Aufgelistet sind Proteine mit dem höchsten Verwandtschaftsgrad (signifikante Homologie: $E < 0.01$) zur abgeleiteten Aminosäuresequenz der jeweiligen positiven Klone (BLAST). *Insert-Größe*: ungefähre Größe der klonierten Inserts; in Klammern: postulierte Größe der DRF-homologen Inserts anhand der SmDRF-V Sequenz. *sequenziert*: sequenzierter Bereich des Inserts (vom 5'-Ende aus). k. s. H.: keine signifikante Homologie zu Proteinen aus den durchsuchten Datenbanken; RS: Zugehörigkeit zur entsprechenden Gruppe wurde durch Restriktionsanalyse ermittelt.

Die Gruppe B repräsentiert acht Klone, die größte Insert-Sequenz umfasst gut 2.7 kB (Klon S439). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen weisen eine hohe Ähnlichkeit zum *Diaphanous*-Protein (DRF⁴) von *Drosophila* auf, dass in die Aktin-Zytoskelett-Organisation involviert ist. Da mit homologen Molekülen aus der Maus (DRF1 und DRF2) bereits eine Interaktion mit einer Src-Tyrosinkinase nachgewiesen werden konnte (Tominaga *et al.*, 2000), wurde den Mitgliedern der Klongruppe B die höchste Priorität aller delektierten putativen Bindungspartner

⁴ Diaphanous-related Formin

zugeteilt. Die Charakterisierung einiger SmDRF-Klone ist in den folgenden Kapiteln dokumentiert.

Die Gruppe C umfasst fünf Klone. Die jeweiligen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen signifikante Homologie zum Translations-Initiationsfaktor eIF-4 γ 2 von Vertebraten. Die Gruppen D und E beinhalten jeweils zwei Klone. Für die Vertreter der Gruppe D wurde eine hohe Ähnlichkeit zur 60 kD-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes von Maus und Mensch festgestellt. Dieser Komplex reguliert die Genexpression durch Modifikation der Chromatinstruktur. Für die Klone der Gruppe E konnten keine Gene mit hoher Ähnlichkeit bestimmt werden. Schließlich wurden noch fünf weitere Klone als Bindungspartner für das *bait*-Konstrukt ermittelt, die in keinem Zusammenhang zueinander oder zu den Gruppen A-E stehen: In drei Fällen konnten zwar ORFs aber keine signifikanten Homologien ermittelt werden. Die verbleibenden Klone zeigen Ähnlichkeiten zu diversen Enzymen bzw. zu Verprolin (Tabelle 3-2).

Um artifizielle Interaktionen auszuschließen (s. Kap. 3.3.3.2), wurden nacheinander mindestens ein Klon jeder Gruppe⁵ zusammen mit dem *bait*-Konstrukt (TK3-US/SH3) bzw. mit dem Konstrukt TK3-SH3 in AH109-Hefezellen co-transformiert. In allen Fällen wuchsen die Hefekolonien unter Selektionsbedingungen auf SD-Trp⁻/Leu⁻/His⁻/Ade⁻-Agarplatten und zeigten Blaufärbung beim β -Galaktosidase-Assay. Die anschließende Co-Transformation der gleichen Bank-Plasmide jeweils zusammen mit dem pLAM5'-Plasmid (s. Kap. 2.1.11 u. 3.3.3.2) in AH109-Zellen führte unter gleichen Selektionsbedingungen nicht zu einem Wachstum von Kolonien. Damit können die ermittelten Interaktionen unter den Bedingungen der Matchmaker III-Systems als spezifisch bezeichnet werden (Bsp., s. Abb. 3-17).

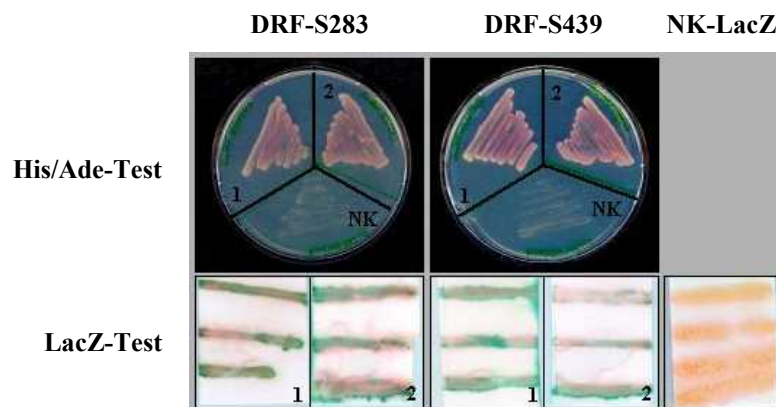


Abb. 3-17. Nachweis der Interaktionen von Expressionsprodukten zweier DRF-Klone mit den *bait*-Konstrukten. Getestet wurden jeweils die Interaktionen der Klone S283 und S439 mit den Konstrukten TK3-US/SH3 (1), TK3-SH3 (2) und Lamin C (NK, Negativkontrolle). Dargestellt sind jeweils die Selektionen auf SD-Trp⁻/Leu⁻/His⁻/Ade⁻-Agarplatten (5 d Inkubation, oben) und der β -Galaktosidase-Filterassay (4 h Inkubation, unten). Die Negativkontrolle beim β -Galaktosidase-Assay besteht aus Hefekolonien, die ausschließlich TK3-US/SH3 enthalten (NK-LacZ).

⁵ Die im diesem Abschnitt beschriebenen Versuche wurden jeweils mit dem Klon einer Gruppe durchgeführt, der das längste Insert beinhaltet (bei Gruppe B zusätzlich mit Klon S283).

3.3.6. Ein *Schistosoma*-Homolog zum Diaphanous-Protein (SmDRF) als putativer Bindungspartner von SmTK3 - die Klongruppe B

3.3.6.1. Die Qualität der SmTK3/SmDRF-Interaktion und der Einfluss der *unique-site* auf die Bindungsstärke

Die Qualität der SmTK3-SmDRF-Interaktion und der Einfluss der *unique-site* auf die Bindungsstärke sollten durch β -Galaktosidase-Assays in Flüssigkultur bestimmt werden. Dazu wurden AH109-Hefezellen verwendet, die S283- und TK3-US/SH3- bzw. TK3-SH3-Plasmid-DNA enthielten. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit dem *bait*-Plasmid transformiert waren. Es zeigte sich, dass die Interaktion zwischen dem Expressionsprodukt von S283 und dem TK3-US/SH3-Fusionsprotein qualitativ hochwertig ist (knapp 100 Units) und damit zumindest in der Hefe „echt“ zu sein scheint. Es stellte sich auch heraus, dass die *unique-site* einen deutlichen Einfluß auf die Bindungsstärke hat. Die Qualität der Interaktion wird um gut 30% reduziert, wenn nur die isolierte SH3-Domäne als *bait* eingesetzt wird (Abb. 3-18).

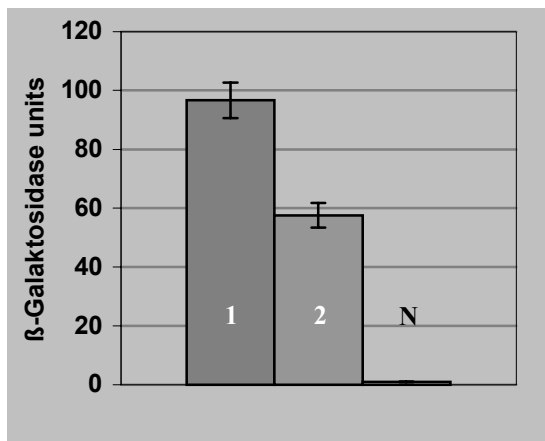


Abb. 3-18. Der β -Galaktosidase-Assay demonstriert die Bindungsstärken der Protein-Protein-Interaktionen zwischen DRF-S283 und den SmTK3-*bait*-Proteinen. Die eingesetzten AH101-Hefekone enthalten neben den *bait*-Konstrukten TK3-US/SH3 (1) oder TK3-SH3 (2) das Bank-Plasmid S283. N: Negativkontrolle. Jeder Assay wurde dreimal durchgeführt; Standardabweichungen sind angegeben.

3.3.6.2. Die kodierende Nukleinsäuresequenz von SmDRF (Sm-DRF-V)

Die Klongruppe B umfasst acht Klone mit Insertgrößen von 1.1 kB bis 2.7 kB, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen alle eine signifikante Homologie zu den Diaphanous-Proteinen von *Drosophila*, Maus und Mensch aufweisen (Tab. 3-2).

Durch vollständige Sequenzierung konnte für den Klon S283 ein offenes Leseraster (ORF_{S283}: 2208 Nt/736 AS) ermittelt werden. Datenbankanalysen und ein fehlendes Startmethionin zeigen, dass der 5'-Bereich unvollständig ist. Durch die Sequenzierung des längsten Klons - S439 - konnten zwar zusätzliche 291 Nt im 5'-Bereich ermittelt werden, die cDNA-Sequenz ist jedoch noch immer nicht komplett (s. u.). Die Klone S283 und S439 sind mit einer Ausnahme im überlappenden Bereich identisch in der Nukleinsäuresequenz: An Position 2183 sind in Klon S439 zwei zusätzliche Adenine vorhanden (Abb. 3-19), wodurch das ORF (ORF_{S439}: 2184 Nt/728 AS) im Vergleich zum ORF_{S283} vorzeitig abgebrochen wird. Das führt in der abgeleiteten Aminosäuresequenz zum Verlust einiger konservierter Bereiche im C-Terminus. Daher wurde

die vorläufige, unvollständige Nukleinsäuresequenz für SmDRF aus den Klonen S439 und S283 zusammengesetzt (2717 Nt) und als SmDRF-V bezeichnet (Abb. 3-19). Es ergibt sich ein ORF (ORF_{SmDRF-V}) von 2499 Nt/833 AS.

```

1  GGACTAACATTTAGTGC GGAAC TTAATGGGACACCAGACGAACGCTTCATGCCTTTAGTT
   G L T F S A E L N G T P D E R F M P L V      20
61  AAAGCCCTGGATTGTCCTGAAGTTGCGCGGGCTTCGTTGCAGTTTATTAATGTTCTAGTG
   K A L D C P E V A R A S L Q F I N V L V      40
121 AACC GCAGTTGTCTTGATGAGAGCTCTTTTCGATATTGACTACAGGGTGCATTTACGGTGT
   N R S C L D E S S F D I D Y R V H L R C      60
181  GAGTTTAAATAGTTTAGGAATTATTGAAAAGCTTAAACAAACTTGAAAATTCATTGGACGCT
   E F N S L G I I E K L N K L E N S L D A      80
241  GACATTCAAAATCACATAACAATCTACCGTTCTAGAGCTGATCAGGACTTGGACGATGTT
   D I Q N H I T I Y R S R A D Q D L D D V      100
301  TTTGAGCGACTAGATT CAGTCAAATGTGATCTCGATGATGCTAACCAGATTTTCCACATT
   F E R L D S V K C D L D D A N Q I F H I      120
361  CTCATCGTACTATTATGGGGAGCAAATCAGAGAAGCATTCTGTCAATACTACAGCAT
   L H R T I M G S K S E K H F L S I L Q H      140
421  TTTCTTTTCATTTCGTGATGAGCCTTATAGATTAGCTTACTTTACTCTTCTGGAAGAACTG
   F L F I R D E P Y R L A Y F T L L E E L      160
481  ATTGGTCAAGTTATGATTCAGAATGATGGTGTGATCCTGATCCGCATATGAACATTCTG
   I G Q V M I Q N D G V D P D P H M N I L      180
541  CGCCTGGATGTTGAGAGTACTGTGCGATTATTGGTAGATGCACTAAAGGAAGCTGACGCT
   R L D V E S T V A L L V D A L K E A D A      200
601  TCAACTCGTGTTGAGGAGCTTCAAGCTAAGTTAGATGCCGCTCTTCAAGCTAAATTAGAG
   S T R V E E L Q A K L D A A L Q A K L E      220
661  GCAGAAGCCAAAGTGCAAACATTACAAAGTCATTTGAGTTCCGGGAGACAGGCTACAATA
   A E A K V Q T L Q S H L S S G D R S T I      240
721  AAGCTTACTCCTGATATCTTACCTCCACCTTCGTTAAGTTCAAGTATAACCACCACCTCCA
   K L T P D I L P P P S L S S S I P P P P      260
781  GGCATTCCCTCCACCACCCTATGGAGGGTGTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCGCCACCA
   G I P P P P P M E G V P P P P P P P P P      280
841  CCACCACCACCACCCATGGGAGGTATTCCGCCACCACCACCGCCCATGGGAAGTATCCCG
   P P P P P M G G I P P P P P P P M G S I P      300
901  CCACCACCACCGCCCATGGGAGGTGTTCCGCCACCTCCGCCGGGTTTCCAGTCATCTAAA
   P P P P P M G G V P P P P P P G F Q S S K      320
961  CCTCCGGACGAACTTCTTTTGGTATGAAACCAAAAAAGAAATACACTTTGGATGTCCCT
   P P D E L P F G M K P K K K Y T L D V P      340
1021 ATGAAAAAGGCCAATTGGGAAAAAATTAAGCCAATATGCTTGATAAAGACTCTGTCTGG
   M K K A N W E K I K P N M L D K D S V W      360
1081 GTCCAAC TTCATGAGGATGAGCTTGAGTATGGGGATTTGTTGAAAAATCTTAGTGCTCAA
   V Q L H E D E L E Y G D L L K N L S A Q      380
1141 TTTAGCACAAGCCAGCTAAGGTGATGGTGTCTGATTCTACATCAGATGGCGCAGCTGCA
   F S T K P A K V M V S D S T S D G A A A      400
1201 GCTGGA AATCTACAAGGTATTCAATCTCGTAAGACGAAAAAGCTGAGGTATTTGGACGAC
   A G N L Q G I Q S R K T K K L R Y L D D      420
1261 AAAGTGGCTCAA AATCTGTGCGATTCTTCTTGGTTCACTTAAAGTGCCATATGATGAGCTT
   K V A Q N L S I L L G S L K V P Y D E L      440
1321 CGTCGGCGTATCCTAACTGTTGATGAAAGCTTATTAAC TCCAAATATGTTAGAGCAGCTG
   R R R I L T V D E S L L T P N M L E Q L      460
1381 GTTAAAGCCCTCCCAGAACCATCAGTTATTTCAAAGATCAGTTC ACTTAAAGATGAATAT
   V K A L P E P S V I S K I S S L K D E Y      480
1441 GAGGCACTAGCGGAACCTGAACAATTTGTGTGCAAAGTTAGTGATATTAAGAAACTCATA
   E A L A E P E Q F V C K V S D I K K L I      500
1501 CCTAGACTAAATTCAATCCTATTTAAAATGAAATTTAATGAAAAACTTAGTGAAAGTAAAG
   P R L N S I L F K M K F N E K L S E V K      520
1561 CCTGAGATAGTTGACGTAGACGAAGCGTTGCAGGAAATACATTT CAGCAAACACTTCAA
   P E I V D V D E A L Q E I H F S K H F K      540

```


1621	CGTATCTTAGAGTTGGTCTCTGCTATTAGGCAATTATATGAACGCGGGTTCAGGAATGCA	
	R I L E L V L L L G N Y M N A G S R N A	560
1681	GAGGCGATTGGATTTGAAATTAGTTTTCTAACCAAGCTAGAGGCGACAAAAGATGTCTCC	
	E A I G F E I S F L T K L E A T K D V S	580
1741	AATTCTCAGACGTTACTTCATTTTTTGATTGGCTCTCTTGATCGAAAATCCCAGAAACT	
	N S Q T L L H F L I G S L D R K F P E T	600
1801	GTAAAGGGTTTCTGGATGATTTCTCGCATGTTGAACGAGCTTGCCGTGTCTCTGAGGAT	
	V K G F L D D F S H V E R A C R V S E D	620
1861	AGTCTAAAAGCCAACATTGCAGAAATGAAGAAGTCCGTTTCCAATATTGATACAGACTTA	
	S L K A N I A E M K K S V S N I D T D L	640
1921	AAGACATACAAAGCTCAAGAACCTAATGACAATTATATTCCTGTAATGCAAGATTTCTTT	
	K T Y K A Q E P N D N Y I P V M Q D F L	660
1981	GTATCCGCTAAAGAACAGTTGTACAGCTAGAAATGATGCATAAACGAATGCAG GATAAA	
	V S A K E Q L S Q L E M M H K R M Q D K	680
2041	TTTGTGACAGTTTCTAAATACTTGGCATTGACCCCAACAATACCATATGGAGAATTTA	
	F V T V S K Y L A F D P N K Y H M E N L	700
2101	TTTTCTGATTTGAAAGACTTCCATGTTGCCTTTAAACGTTCTGCTTCTGACCTGGCGAAA	
	F S D L K D F H V A F K R S A S D L A K	720
2161	AAGCATGCATTGGAAGAAAAAATGAAAAAGGCACGGGACGAGCAAGCACGCCGTGACGCT	
	K H A L E E K M K K A R D E Q A R R Q R	740
2221	GAACGTGAGGATAAAGCTATTCTGAATAGCTCAGGACCCAGGGCACCTACAGAGGAAGAG	
	E R E D K A I L N S S G P R A P T E E E	760
2281	GGAAATGTCATTGATAATTTAATGGAGGCCCTAAAGTCTGGTGCTGCTTTCGCTAATAGA	
	G N V I D N L M E A L K S G A A F A N R	780
2341	GGTGAAAGGTGAGCCGTTAGGCGTAATCGAAATCGTGTGAGCCAGCCGCTGCTAATCTC	
	G E R S A V R R N R N R V S P A A A N L	800
2401	GCATCAGTTGCCTCACCATCGGCCATTTCGACAAAGACAGTTAATGCGCGCCAGATCTCGT	
	A S V A S P S A I R Q R Q L M R A R S R	820
2461	AATTATGGTGACTTACCTCGTTCAGTTGTGATGATGATGAAGTTCCCAACTCCTTTTT	
	N Y G D L P R S V V D V A -	833
2521	ACTCCTCTTCAAAGTTTACTTCTAAAGCGCCTTGGACGTCATCTTAAAGAACTTTTCGAA	
2581	AGTGTGTTGATAAATGATTTCTAACTGGTCAGATTCAGACTTGTATCTTTTTCATTTTCTT	
2641	ATTTGTACAGTCTTTTCATAAATTTTCATACATAAACTTATGTAAATTTGTAATAAAAAAA	
2701	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

Abb. 3-19. cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von SmDRF-V. Am linken Rand ist die Nukleinsäuresequenz, am rechten Rand die Proteinsequenz fortlaufend nummeriert. Die Domänen (**FH1**, **FH2**, **FH3**, **CID** und **DAD**) sind farbig dargestellt. Verschiedenartige Unterstreichungen heben bestimmte Abschnitte hervor. Punktiert: die Bereiche, um welche die FH1-Domäne nach MotifScan spezifisch bei SmDRF-V im Widerspruch zum Alignment (Abb. 3-20) erweitert ist (siehe Text); wellenförmig: Coiled-Coil-Regionen; unterbrochen: zusätzliche Sequenzinformation von Klon S439 im 5'-Bereich; durchgezogen: putative Poly(A)-Signale der SmDRF-V-Sequenz. Die Nukleinsäuresequenz von Klon S433 ist grau unterlegt. Ein putatives Poly(A)-Signal eines verkürzten Transkriptes, abgeleitet von S433, ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die Position, an der Klon S439 im Vergleich mit S283 über zwei zusätzliche Adenine verfügt, ist violett markiert und doppelt unterstrichen. Putative Startmethionine für ein verkürztes Protein sind durch Fettdruck markiert.

An Position 49 der Nukleinsäuresequenz von SmDRF-V befindet sich ein ATG. Jedoch zeigten die Datenbankanalysen mit Blast X, dass dieses ATG sehr wahrscheinlich nicht für das Startmethionin von SmDRF kodiert. Die Vergleiche mit anderen Diaphanous-Proteinen ergaben, dass in der abgeleiteten Aminosäuresequenz N-terminal noch mindestens 250 Aminosäuren fehlen (s.u.). An Position 2501 befindet sich ein Stopp-Codon. Die 3'-UTR umfasst 216 bp und beinhaltet zwei putative Poly(A)-Signale an den Positionen 2657 und 2670, die leicht von den Konsensus-Sequenzen (AATAAA, ATTAATA) abweichen. In einer zu erwartenden Entfernung von 20 bis 30 bp hinter dem Poly(A)-Signal beginnt der Poly(A)-Tail (27 bp; Abb. 3-19).

3.3.6.3. Die Aminosäuresequenz von SmDRF-V: Homologien und konservierte Domänen

Bei einem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Proteinen aus diversen Datenbanken mittels BlastP zeigte sich, dass SmDRF-V über die gesamte Sequenz die höchste Ähnlichkeit zum Diaphanous-Homolog 3 (DRF3) der Maus aufweist. Ohne *low complexity filter*⁶ wurden 33% identische und 55% ähnliche Aminosäuren zwischen den beiden Sequenzen festgestellt. Ein Alignment mit diversen Diaphanous-Proteinen ist in Abbildung 3-20 dargestellt.

Mit verschiedenen Programmen (u.a. SMART, BlastX) und durch manuelle Alignments wurde die abgeleitete Aminosäuresequenz von SmDRF-V nach konservierten Domänen und Motiven durchsucht. Anschließend wurde das partielle Protein mit den DRF-Proteinen aus Mensch, Maus und *Drosophila* verglichen, die am nächsten mit SmDRF verwandt sind. Es zeigt sich, dass SmDRF über einige funktionale Domänen verfügt, die charakteristisch für Diaphanous-Proteine sind: Eine Prolin-reiche FH1- (*formin homology 1*) Domäne, die als Protein-Bindedomäne bekannt ist und eine FH2-Domäne mit noch ungeklärter Funktion (Krebs *et al.*, 2001). Für beide FH-Domänen unterscheiden sich die Resultate der manuellen Auswertung des Alignments nach Krebs *et al.* (2001) und die der Analyse durch geeignete Software jeweils in Bezug auf ihre Größen bei SmDRF-V. Die FH1-Domäne des *Schistosoma*-Homologs ist nach MotifScan im Vergleich zu anderen Diaphanous-Proteinen N- und C-terminal um drei bzw. sieben Aminosäuren erweitert (Abb. 3-19). Während das ein Charakteristikum der FH1-Domäne von SmDRF-V ist, ergeben sich in Abhängigkeit von der Betrachtungsweise Unterschiede für die FH2-Domänen aller Diaphanous-Proteine. Wird die Definition nach Krebs *et al.* (2001) zugrunde gelegt, erstrecken sich FH2-Domänen über einen weitaus kleinen Bereich als nach den Berechnungen von Programmen wie SMART und Blast X (Abb. 3-20). Die weniger konservierten FH3-Domänen von Diaphanous-Proteinen sind möglicherweise für die Lokalisierung der Moleküle innerhalb der Zelle verantwortlich (Petersen *et al.*, 1998). Eine solche Domäne ist in SmDRF-V nur partiell vorhanden, was auf die unvollständige Sequenz in diesem Bereich zurückzuführen ist. Die hochkonservierte DAD-Domäne (Alberts, 2001) ist hingegen vollständig in SmDRF-V enthalten. Die Consensussequenz (G/A)(V/A)MDXLLEXL(K/R/Q)X(G/A)(S/G/A)-(A/P)⁷, die das Zentrum dieser autoregulatorischen Domäne bildet, wird größtenteils erfüllt (Abb. 3-19). Die DAD-Domäne ist Bestandteil der *C-terminal intramolekular interaction domain* (CIID; Krebs *et al.*, 2001), die mit den verwendeten Programmen nicht detektiert werden kann, da sie nicht in entsprechende Datenbanken eingetragen ist. Homologievergleiche ergaben, dass die putative CIID-Domäne von SmDRF-V vermutlich von Position 699 bis zum C-terminalen Ende reicht. Die Abwesenheit der für Diaphanous-Proteine charakteristischen RBD-Domäne (*Rho binding domain*), die im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist, weist erneut auf die Unvollständigkeit der Aminosäuresequenz im N-Terminus hin. Mitglieder der FH-Proteinfamilie, zu denen auch die Diaphanous-Proteine gehören, enthalten eine oder mehrere Coiled-Coil-Regionen (Wasserman, 1998). Diese sind charakteristisch für Proteine, die in die Zytoskelett-Organisation involviert sind und ermöglichen homo- und heterotypische Interaktionen. Üblicherweise befindet sich bei FH-Proteinen eine Coiled-Coil-Region N-terminal zur FH1-Domäne und eine oder zwei weitere liegen innerhalb oder C-terminal zur FH2-Domäne. Mit dem

⁶ Das Ausschalten dieses Filters bewirkt, dass Sequenzabschnitte mit geringer Komplexität bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung (wie z.B. die Prolin-reiche FH1-Domäne) mit in das Alignment einbezogen werden.

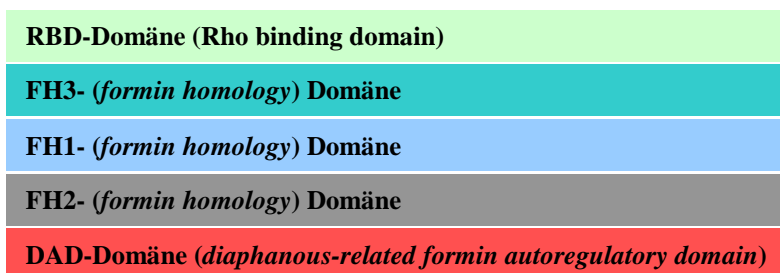
⁷ Die Consensus-Sequenz ist aus nur sechs Diaphanous-Proteinen zusammengestellt worden (vgl. Alberts, 2001). X steht für jede beliebige Aminosäure.

Programm PAIRCOIL wurden bei einem Threshold von 0.45 für SmDRF-V drei Coiled-Coil-Regionen bestimmt. Eine liegt zwischen der FH3- und der FH1-Domäne, die beiden anderen befinden sich zwischen der FH2- und der DAD-Domäne (Abb. 3-19).

DRF2_Mensch	MEQPGAASGAGGGSEEPGGGRSNKRSAGNRAANEEETKNKPKLNIQIKTLADDVDRDRIT	60
DRF3_Maus	MERHRARALGRDSKSKS-----SRRKGLQSAPPAGPYEPGEKRPKHLNIRTLTDDMLDKFA	55
DRF1_Maus	ME-PSGGGLGPRGRTR----DKKKGRSPDELDPATGGDGGKHKKF-----LERFT	44
DIA-P1_Drosophila	MSRHEKTKSTGGGLLD-----SLFGRPSKSKGGTISSG-----	33
SmDRF_Schistosoma	-----	
DRF2_Mensch	SFRKSTVKKEKPLIQHPIDSQVAMSEFPAAQPLYDERSLNLSEKEVLDLFEKMMEDMNLN	120
DRF3_Maus	SIRIPGSKKERPPLPHLKTVSGISDSSLSSETMENNPKALPESEVLKLFKEMMEDMNLN	115
DRF1_Maus	SMRIKK-EKEKP-----NSAHRNSSASYGDDPTAQSLQDISDEQVLVLFQMLVDMNLN	97
DIA-P1_Drosophila	----TLAHGGRP-----VSADNYVVPGVDFEQYIQQLSVAELDAKFLIEIEDMNIP	81
SmDRF_Schistosoma	-----	
DRF2_Mensch	EKKAPLRNKDFTTKREMVVQYISATAKSGGLKNSKHECTLSSQEYVHELRSG-ISDEKL	179
DRF3_Maus	EDKKAPLREKDFGIKKEMVMQYINTASKTGLRSSR---QISPOEFLHELKMG-YTDERL	171
DRF1_Maus	EKQQLPREKDIVIKREMVSYLHTSKAGMNQKES---RSAMMYIQELRSGLRDMHL	152
DIA-P1_Drosophila	KDKREPLLAKSKEERQKMMHWLKGKNSLERSANSR---FEKPIDYVEYLQNGEHSTHKV	138
SmDRF_Schistosoma	-----	
DRF2_Mensch	LNCLSLRVSLTSNPVSWVNNFGEHGLGLLLEDEKLLDKKQOE--NIDKKNQYKLIQCL	237
DRF3_Maus	FTYLESRLVSLTSHPVSWVQSFGEHGLGLLLEDEKLLDKKQOE--KVVKKTOHKVQICL	229
DRF1_Maus	LSCLESRLVSLNPNVSWVQTFGAEGLASLLDILKRLHDEKEETSNGYDSRNQHEIIRCL	212
DIA-P1_Drosophila	YQCVESLRVALTSNPISWIKFVGVAGIGTIEKLLARSKNN-----ASYEKIEFEAIRCL	192
SmDRF_Schistosoma	-----	
DRF2_Mensch	KAFMNNKFGQLRILGDERS--LLLLARAIDPKQPNMTEIVKILSAICIVGE-ENILDKL	294
DRF3_Maus	RALMNTQYGLERIMSDKRS--LSSLAKAMPDPRQAMMADVVKLLSAVCIVGE-ESILEEV	286
DRF1_Maus	KAFMNNKFGIKTMLETEEG--ILLVVRAMPVAVPNMMDAAKLLSALCILPQPEDMNERV	270
DIA-P1_Drosophila	KAIMNNTWGLNVVLPDQHSVLLLAQSLDPRKQPOTMCEALKLLASFIVYE-RNGYEKV	251
SmDRF_Schistosoma	-----	
DRF2_Mensch	LGAITTAAER--NNRERFSPIVEGLENQE---ALQLQVACMQFINALVTSPEYLDFRFH	348
DRF3_Maus	LEALTSAGEE--RKIDRFFSIVEGLRHN-----SVNLQVACMQFINALVTSRDDLDFRLH	339
DRF1_Maus	LEAMTERAEM--DEVERFQPLLDGLKSGT---SIALKVGCLQLINALITPAEELDFRVH	324
DIA-P1_Drosophila	LRAITTIAAATSFKASERFRPIVDALFASDQQDPKRDACHSLIFINTLTNTPTDLNFRHL	311
SmDRF_Schistosoma	--GLTFSAEELNGTPDERFMPLVKALDCPEVAR-ASLQFINVLVNRSCLEDESFFIDYRVH	57
	.:* . : ** : : . *	
DRF2_Mensch	LRNEFLRSGLKTMLPDLKEK---ENDELDIQLKVFDEKEDDLTELSHRLNDIRAEMDD	404
DRF3_Maus	LRNEFMRCGLKEILPNLKI---KNDGLDIQLKVFDEHKEEDLSEFFHRLIEDIRAELDE	395
DRF1_Maus	IRSELMRGLHLQVLELREI---ENEDMKVQLCVFDEQGEDDFDLKGRLLDIRMEMDD	380
DIA-P1_Drosophila	LRCEIMRMGLYDRLEDFTKIVEASNNENLQHFKIFNEIREDDFEFVQRFNDVTFNMDD	371
SmDRF_Schistosoma	LRCEFNLSGLIIEKLNKLENS---LDADIQNHITTYRSRADQLDDVFERLDSVKCDLDD	113
	* * : * : * : : : : : : : * : : * : : : : *	
DRF2_Mensch	MNEVYHLLYNMLKDTAAENYFSLIQHFLLRNDYYIRPQYYKIEECVSVIVLHCSGMD	464
DRF3_Maus	ASDVYSMLWDTVKETRAEGHFLSIQHLIRNDYIRPQYFKLIEECVSVIVLHRDGTD	455
DRF1_Maus	FGEVFIILNTVKDSKAEHPFLSIQHLIRNDYEARPQYKLEECVSVIVLHKNKGTD	440
DIA-P1_Drosophila	ATDCFDVLKLVDTDTTSEPYFSLIQHLLYIRDDFYFRPAYQLIEECISQIVFHKGYCD	431
SmDRF_Schistosoma	ANQIFHILHRTIMGSKSEKHFSLIQHFLFIRDE-PYRLAYFTLLEELIGQVMIQNDGVD	172
	: : : : : * : * * * * * * * : : * * : : : * : * : : : *	
DRF2_Mensch	PDFKYRQLDIDLTHLIDSCVNKAKVEESEQKAAEFKSKFDEEFTARQEAQAEQKRD--	522
DRF3_Maus	PDFTYRKRLLDLSQFVQVDCIDQAKLDEWEKASEHCKKFEKECTDHQETQALQKRE--	513
DRF1_Maus	PDFKCRH-LQIDIERLVQIMIDTKVEKSEAKATELEKLDSELTAHELQVEMKKMEND	499
DIA-P1_Drosophila	PNFENRN-FNIDTSLLLDDIVEKAKAKESK-RSEEEYKKEIQLESQAEAEAKAAHLE--	487
SmDRF_Schistosoma	PDP-HMNILRLDVESTVALLVDALKEADASTRVEELQAKLDAALQAKLEAEAKVQTLQSH	231
	* : : : * : : : * . . : * * : : : * : : : :	



Abb. 3-20. Multi-Alignment verschiedener Diaphanous-Proteine (ClustalW). Konservierte Domänen (nach Krebs *et al.*, 2001) sind farbig unterlegt, überlappende Bereiche durch Schraffierung gekennzeichnet.



Die FH2-Domäne nach SMART ist durch farblose Kästen mit grauem Rand markiert. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zusätzlich sind ähnliche Aminosäuren mit hohem Score (:) und mit niedrigem Score (.) hervorgehoben. Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an.

Tyrosinkinasen binden üblicherweise an ihre Substrate, d. h. an die Proteine, die ihnen in der Hierarchie des Signalwegs untergeordnet sind (*downstream* gelegen), indem hauptsächlich ihre SH3-Domäne mit konservierten Prolin-reichen Sequenzabschnitten des Substratmoleküls interagiert (Thomas & Brugge, 1997). SmDRF-V enthält mit der FH1-Domäne eine solche Prolin-reiche Region. Außerhalb dieser Domäne gibt es keine weiteren Polyprolin-Stretches mehr. Interaktionen von Src-TKs über ihre SH3-Domäne mit der FH1-Domäne von Diaphanous-Proteinen sind bereits beschrieben worden (Tominaga *et al.*, 2000). Auf diesen beiden Domänen basiert vermutlich auch die Bindung von SmTK3 an SmDRF-V, da dessen FH1-Domäne zahlreiche PxxP-Grundmotive enthält.

Position	Sequenz	Score
149	RDEPYRLAY	0.677
370	DELEYGDL	0.962
417	KKLRYLDDK	0.735
480	LKDEYEALA	0.956
652	PNDNYIPVM	0.890
695	DPNKYHMEN	0.584
822	RSRNYGDL	0.593

Tab. 3-3. Putative Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in SmDRF-V. Programm: NetPhos 2.0. Threshold: 0.5. Die putativ phosphorylierten Tyrosine sind durch Fettdruck markiert.

Da PTKs ihre Substrate in der Regel phosphorylieren, wurde nach putativen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in der Proteinsequenz von SmDRF-V gesucht. Insgesamt konnten sieben Motive ermittelt werden, die signifikante Ähnlichkeiten zu entsprechenden Konsensus-Sequenzen aufweisen (Tab. 3-3, Abb 3-19).

3.3.6.4. Charakterisierung der weiteren Klone der Gruppe B

Die verbleibenden sechs Klone der Gruppe B (neben S283 und S439) wurden zur Charakterisierung mit der Nukleinsäuresequenz von SmDRF-V verglichen. Anhand der vorliegenden Sequenzinformationen (siehe Anhang) wurden die Startpunkte der jeweiligen Inserts in Relation zur SmDRF-V-Sequenz bestimmt. Da alle Klone der Yeast-Two-Hybrid-Bank mit einem Oligo(dT)-Primer synthetisiert worden waren, lässt sich über die zuvor ermittelten Insertgrößen feststellen, ob dort größere Insertionen oder Deletionen im Vergleich zu SmDRF-V vorliegen. Für fünf Klone konnten solche Variationen ausgeschlossen werden, für den sechsten (S433) jedoch nicht (Abb. 3-21). Das entsprechende Insert von ca. 1.3 kB wurde zunächst vom 5'-Ende

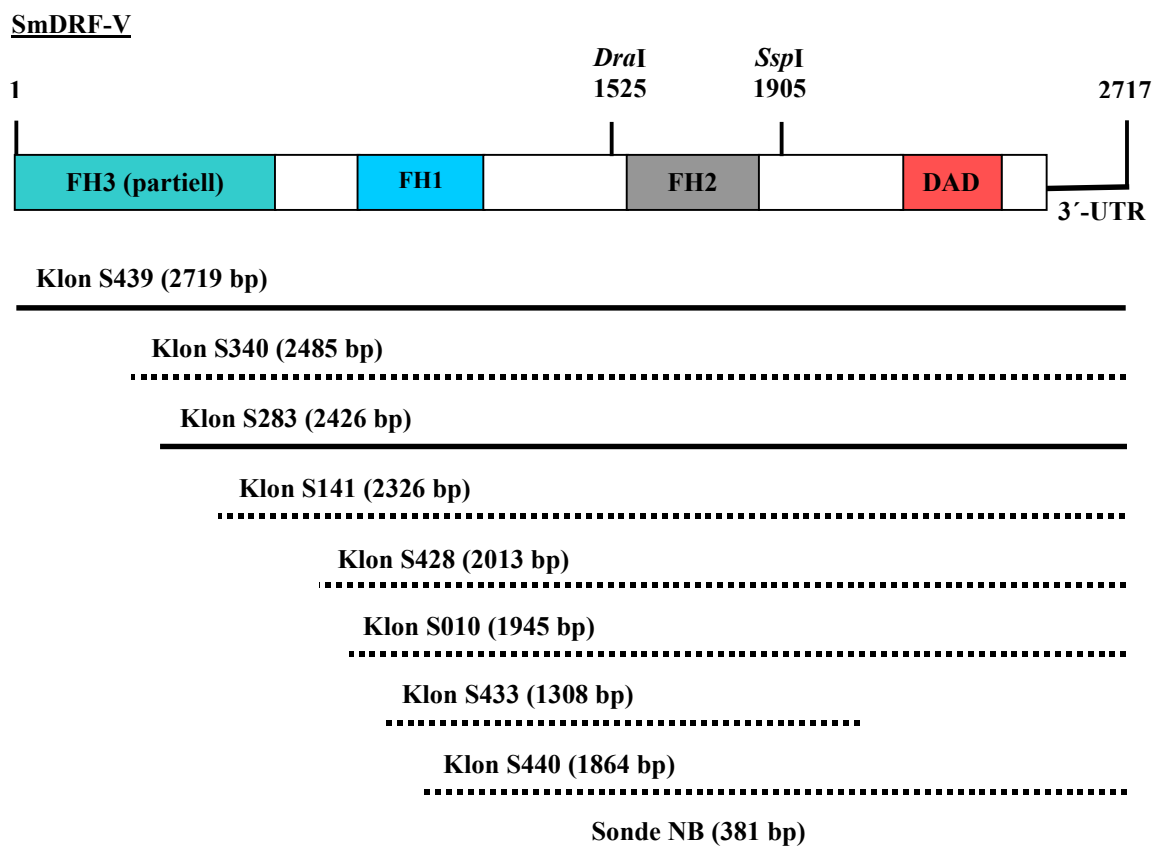


Abb. 3-21. Schematische Darstellung der Gruppe B-Klone und der Northern-Blot-Sonde in Relation zur SmDRF-V-cDNA-Sequenz. Die Zahlen geben Positionen in bp an. Als durchgezogene Linie dargestellte Klone sind vollständig sequenziert und die Längenangabe ist exakt. Mit einer gepunkteten Linie eingezeichnete Klone sind nur partiell sequenziert worden. Die Längenangabe basiert auf der Abschätzung einer Sequenzierung im 5'-Bereich bzw. zusätzlich im 3'-Bereich (S433) verglichen mit SmDRF-V.

aus ansequenziert. Die erhaltene Nukleinsäuresequenz ist identisch mit dem Abschnitt 799-1287 der cDNA von SmDRF-V. Die Sequenzierung des 3'-Endes zeigte, dass der Klon bis zur Position 2076 von SmDRF-V reicht und dass sich danach ein Poly(A)-Tail von 29 bp anschließt. Damit umfasst der Klon den größten Teil der FH1- und die vollständige FH2-Domäne (siehe Abb. 3-21).

3.3.6.5. Northern-Blot-Analyse von Sm-DRF-V

Mittels Northern-Blot-Analyse sollte festgestellt werden, wie groß das gesamte Transkript ist, um Hinweise auf die Länge des noch fehlenden 5'-Bereichs zu erhalten. Dazu wurde Total-RNA aus Männchen mit einer radioaktiv markierten, 381 bp großen *DraI/SspI*-Sonde hybridisiert (Abb. 3-22), welche die komplette (konservierte) FH2-Domäne abdeckt. Trotz anschließender Waschungen mit hoher Stringenz wurden zwei distinkte Signale detektiert, die spezifisch für SmDSRF-V sind. Ein Signal liegt bei ca. 3.5 kB und repräsentiert wahrscheinlich die komplette mRNA, deren Größe im üblichen Bereich für Diaphanous-Proteine liegt. Beispielsweise umfasst die kodierende Nukleinsäuresequenz von DiaP3 (DRF3; AcNr.: NM019670) aus der Maus, zu dem SmDRF-V die höchste Ähnlichkeit ausweist, 3516 bp. Daraus folgt, dass noch ca. 800-900 bp kodierende Sequenz in der 5'-Region von SmDRF fehlen. Die Länge dieses Bereiches würde ausreichen, um den fehlenden Teil der FH3-Domäne (ca. 120 AS) und die fehlende RBD-Domäne (ca. 210 AS)⁸ abzudecken.

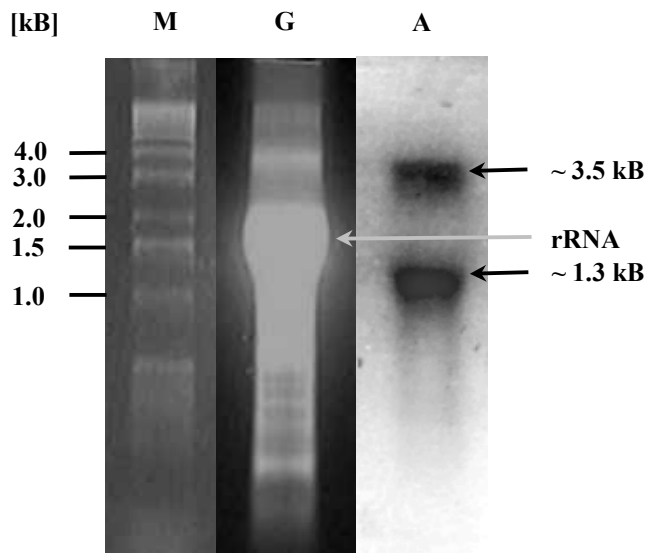


Abb. 3-22: Northern-Blot-Analyse von Sm-DRF-V. Auf einem denaturierenden Agarosegel wurden 50 µg Total-RNA aus Männchen (G) neben einem Marker (M, 1kB-Leiter) aufgetrennt. Die RNA wurde auf einen Filter transferiert und mit der radioaktiv markierten Sonde NB (Abb. 3-21) hybridisiert (16 h bei 42 °C mit 50% Formamid). Die Waschungen erfolgten bis zu einer Stringenz von 0.5x SSC, 0.1% SDS bei 65 °C. Die Autoradiographie (A) zeigte nach 7 d Exposition Signale bei ca. 3.5 kB und bei ca. 1.3 kB.

Zusätzlich zu dem erwarteten Signal wurde mit der Sonde noch ein verkürztes Transkript von ca. 1.3 kB Länge detektiert. Die Ursache dafür kann z.B. ein Allel, das über eine oder mehrere Deletionen verfügt, ein alternativer Transkriptionsstartpunkt oder eine Spleiß-Variante sein. Auffällig ist, dass sich die Größe des verkürzten Transkriptes mit der Größe von Klon S433 deckt. Es gibt Hinweise darauf, dass das verkürzte Transkript mit dem Insert von S433 korreliert.

⁸ Es ist anzumerken, dass sich die RBD- und die FH3-Domäne teilweise überlagern können (s. Abb. 3-20).

Im 5'-Bereich der cDNA-Sequenz von S433 befinden sich mehrere ATGs, von denen eines für das Startmethionin des abgeleiteten Proteins kodieren könnte. Zudem befindet sich ein abweichendes Poly(A)-Signal 42 bp vom Poly(A)-Tail entfernt in der S433-Sequenz (vgl. Kap. 3.3.6.4). Da dieser Klon ein Teil des ORFs von SmDRF-V darstellt, würde dem verkürzten Transkript allerdings ein Stopp-Codon fehlen. Ein daraus abgeleitetes Protein würde einen weiten Teil der FH1-Domäne, die FH2-Domäne und eine Coiled-Coil-Region enthalten. Alternativ bietet sich noch eine zweite naheliegende Möglichkeit an. Ungefähr 1.2 kB - 1.4 kB vom 3'-Ende entfernt befinden sich zwei ATG-Triplets in der SmDRF-V Sequenz (Abb. 3-19). Möglicherweise wird das Primär-Transkript durch Spleißen am 5'-Ende um ca. 2.1 bis 2.3 kB verkürzt und eines der beiden ATGs als Translationsstartpunkt verwendet. Daraus würde ein verkürztes Protein mit FH2- und CIID-Domäne sowie zwei Coiled-Coil-Regionen resultieren.

3.4. Die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von mitotischer Aktivität bei Schistosomen

3.4.1. Die Methode in der Übersicht

Ein umfassender Teil dieser Arbeit beschäftigt sich damit, den Einfluss verschiedener Inhibitoren von Signalmolekülen auf die Zellproliferation im Vitellarium zu untersuchen. In der modernen Forschung wird mitotische Aktivität üblicherweise durch den Einbau von 5'-Brom-2-desoxyuridin¹ (BrdU) in die DNA nachgewiesen (Dolbeare & Selden, 1994). Die meisten der veröffentlichten Protokolle sind für die Zellkultur entwickelt worden, wo sich eingebautes BrdU in mitotisch aktiven Zellen leicht durch Durchfluss-Zytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie nachweisen und quantifizieren lässt. Solche Protokolle sind aufgrund der Detektionsmethoden für die Quantifizierung von DNA-Syntheseraten in multizellulären Organismen unbrauchbar. Die einzige Methode, die für solche Zwecke beschrieben worden ist, basiert auf dem Einbau von Isotopen in die DNA von Organismen, die in Kultur gehalten werden (Den Hollander & Erasmus, 1984). Diese Methode ist jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht anwendbar, da sie zwei essentielle Nachteile birgt. Zum einen muss für die Kultivierung von Schistosomen bei Zugabe von radioaktiven Chemikalien ein Inkubator dauerhaft in einem Isotopenlabor plaziert sein. Zum anderen ist diese Technik aufgrund der Verwendung von Isotopen aufwendig in der Durchführung und erschwert dadurch die simultane Handhabung von mehreren zu vergleichenden Proben.

Folglich sollte eine möglichst einfache Methode entwickelt werden, mit der mitotische Aktivität von Schistosomen ohne Verwendung von radioaktiven Chemikalien quantifiziert werden kann. Dazu wurde eine Strategie nach folgendem Schema verfolgt: Schistosomen werden zunächst für einen bestimmten Zeitraum *in vitro* unter der Zugabe von BrdU kultiviert. Anschließend wird die gesamte genomische DNA extrahiert und denaturiert² sowie die Konzentration bestimmt. Von zu vergleichenden Proben (DNA unterschiedlicher Wurmpopulationen) werden möglichst gleiche Mengen an DNA per Slot-Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Für einen möglichst exakten Vergleich ist es notwendig, die tatsächlich auf der Membran präsenten DNA-Mengen von allen Proben, die miteinander verglichen werden sollen, relativ zueinander zu bestimmen. Dazu wird eine 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid- (DAPI-) Färbung durchgeführt, und die resultierenden Signalintensitäten werden densitometrisch bestimmt. Die DNA-Syntheseraten werden durch Umsetzung der immobilisierten DNA mit einem Anti-BrdU-Antikörper nachgewiesen, und die erhaltenen Signalintensitäten werden ebenfalls durch Densitometrie quantifiziert. Zur präzisen Auswertung werden von den zu vergleichenden Proben relative Unterschiede in der untersuchten DNA-Menge (Intensitäten der DAPI-Signale) gegeneinander abgeglichen und die relativen Unterschiede in der DNA-Syntheserate (Intensitäten der anti-BrdU-Signale) auf diesen Abgleich bezogen. Daraus resultieren relative Vergleiche von DNA-Syntheseraten, die unabhängig von der untersuchten (transferierten) DNA-Menge sind. Das Ergebnis wird in einem geeigneten Diagramm graphisch dargestellt.

¹ BrdU substituiert spezifisch Thymidin.

² Die Denaturierung der DNA ist notwendig, da der verwendete Antikörper BrdU nur in einzelsträngiger (ss-) DNA erkennt (Gratzner, 1982).

3.4.2. Quantifizierung von Filter-gebundener DNA durch DAPI-Färbung

3.4.2.1. Voraussetzungen

Als Voraussetzung für einen präzisen relativen Vergleich von DNA-Syntheseraten unterschiedlicher Wurmpopulationen war es notwendig, die tatsächlich transferierten DNA-Mengen gegeneinander abzugleichen. Daher wurde die (relative) Menge der immobilisierten DNA durch DAPI-Färbung und anschließende densitometrische Auswertung der Signalintensitäten bestimmt. DNA-Quantifizierung mit DAPI in Lösung ist eine weit verbreitete Technik (Kapuscinski, 1995), ein entsprechendes Protokoll für filtergebundene DNA ist meines Wissens hingegen noch nicht veröffentlicht worden. Trotzdem gelten einige allgemeine Tatsachen für die DNA-DAPI-Interaktion, die Voraussetzung für eine spezifische DNA-Quantifizierung mit DAPI auf Filtern sind. DAPI geht mit doppelsträngiger (ds-) oder einzelsträngiger (ss-) DNA eine fluoreszierende Verbindung ein, ungebunden fluoresziert der Farbstoff hingegen kaum (Kapuscinski, 1995). Weiterhin formt DAPI auch mit RNA einen Komplex, der aber nicht fluoresziert (Kapuscinski & Yanagi, 1979). Beträchtliche Mengen an RNA beeinflussen die DNA-DAPI-Interaktion nicht, wenn DAPI im Überschuss zu den Nukleinsäuren vorliegt (Kapuscinski & Yanagi, 1979). Mit Proteinen interagiert der Farbstoff hingegen kaum, wobei Tubuline eine Ausnahme stellen (Kapuscinski, 1995). Damit sind alle Voraussetzungen für eine DNA-spezifische DAPI-Färbung auch unter Bedingungen, bei denen die DNA nicht hochwertig aufgereinigt ist, erfüllt.

Die Formation fluoreszierender DNA-DAPI-Verbindungen erfordert A-T-reiche Sequenzen (Kapuscinski & Szer, 1979). Da der A-T-Gehalt von Schistosomen-DNA bei ca. 66% liegt (Hillyer, 1974), ist der Organismus für diese Technik geeignet. Für eine Quantifizierung wäre es von Bedeutung, dass die Substitution von Thymidin durch BrdU die DAPI-Färbung nicht beeinflusst. Experimente mit Oligonukleotiden bei pH 7.5 zeigten, dass neben A-T- auch A-BrdU-reiche Sequenzen DAPI-Fluoreszenz bewirken bzw. verstärken (Kapuscinski & Szer, 1979). Es sei schon an dieser Stelle auf Vorexperimente hingewiesen, die gezeigt haben, dass die Intensität der DAPI-Färbung von verschiedenen Mengen filtergebundener Schistosomen-DNA nicht durch die Menge an eingebauten BrdU beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt).

3.4.2.2. Hintergrundfärbung in Abhängigkeit von der Länge der Waschzeiten

Wie erwartet, ließ sich filtergebundene DNA schon in den ersten Versuchen erfolgreich mit DAPI nachweisen, jedoch trat zum Teil eine recht deutliche Hintergrundfärbung auf. Daher wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt, um die Länge der Färbe- und Waschzeiten zu optimieren und den Hintergrund zu reduzieren. Dafür wurden jeweils ds- und ss-DNA aus Schistosomen-Weibchen per Slot-blotting auf einen Filter transferiert. Als Negativkontrolle wurde eine Mixtur aus Protein und RNA von Schistosomen aufgeladen. Nach DAPI-Färbung und einem kurzen Waschschrift traten grau-blaue Hintergrundsignale in allen Slots - auch in der Negativkontrolle - unter UV-Licht-Anregung auf. Durch einen zweiten längeren Waschschrift, der je nach Experiment 1-16 h dauern kann, wird dieser Hintergrund entfernt, und statt dessen erscheinen DNA-spezifische weiss-fluoreszierende Signale (Abb. 3-23). Die weiss-fluoreszierende Färbung

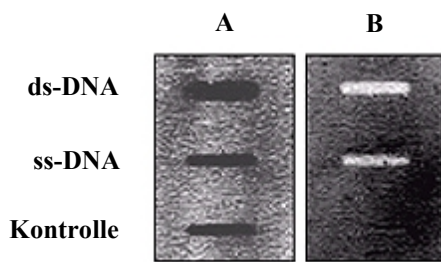


Abb. 3-23. DAPI-Färbung von filtergebundener DNA. 500 ng DNA aus kultivierten Schistosomen wurden als ds- oder ss-DNA in 100 µl Wasser aufgenommen und per Slot-blotting auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Als Negativkontrolle wurde eine Mischung aus 50 ng Total-RNA und 100 ng Total-Protein von Weibchen in 100 µl Wasser gelöst und ebenfalls aufgetragen. Unter Anregung durch UV-Licht (302 nm) wurde nach einem Waschschriff von 5 min dunkle Hintergrundfluoreszenz sichtbar (Spalte A). Nach einem zweiten Waschschriff von 5 h konnten DNA-spezifische, weiss-fluoreszierende Signale detektiert werden (Spalte B).

ist darauf zurückzuführen, dass DNA-DAPI-Verbindungen bei Anregung durch UV-Licht Lichtwellen emittieren, die fast das gesamte sichtbare Spektrum abdecken (Kapusinski, 1995). Die densitometrische Auswertung der Signale zeigte, dass ds-DNA ca. dreifach intensiver gefärbt wird als ss-DNA, was mit bestehenden Daten übereinstimmt (Kapusinski & Yanagi 1979). Die Negativkontrolle zeigte keine Fluoreszenz. Um den Grund der unspezifischen, grau-blauen Signale zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen von Proteinen, RNA und dH₂O separat mit und ohne Benutzung der Slot-Blot-Apparatur auf Filter transferiert. Es stellte sich heraus, dass sowohl Proteine, als auch die Apparatur selbst den Hintergrund verursacht, der aber in beiden Fällen durch längere Waschzeiten entfernt werden kann (Daten nicht gezeigt).

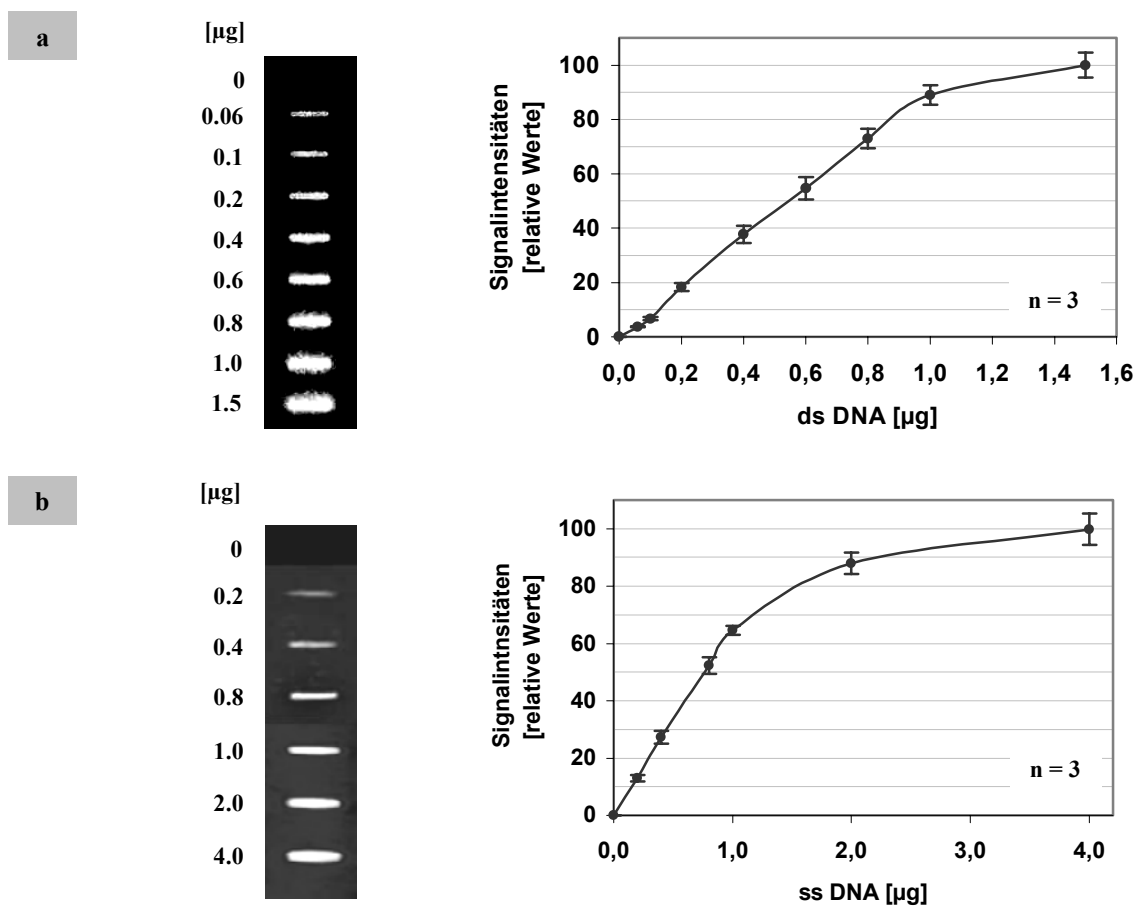


Abb. 3-24. Quantifizierung filtergebundener DNA durch DAPI-Färbung und Densitometrie. Vergleichende DAPI-Färbung verschiedener Mengen an ds- (a) und ss- (b) DNA von Schistosomen-Weibchen. Die DNA wurde durch Slot-Blotting auf einen Filter transferiert und mit DAPI gefärbt (links). Die Signalintensitäten wurden durch Densitometrie bestimmt und als relative Werte graphisch dargestellt (rechts). n, Zahl der unabhängigen Experimente.

3.4.2.3. Die Stöchiometrie zwischen DNA-Menge und Intensität der DAPI-Färbung

Um den Bereich der DNA-Mengen zu bestimmen, der stöchiometrisch mit DAPI quantifiziert werden kann, wurden zunehmende Mengen von ds- und ss-DNA aus Schistosomen in separaten Slots auf einen Filter transferiert und mit DAPI gefärbt. Die Intensitäten der resultierenden Signale wurden durch Densitometrie bestimmt. Für ds- und ss-DNA konnte eine Proportionalität von Signalintensität zur DNA-Menge bis zu einem Bereich von 1 µg festgestellt werden (Abb. 3-24). Bei deutlich größeren Mengen tritt Sättigung ein. Daraus folgt, dass eine Quantifizierung filtergebundener DNA durch DAPI-Färbung in einem Bereich bis zu 1 µg zuverlässige Daten liefert.

3.4.3. Der Vergleich von DNA-Syntheseraten: DAPI-Färbung kombiniert mit BrdU-Detektion

Den Hollander & Erasmus haben gezeigt, dass in murenen Schistosomen-Weibchen signifikant mehr DNA repliziert wird als in Männchen (1984). Das ist vor allem auf die äußerst hohe Zellproliferationsrate in den Vitellarien der Weibchen zurückzuführen. Bei den Männchen fehlt ein Organ oder Gewebe, das in ähnlichem Maße mitotisch aktiv ist. Um die Funktionalität und die Qualität der DAPI/BrdU-kombinierten Technik zur Quantifizierung von DNA-Syntheseraten zu demonstrieren, wurde versucht, diese Ergebnisse mit der neuen Technik zu reproduzieren. Dazu wurden Schistosomenpaare für zwei Tage in BrdU-haltigem Medium kultiviert und die DNA beider Geschlechter anschließend separat behandelt. Die Unterschiede im Einbau des Thymidin-Analogons in die DNA beider Geschlechter wurden nach dem in Kapitel 3.4.1 dargestellten Schema bestimmt (Abb. 3-25). Parallel durchgeführte Kontrollexperimente zeigten, dass unter den Versuchsbedingungen (Kap. 2.2.30) weder Erst- noch Zweitantikörper mit unmarkierter DNA reagieren (Daten nicht gezeigt). Die densitometrische Auswertung der Signale ergab, dass in mature Weibchen ca. dreimal mehr BrdU eingebaut wird als in Männchen (Abb. 3-25).

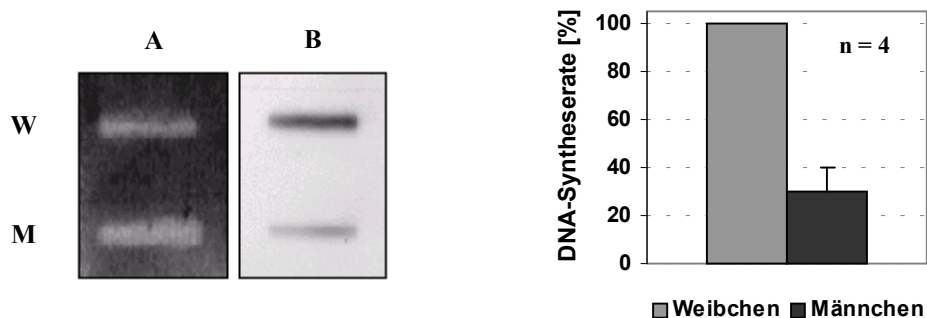


Abb. 3-25. Vergleich von DNA-Syntheseraten zwischen murenen Schistosomen-Weibchen und Männchen durch den Einbau von BrdU. Links: DNA wurde separat aus unter der Zugabe von BrdU kultivierten, gepaarten Männchen (M) und Weibchen (W) isoliert, per Slot-blotting auf einen Filter transferiert und mit DAPI detektiert (Spalte A). Der Einbau von BrdU wurde durch Antikörperfärbung nachgewiesen (Spalte B). Rechts: Die Intensitäten der DAPI- und der anti-BrdU-Signale wurden densitometrisch vermessen und die Intensitäten der anti-BrdU-Signale in Relation zur aufgetragenen DNA-Menge gesetzt. Die resultierenden relativen Werte geben die Unterschiede der beiden Geschlechter in der Menge des eingebauten BrdUs an und sind graphisch dargestellt. n, Zahl der unabhängigen Experimente.

Dieses Ergebnis korreliert mit den Untersuchungen von Den Hollander & Erasmus (1984) und beweist damit die Funktionalität und die Qualität der Methode.

Weiterführende Versuche, die Zeit der BrdU-Zugabe von 48 Stunden auf 24 Stunden und weniger zu reduzieren, schlugen weitestgehend fehl. Aus einer 24-stündigen Behandlung von Wurmpaaren mit BrdU resultierten bei aufgetragenen Mengen von 500 ng bis 1 µg DNA nach der Antikörperfärbung wiederholt schwache Signale (Daten nicht gezeigt). Vor allem bei DNA aus Männchen konnten die Signale in den meisten Fällen nicht präzise densitometrisch ausgewertet werden. Da der Hintergrund der Antikörperfärbung sehr stark variieren kann, war es durch mehrfache Wiederholung möglich, bei DNA von maturen oder maximal 24 h entpaarten Weibchen (vgl. auch Kap. 1) einige messbare Signale zu erhalten.

3.5. Mitotische Aktivität adulter Schistosomen in Abhängigkeit von der Paarung

Den Hollander & Erasmus haben beschrieben, dass die Anzahl der Zellteilungen in adulten Weibchen abhängig vom Paarungskontakt zu einem Männchen ist (1985). In Kultur gehaltene virgine Weibchen haben ebenso wie entpaarte¹ eine signifikant niedrigere DNA-Syntheserate als gepaarte Weibchen. Unter Anwendung der neu entwickelten Technik (Kap. 3.4) sollten diese Daten reproduziert werden. Ziel war es, zu zeigen, dass sich die Differenzen zwischen gepaarten und ungepaarten Weibchen in der mitotischen Aktivität auch unter den gegebenen (Kultur-) Bedingungen mit dem verwendeten *Schistosoma*-Stamm (Liberianischer Stamm) nachweisen lassen. Das wäre eine wichtige Voraussetzung für die Allgemeingültigkeit der in den folgenden Versuchen ermittelten Daten. Außerdem würde die Reproduktion der Versuche noch einmal die Qualität der neuen Technik aufzeigen und die über 20 Jahre alten Daten von Den Hollander & Erasmus absichern. Ein neuer Aspekt dieser Versuche bestand in der Untersuchung der mitotischen Aktivität von Weibchen, die zunächst vom Männchen getrennt und nach einer bestimmten Zeit re-gepaart² werden.

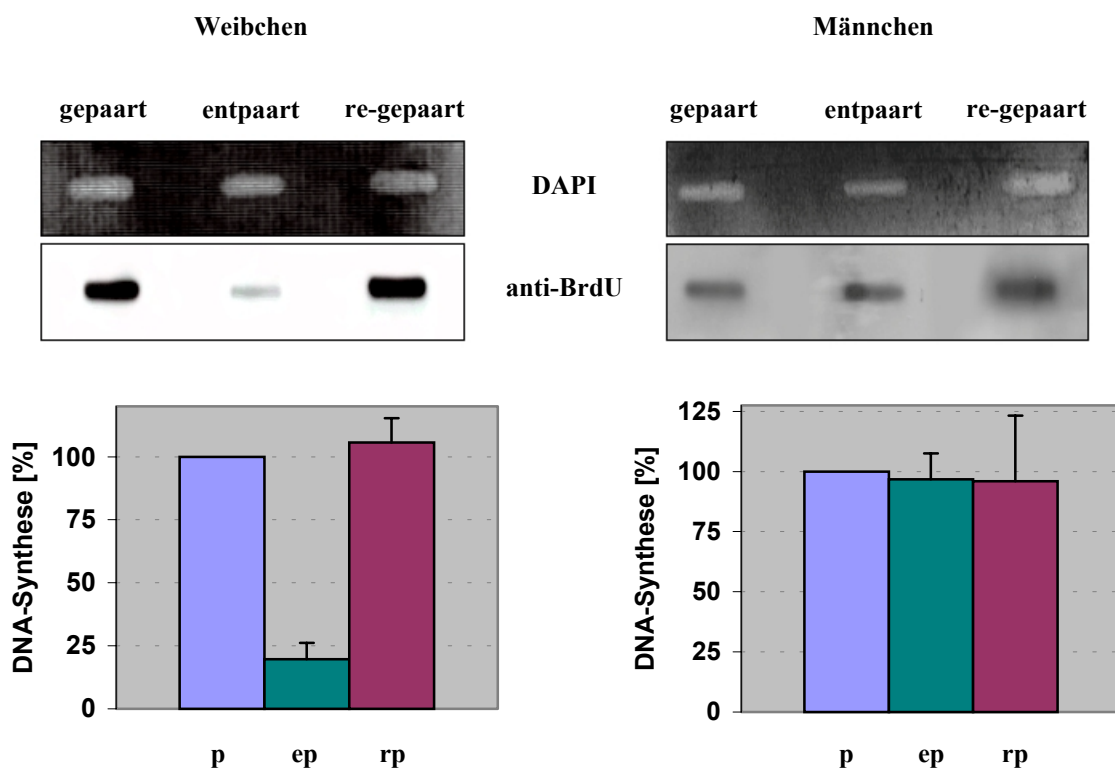


Abb. 3-26. Relativer Vergleich von DNA-Syntheseraten bei adulten Schistosomen in Abhängigkeit des Paarungszustandes. Die mitotische Aktivität kultivierter Würmer wurde mit der in Kapitel 3.4 beschriebenen Technik bestimmt. *Oben:* DAPI- und anti-BrdU-Färbung einer Versuchsreihe; ca. 500 ng DNA sind aufgetragen. *Unten:* Graphische Auswertung von drei je Versuchsreihen. Die relativen Werte der entpaarten (ep) und re-gepaarten (rp) Würmer beziehen sich jeweils auf die Werte der gepaarten (p) Würmer, die als 100 % definiert sind. Standardabweichungen sind angegeben.

¹ Als entpaart werden Schistosomen bezeichnet, die gepaart aus dem Endwirt erhalten worden sind, dann getrennt und anschließend isoliert vom anderen Geschlecht in der Kultur gehalten werden.

² Als re-gepaart werden Schistosomen bezeichnet, die, wie unter ¹ beschrieben, isoliert vom Partner in Kultur gehalten worden sind, bevor sie anschließend erneut mit dem anderen Geschlecht gepaart werden.

Zur Untersuchung der DNA-Syntheseraten wurden Schistosomenpaare nach der Isolation aus dem Endwirt sofort in Kultur genommen. Für die Messungen an gepaarten Würmern erfolgte die Zugabe von BrdU (1 mM) direkt nach dem ersten Waschschrift. Die Paare wurden für sieben Tage inkubiert, das Medium jeden Tag (unter erneuter Zugabe von BrdU) gewechselt, ungepaarte Schistosomen wurden aussortiert. Um entpaarte Schistosomen zu erhalten, wurden die beiden Geschlechter aus bestehenden Pärchen voneinander getrennt und anschließend separat für zwei Tage in Kultur gehalten. Damit sollte erreicht werden, dass bei diesen Weibchen die Männchen-induzierten Prozesse in deutlich verringertem Maße ablaufen, als bei gepaarten Weibchen (vgl. Grevelding *et al.*, 1997). Erst anschließend wurde BrdU zum Kulturmedium hinzugegeben und die beiden Geschlechter für weitere sieben Tage getrennt voneinander kultiviert. Es zeigte sich, dass gepaarte Weibchen unter diesen Bedingungen ca. fünffach soviel DNA replizieren wie entpaarte Weibchen. Demnach wird die DNA-Synthese bei adulten Weibchen paarungsabhängig vom anderen Geschlecht induziert. Beim Männchen hingegen lassen sich keine Unterschiede im Vergleich zwischen gepaarten und entpaarten Individuen feststellen. Daraus folgt, dass die DNA-Synthese beim Männchen unabhängig vom Paarungszustand ist (Abb. 3-26).

Weiterhin wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der DNA-Syntheserate bei entpaarten Weibchen und der Länge der Trennungsperiode besteht. Dafür wurden verschiedene, ursprünglich gepaarte Weibchen-Populationen für eine unterschiedliche Anzahl von Tagen getrennt vom Männchen in BrdU-haltigem Medium kultiviert. Die ermittelte DNA-Syntheserate wurde jeweils auf gepaarte Weibchen bezogen, die für die gleiche Anzahl von Tagen in BrdU-haltigem Medium inkubiert worden waren. Es stellte sich heraus, dass die mitotische Aktivität entpaarter Weibchen schon nach zwei Tagen auf gut 50% im Vergleich zu gepaarten Weibchen reduziert wird. Innerhalb einer Woche sinkt der Wert schließlich auf ca. 25% und verändert sich danach aber selbst nach sieben weiteren Tagen nicht mehr signifikant (Abb. 3-27). Daraus folgt, dass die Männchen-induzierten Zellteilungsereignisse beim Weibchen erst nach ca. sieben Tagen Trennungszeit nicht mehr nachzuweisen sind.

Um den Einfluss der Re-Paarung auf die DNA-Synthese zu untersuchen, wurden die beiden Geschlechter zunächst für zwei Tage getrennt voneinander kultiviert und daraufhin wieder

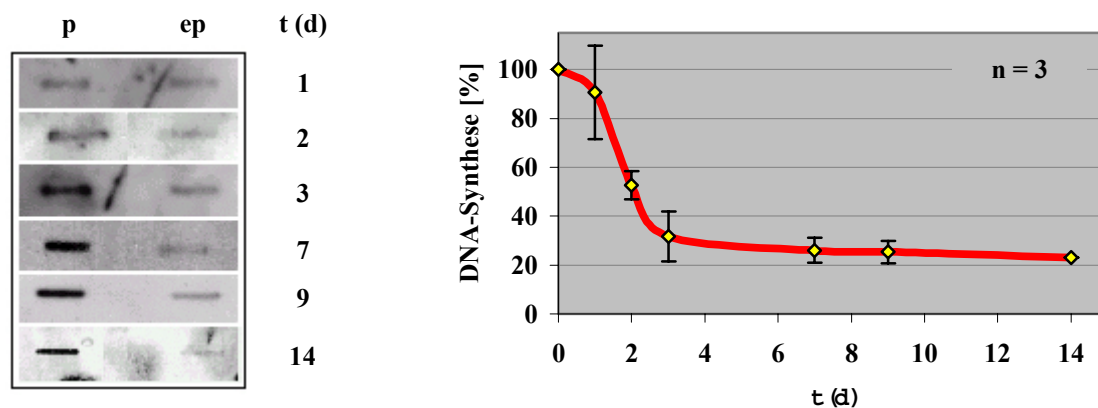


Abb. 3-27. Reduktion der DNA-Syntheserate in entpaarten Weibchen in Abhängigkeit von der Trennungszeit. Gepaarte und entpaarte Weibchen wurden in sechs Ansätzen für jeweils unterschiedlich lange Zeiten (t: 1-14 d) kultiviert. Anschließend wurde die DNA-Syntheserate der entpaarten Weibchen (ep) eines Ansatzes in Relation zu den gepaarten Weibchen (p) desselben Ansatzes bestimmt. *Links:* Autoradiographie einer Versuchsreihe; ca. 500 ng DNA sind jeweils aufgetragen, der DAPI-Abgleich ist nicht gezeigt. *Rechts:* Graphische Auswertung von n = 3 Versuchsreihen.

vereinigt. Würmer, bei denen innerhalb von 16 Stunden die Re-Paarung ausblieb, wurden verworfen. Die re-gepaarten Schistosomen wurden für weitere sieben Tage unter Zugabe von BrdU in Kultur gehalten. Nach Beendigung der Kultivierung erfolgte bei gepaarten und re-gepaarten Würmern zunächst die Trennung der Geschlechter voneinander, bevor im Folgenden - wie bei den entpaarten Würmern auch - die DNA-Syntheseraten bestimmt wurden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich die mitotische Aktivität re-gepaarter Weibchen nicht signifikant von der gepaarter Weibchen unterscheidet (Abb. 3-26). Das bedeutet, dass die Abnahme der mitotischen Aktivität durch die Entpaarung bei den Weibchen reversibel ist und durch die erneute Paarung mit einem Männchen aufgehoben werden kann. Da die DNA-Synthese bei den Männchen unabhängig vom Paarungskontakt ist, gibt es diesbezüglich auch keinen Unterschied zwischen gepaarten und re-gepaarten Männchen.

3.6. Der Einfluß von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Reifung von *Schistosoma*-Weibchen

3.6.1. Inhibitorstudien an Schistosomen: Vorüberlegungen und Voraussetzungen

3.6.1.1. Wahl der Inhibitoren

Die Src-Tyrosinkinase SmTK3 wird gewebespezifisch in den Gonaden beider Geschlechter und im Parenchym von *Schistosoma mansoni* exprimiert (Kap. 3.1.3, 3.1.7) und ist damit ein interessanter Kandidat für ein Protein mit einer Schlüsselfunktion in der Vitellarreifung. Eine weitere Tyrosinkinase der Src-Familie, SmTK5, wird in mehreren Organen bzw. Geweben exprimiert, u.a. auch in den Gonaden beider Geschlechter (Kap. 3.2.2.1). Damit ist auch für SmTK5 eine mögliche Beteiligung an der Vitellarentwicklung nicht auszuschließen. Hinzu kommt, dass die Regulation von Entwicklungsprozessen durch Src-TKs hinlänglich bekannt ist (Brown & Cooper, 1996). Daher wurden in den folgenden Untersuchungen ausschließlich PTK-Inhibitoren eingesetzt. Der Schwerpunkt bestand dabei in der Blockierung von Src-TKs. Die Syk-TK SmTK4 spielt für die Vitellarreifung wahrscheinlich keine Rolle, da das Gen in diesem Organ nicht transkribiert wird (Kap. 3.2.1.1). Trotzdem wurde auch ein Inhibitor gegen Syk-TKs verwendet. Der Einsatz dieses Inhibitors stellt die Kontrolle zum Einsatz von Src-Inhibitoren dar. Sollten sich die Auswirkungen von Src- und Syk-selektiven Inhibitoren auf die verschiedenen Zielprozesse¹ deutlich voneinander unterscheiden, dann wäre das ein wichtiger Hinweis für eine spezifische Blockierung von Mitgliedern der entsprechenden Proteinfamilie und gegen eine allgemeine Blockierung von PTKs.

3.6.1.2. Klassen und Spezifitäten von PTK-Inhibitoren

Kommerziell erhältliche chemische Inhibitoren werden im Allgemeinen für eine Anwendung in der Zellkultur produziert und sind üblicherweise gegen Proteine bzw. Proteinfamilien aus Säugetieren gerichtet (Levitzki, 1999). Der Großteil der PTK-Inhibitoren lässt sich in drei Gruppen einteilen (Levitzki, 1992; Levitzki, 1999): Die erste Gruppe umfasst Inhibitoren, die kompetitiv gegen ATP und nicht-kompetitiv gegen das Substrat der PTK wirken. Vertreter dieser Gruppe binden dabei an hochkonservierte Regionen innerhalb der katalytischen Domäne und verhindern damit die ATP-Bindung. Dadurch wird sowohl die Auto- als auch die Substratphosphorylierung der PTK unterbunden. Zu dieser Gruppe gehören die meisten natürlich vorkommenden Inhibitoren, wie Genistein und Lavendustin A. Die zweite Gruppe von Inhibitoren, die einige Tyrphostine beinhaltet, wirken nicht-kompetitiv gegen ATP und kompetitiv gegen das Substrat. Solche Substanzen blockieren den Zugang der PTK zum Substrat. Das wird z.B. durch direkte Interaktion mit der Substrat-Bindungsstelle, durch Konformationsänderungen in diesem Bereich oder auch durch Bindung an das Substratprotein selbst bewirkt. Die dritte Gruppe repräsentiert Inhibitoren wie Erbstatin, die durch eine Wechselwirkung mit der katalytischen Domäne kompetitiv gegen die ATP- und die Substratbindung wirken.

¹ Biologische Prozesse, die den Reifungsstatus des Weibchens anzeigen.

Die vielen verschiedenen PTK-Inhibitoren unterscheiden sich z.T. recht deutlich in ihrer Spezifität. Einige Inhibitoren, wie z.B. Genistein, blockieren (nahezu) alle PTKs eines Organismus (Polkowski & Mazurek, 2000). Der Einsatz solcher Inhibitoren bei vielzelligen Organismen erscheint wenig sinnvoll, da durch die Blockierung vieler PTKs höchstwahrscheinlich eine große Anzahl von (lebenswichtigen) Signalwegen beeinträchtigt wird. Damit sind keine gezielten Effekte auf Zielprozesse wie z.B. p14-Expression zu erwarten. Sinnvoller ist es hingegen, spezifische Inhibitoren gegen TKs einer Familie oder einer Subfamilie zu verwenden, um moderatere und damit speziellere Effekte zu erzeugen. Die meisten käuflichen PTK-Inhibitoren haben jedoch das gemeinsame Merkmal, bei angemessener Anwendung die Aktivität von anderen Enzymklassen nicht oder nur wenig zu beeinflussen. Die spezifische Wirkung von PTK-Inhibitoren ist in großem Maße abhängig von der eingesetzten Konzentration. Bei Überdosierung wirken auch äußerst spezifische Inhibitoren gegen mehr oder weniger alle Proteinkinasen (einschließlich Serin/Threoninkinasen) und eventuell noch gegen weitere Enzymklassen wie z.B. GTPasen. Für eine spezifische Inhibition jedoch werden Konzentrationen eingesetzt, die sich im Bereich des IC_{50}^2 befinden (Levitzki, 1992; Traxler *et al.*; 1997).

3.6.1.3. Phylogenetische Untersuchungen an SmTK3, SmTK4 und SmTK5

Dass Inhibitoren, die gegen Säuger-PTKs gerichtet sind, auch bei Invertebraten einsetzt werden können, ist auf den hohen Konservierungsgrad der funktionellen Domänen (und damit auch der Bindungsstellen für die Inhibitoren) im gesamten Tierreich zurückzuführen (Hanks *et al.*, 1988; Hanks & Quinn, 1991). Dabei sind in der Regel die einzelnen Domänen von Tyrosinkinasen einer Familie oder Subfamilie einander ähnlicher, als diejenigen von TKs innerhalb eines Organismus unterschiedlicher (Sub-) Familien (vgl. Superti-Furga & Courtneidge, 1995; Knobloch *et al.*, 2002). TKs werden allerdings in erster Linie durch die Präsenz und die Anordnung von Domänen und nicht durch Sequenzähnlichkeiten klassifiziert (Thomas & Brugge, 1997; Hubbard & Till, 2000). Daher kann diese Regel im Laufe der Evolution durch den Austausch von einzelnen Domänen zwischen Molekülen verschiedener (Sub-) Familien (*domain-shuffling*) außer Kraft gesetzt werden (Saier & Reizer, 1990; Suga *et al.*, 2001). Betrifft das z.B. die katalytische Domäne, so würde das bedeuten, dass ein Inhibitor, der spezifisch gegen eine Familie gerichtet ist, in diesem Fall auch die TK einer anderen Familie blockiert. Um daher Aussagen über die Wirkung solcher Substanzen auf einzelne Moleküle machen zu können, müssen zuvor die Verwandtschaftsverhältnisse für die vom Inhibitor gebundenen Domänen durch phylogenetische Analysen überprüft werden.

Das Ziel der Inhibitorstudien an *Schistosoma* ist es, durch den Einsatz von PTK-Inhibitoren eine Veränderung von bestimmten biologischen Prozessen zu bewirken, die den Reifungsstatus der Weibchen anzeigen. Das ist nur dann sinnvoll, wenn diese Veränderungen durch die Wahl des Inhibitors in Zusammenhang mit bestimmten PTK-Familien oder gar einzelnen PTKs gebracht werden können. Daher wurden mit einzelnen Domänen von SmTK3, SmTK4 und SmTK5, die als Bindungsstelle für Inhibitoren in Frage kommen, phylogenetische Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die katalytischen Domänen der beiden Src-TKs, SmTK3

² Der IC_{50} gibt die Konzentration eines Inhibitors an, bei der *in vitro* die Aktivität des zu blockierenden Moleküls um 50% reduziert wird.

und SmTK5 signifikant größere Ähnlichkeiten zu den TK-Domänen anderer Src-TKs von Invertebraten und Vertebraten haben, als zu denen von Vertretern anderer TK-Familien. Entsprechendes gilt auch für die katalytische Domäne von SmTK4, die in einem Cladogramm in die Gruppe der Syk-TKs eingeordnet wird und von den PTKs anderer Familien deutlich distanziert liegt (Abb. 3-28). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Inhibitoren, die bei Vertebraten Src- bzw. Syk-TKs durch Bindung an die SH1-Domäne blockieren, auch auf diese *Schistosoma*-Moleküle wirken.

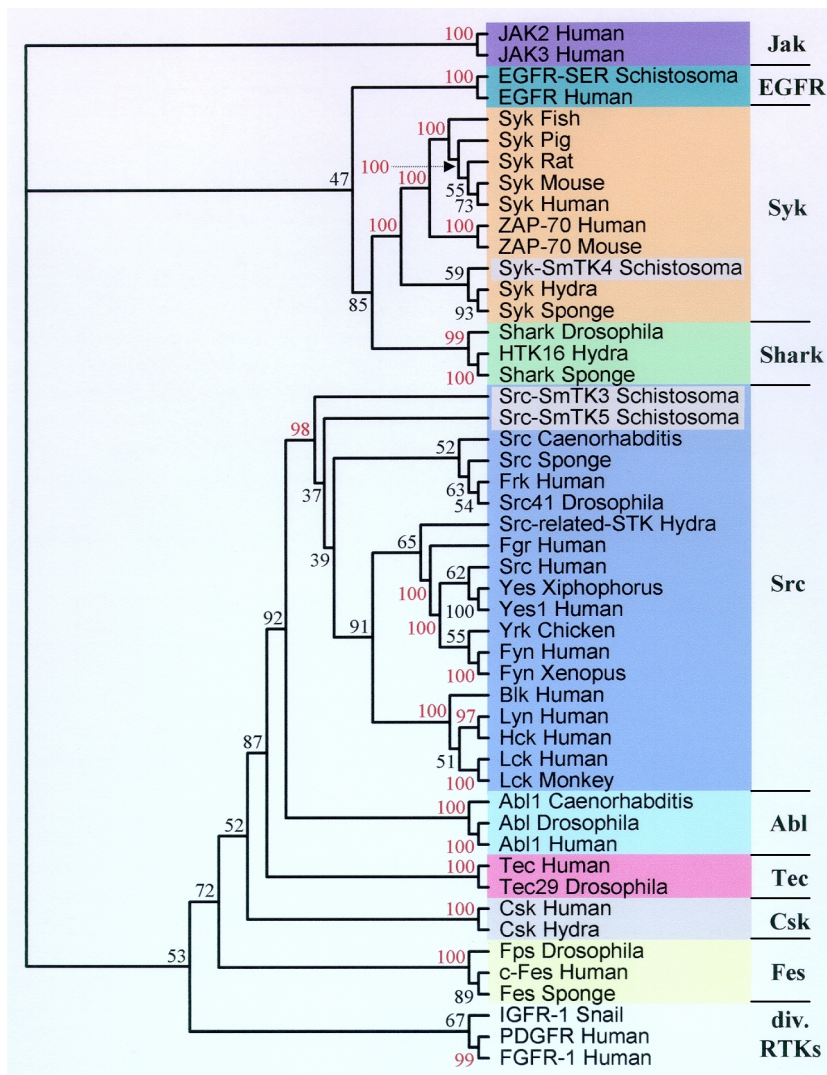


Abb. 3-28. Cladogramm der SH1-Domänen diverser PTKs. Das Alignment und der Tree wurden mit ClustalX erstellt. RTKs und TKs einer Familie sind durch farbige Unterlegung gekennzeichnet, der Familienname ist jeweils rechts angegeben. Rote Bootstrap-Werte kennzeichnen signifikante Knotenpunkte (Threshold: 95/100), Verzweigungen mit schwarzen Werten sind nicht signifikant. Die Kennungsnummern der einzelnen Proteine für die NCBI-Medline sind bei Knobloch *et al.* (2002) aufgeführt.

3.6.1.4. Behandlung von Schistosomen mit Tyrosinkinase-Inhibitoren

Die Behandlung der Würmer mit den hydrophoben Inhibitoren erfolgt in der *in vitro*-Kultur, welche die Haltung von Schistosomen für mehrere Wochen lang erlaubt (Grevelding *et al.*, 1997). Die in DMSO gelösten Inhibitoren werden dem Kulturmedium hinzugegeben. Es ist davon auszugehen, dass die Chemikalien über das Tegument aufgenommen werden (vgl. Kap. 1)

Um die Daten aus Versuchsreihen mit verschiedenen Inhibitoren und unterschiedlichen Zielprozessen miteinander vergleichen zu können, ist es notwendig, die experimentellen Bedingungen und dabei v.a. die Inkubationszeiten konstant zu halten. Auf der einen Seite bedarf es einer bestimmten Zeit, bis die Auswirkungen auf Zielprozesse, die durch Blockierung von Signalwegen hervorgerufen werden, deutlich genug sind, um detektiert werden zu können. Dafür scheint eine Inkubationszeit von zwei Tagen angemessen, da für die drei relevanten Zielprozesse DNA-Synthese, p14-Expression und Eiablage (vgl. Kap. 1) bereits bekannt ist, dass schon nach 48 Stunden Entpaarung signifikante Unterschiede zu gepaarten Weibchen bestehen (Kap. 3.5; Grevelding *et al.*, 1997). Andererseits sollte die Behandlungszeit mit einem Inhibitor möglichst gering gehalten werden, da sie vermutlich - wie die meisten Toxine - mit zunehmender Inkubationszeit lebenswichtige Funktionen eines vielzelligen Organismus negativ beeinflussen. In solchen Fällen können Veränderungen in den Zielprozessen nicht auf direkte, sondern nur auf sekundäre Wirkungen des Inhibitors zurückgeführt werden. Ob eine Inkubationszeit von 48 Stunden zu solchen Auswirkungen führt, wurde für jeden eingesetzten Inhibitor separat untersucht.

3.6.2. Der Tyrosinkinase-Inhibitor Butein

Für die initialen Versuchsreihen, mit denen der Einfluß von (PTK-) Inhibitoren auf die Reifung des Weibchens untersucht werden sollte, wurde das Polyphenol Butein aus Pflanzen gewählt (Abb. 3-29). Dieser Inhibitor hemmt die Aktivität von Tyrosinkinasen kompetitiv zu ATP, bindet also vermutlich an die *ATP binding site*. Butein blockiert präferentiell die Tyrosinkinaseaktivität von EGF-Rezeptoren (IC_{50} : 16 μ M für den humanen EGFR) im Vergleich zu Mitgliedern der Src-Familie (IC_{50} : 64 μ M für p60^{c-src}; Yang *et al.*, 1998). Die Inhibition weiterer PTKs bei vergleichbaren Konzentrationen kann nicht ausgeschlossen werden, da in diese Richtung keine weiteren Untersuchungen publiziert worden sind. Die Spezifität von Butein gegenüber PTKs zeigt sich darin, dass der IC_{50} bzgl. der Inhibition von Serin/Threoninkinasen bei über 500 μ M liegt (Yang *et al.*, 1998). Butein wurde trotz seiner vermutlich relativ geringen Selektion innerhalb der PTKs deshalb gewählt, um die Versuchsbedingungen für Studien mit Inhibitoren zu testen. Es sollte ein erster Eindruck erhalten werden, ob Chemikalien dieser Art tatsächlich das Potential haben, in Schistosomen einzudringen. Ferner sollte festgestellt werden, wie die Würmer auf solche Toxine in relativ geringer Dosierung reagieren. Mögliche Effekte sollten aber auch unter dem Gesichtspunkt der EGFR- und der Src-Hemmung betrachtet werden, da neben den Src-TKs SmTK3 und SmTK5 auch ein EGFR-homologer Rezeptor bei Schistosomen bekannt ist (Schoemaker *et al.*, 1992).

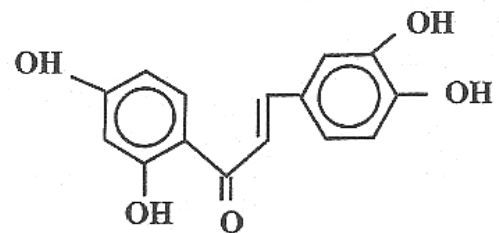


Abb. 3-29. Butein. 2',3,4,4'-Tetrahydroxychalcone, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der präferentiell EGF-Rezeptoren und Src-TKs inhibiert.

3.6.2.1. Einfluss von Butein auf das Paarungsverhalten und auf die Morphologie von Schistosomen

Eine Voraussetzung zur Untersuchung von Reifungsprozessen mit Inhibitoren ist, dass die Schistosomen während der gesamten Inkubationszeit gepaart bleiben (s. Kap. 1). Die Stabilität der Paarung ist in der *in vitro* Kultur vor allem in den ersten vier bis sechs Tagen anfällig gegen Veränderungen der äußeren Faktoren. Unter den etablierten Bedingungen kann der Paarungskontakt bei 90-100% der aus dem Endwirt isolierten Paare über mehrere Wochen hinweg aufrecht erhalten werden. Aber schon geringe Variationen im pH-Wert des Kulturmediums (M199), Temperaturschwankungen oder moderate mechanische Einwirkungen führen zur Entpaarung. Das zeigt, dass sich die Würmer unter den veränderten Bedingungen „unwohl“ fühlen, was in den ersten beiden Fällen wahrscheinlich auf Probleme im allgemeinen Stoffwechsel zurückzuführen ist. Eine rasche Entpaarung der Würmer ist ebenfalls zu erwarten, wenn der Inhibitor in Abhängigkeit von Zeit und Dosis eine toxische Wirkung entfaltet.

Die Bestimmung von Paarungsquoten unter Zugabe von Butein sollte zeigen, ob der Inhibitor die Paarung beeinträchtigt, und wenn ja, über welchen Zeitraum der Paarungskontakt aufrecht erhalten wird. Dazu wurden Schistosomenpaare direkt nach der Isolation aus dem Endwirt für 16 d mit verschiedenen Konzentrationen von Butein (16, 32 und 64 μM) bzw. ohne Butein (Kontrolle) in Kultur gehalten. Das Medium wurde jeden Tag zur gleichen Zeit vorsichtig gewechselt. In unregelmäßigen Abständen, aber mindestens einmal pro Tag wurde die Zahl der verbliebenen Paare³ bestimmt, entpaarte Schistosomen aber nicht aussortiert.

Es zeigte sich, dass sich die Paarungsquote bei der Zugabe von 16 μM Butein in den ersten sechs Tagen nicht signifikant von der unbehandelten Kontrolle unterscheidet. Ab dem siebten Tag jedoch nimmt die Anzahl der Paare stetig ab, bis nach 16 Tagen schließlich keine Paare mehr vorliegen. Die beiden höheren Konzentrationen bewirken eine beschleunigte Abnahme der Paarungsquote. Schon nach zwei Tagen bzw. wenigen Stunden treten signifikante Unterschiede zur Kontrolle auf (Abb. 3-30). Die Mortalitätsrate ist in allen Fällen bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Paarungsquote den Wert null erreicht hat, zu vernachlässigen (unter 1%).

Zur Absicherung und Erweiterung dieser Daten wurde der Einfluss von Butein auf die Re-Paarung unter Kulturbedingungen untersucht. Dazu wurden Paare nach der Isolation aus dem Endwirt zunächst voneinander getrennt und die beiden Geschlechter anschließend im Verhältnis 1:1 gemeinsam ohne und mit Zugabe von Butein (16 und 64 μM) kultiviert. Medienwechsel und Zählung erfolgte wie bei den Paarungsexperimenten. Die unbehandelten Würmer erreichten eine Re-Paarungsquote von ca. 90% nach zwei bis drei Tagen, was im üblichen Bereich liegt, und halten die Paarungskontakt für die weitere Inkubationszeit aufrecht. Bei einer Konzentration von 16 μM unterscheidet sich die Zahl der Re-Paarungen nicht signifikant von der unbehandelten Würmer, jedoch wird der Paarungskontakt ab dem sechsten Tag von einer zunehmenden Anzahl von Wümmern nicht mehr aufrecht erhalten. Bei der Zugabe von 64 μM Butein ist nur in Ausnahmefällen eine Re-Paarung zu beobachten. Nach 10 Tagen wurden die Versuchsreihen abgebrochen. Die Mortalitätsrate ist erneut vernachlässigbar.

Wie die meisten PTK-Inhibitoren ist Butein eine hydrophobe Chemikalie und wird daher in DMSO gelöst, bevor es zum Kulturmedium hinzugegeben wird. Durch separate Kontrollen

³ Zwei Würmer galten als gepaart, wenn mindestens die Hälfte des weiblichen Körpers vom Männchen umklammert war.

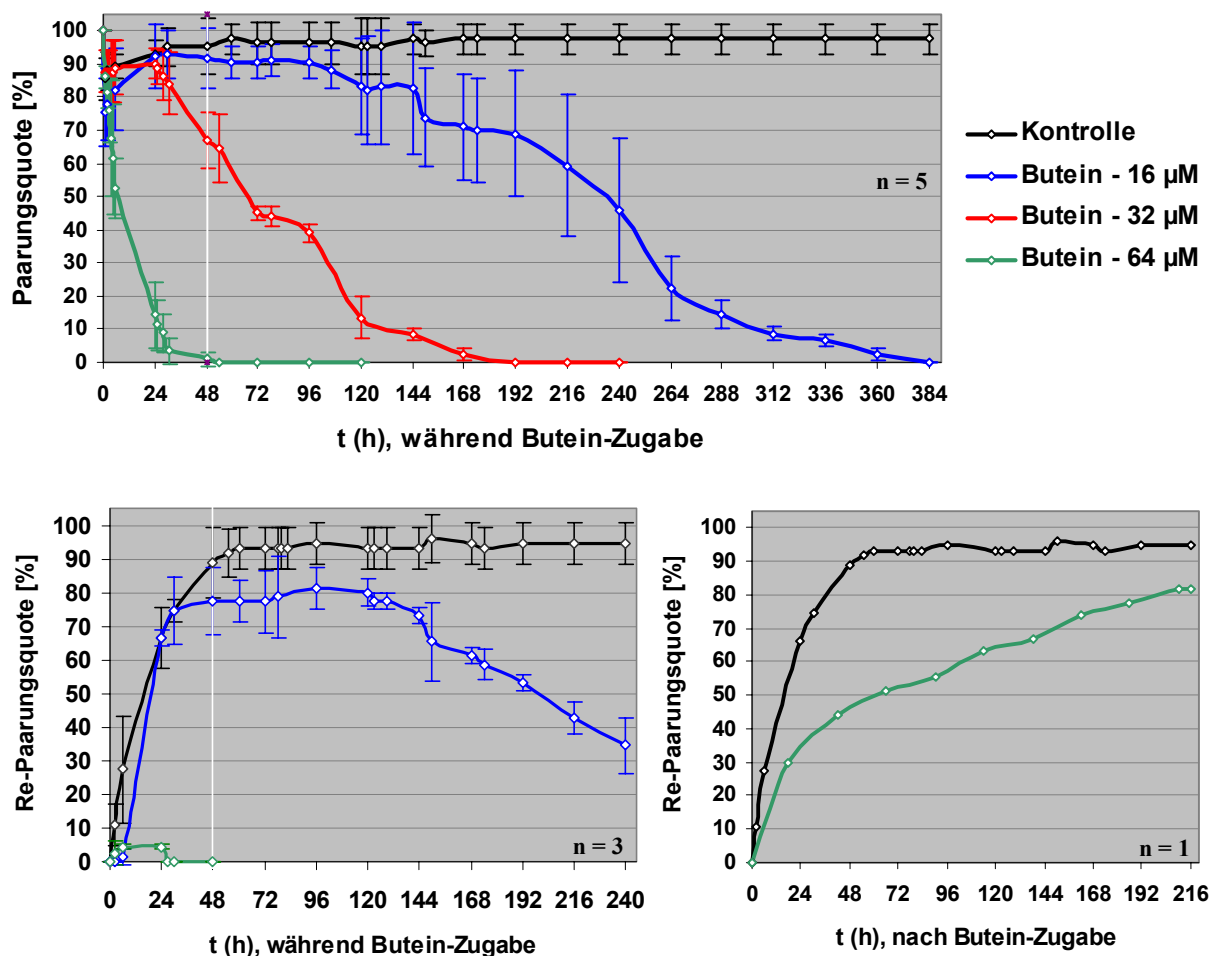


Abb. 3-30. Einfluss von Butein auf die Paarung und Re-Paarung adulter Schistosomen. In verschiedenen Versuchsreihen wurden 60 Würmer pro Ansatz für die angegebene Zeit (t) in Kultur gehalten. Die Anzahl der Paare zu bestimmten Zeitpunkten ist in den Grafiken als prozentualer Wert angegeben, der sich auf die maximal mögliche Anzahl bezieht. *Oben:* Paare wurden unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Butein bzw. ohne Butein (Kontrolle) kultiviert. *Unten, links:* Entpaarte Männchen und Weibchen wurden zusammen in An- und Abwesenheit von Butein in Kultur gehalten. *Unten, rechts:* Entpaarte Männchen und Weibchen wurden zunächst für 48 h getrennt voneinander in zwei Ansätzen einmal mit Butein (64 µM) und einmal ohne Inhibitor kultiviert. Anschließend wurden jeweils die beiden Geschlechter eines Ansatzes zusammen für 9 d in Kultur gehalten. n, Anzahl der unabhängigen Versuchsreihen; Standardabweichungen sind angegeben; die weiße Linie markiert eine Inkubationszeit von 48 h (siehe Text).

wurde überprüft, ob das Lösungsmittel die Paarung und/oder Re-Paarung beeinflusst. Dazu wurden Paarungs- und Re-Paarungsexperimente unter Zugabe von DMSO für eine Dauer von 16 Tagen durchgeführt. Innerhalb des gesamten Zeitraums konnte kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die in diesem Versuch eingesetzte DMSO-Konzentration (20 µg/ml) war deutlich höher wie diejenige, die maximal bei einem in dieser Arbeit beschriebenen Inhibitor-Versuch verwendet wurde. Daher gelten diese Kontrollen ebenso für die anderen Inhibitoren.

Die Behandlung mit 16 und 32 µM Butein in den Paarungs- und Re-Paarungsversuchen führte bei den Würmern zu keinen lichtmikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen. Das änderte sich jedoch bei einer Konzentration von 64 µM. Schon nach 12 h Inkubationszeit konnten in beiden Geschlechtern vereinzelt Schäden am Tegument festgestellt werden. Bei

vielen Weibchen traten zusätzlich deutlich sichtbare lokale Anschwellungen im anterioren Bereich in der Höhe des Ovars auf (Abb. 3-31). In den meisten Fällen gab es nur eine Anschwellung an derselben Stelle. Vereinzelt konnten jedoch auch Weibchen beobachtet werden, die ähnlich einer Perlenkette zwei bis sechs solcher Abnormitäten aufwiesen. Diese Anschwellungen zeigten sich posterior von der Ovar-Region in gleichmäßigen Abständen. Bei den Männchen hingegen fielen keine derartigen Veränderungen auf. Zur histologischen Untersuchung wurden Semidünnschnitte von Weibchen mit solchen morphologischen Veränderungen angefertigt. Bei Beobachtung unter dem Lichtmikroskop zeigte sich, dass die anteriore Anschwellung durch eine lokale Umstrukturierung der Gewebe bzw. Organe hervorgerufen wird. In diesem Bereich liegen Darm und Ovar dorsal verlagert, wobei das Ovar zusammengedrückt ist. Zudem erscheint die Position des Vitellariums in dieser Region ungewöhnlich, da einzelne Vitellarloben anterior vom Ovar lokalisiert sind. In den Bereichen außerhalb der Anschwellung und in unbehandelten Kontrollwürmern sind keine auffälligen Veränderungen sichtbar (Abb. 3-31).

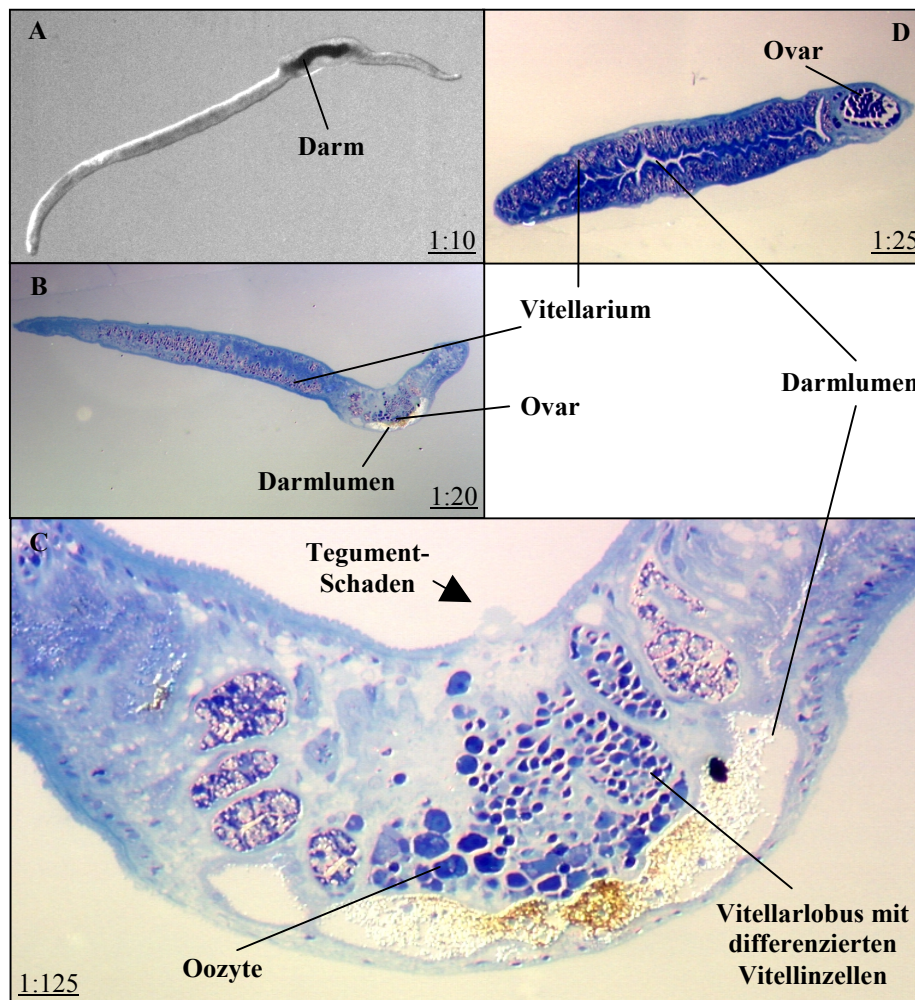


Abb. 3-31. Morphologische Veränderung weiblicher Schistosomen unter Einwirkung von Butein. Schistosomenpaare wurden für 16 h mit 64 μ M Butein inkubiert. Weibchen mit auffälligen morphologischen Veränderungen wurden unter dem Binokular aussortiert (A), fixiert und in Araldit eingebettet. Ausgewählte Semidünnschnitte wurden mit Toluidin-Blau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop analysiert (B-C). Zur Kontrolle wurden gepaarte Weibchen für die gleiche Zeit ohne Inhibitor kultiviert und ebenfalls histologisch ausgewertet (D). Vergrößerungen sind angegeben.

Die Auswirkungen von Butein auf die Paarungsquoten und auf die Morphologie zeigen, dass der Inhibitor in Abhängigkeit von Dosis und Zeit eine Wirkung auf Schistosomen hat, die nicht auf die äußeren Gewebeschichten beschränkt ist. Um relativ zuverlässige Aussagen über den Einfluß von Butein auf diverse weitere Zielprozesse (wie z.B. auf die DNA-Synthese) machen zu können, beträgt die maximale Inkubationszeit bei 16 μM fünf Tage, da der Inhibitor ab dem sechsten Tag den Paarungskontakt bei re-gepaarten Würmern negativ beeinflusst. In höheren Konzentrationen kann Butein nicht einmal für die angestrebte Inkubationszeit von 48 Stunden (s. 3.6.1.4) eingesetzt werden, da die Paarung schon früher signifikant gestört wird.

In einem Einzelexperiment wurden entpaarte Würmer beider Geschlechter, die für 48 h mit Butein behandelt worden waren, ohne weitere Zugabe des Inhibitors zur Re-Paarung weiter kultiviert. Nach acht bis neun Tagen wurde annähernd die Re-Paarungsquote der unbehandelten Kontrolle erreicht (Abb. 3-30). Die morphologischen Veränderungen konnten schon nach 24 Stunden kaum noch und nach 48 Stunden gar nicht mehr beobachtet werden. Das zeigt, dass die Wirkung von Butein reversibel ist.

3.6.2.2. Einfluss von Butein auf die DNA-Synthese gepaarter Schistosomen

Als nächstes wurde der Einfluss von Butein auf die DNA-Syntheseraten in adulten, gepaarten Schistosomen untersucht. Dazu wurden Paare direkt nach der Isolation aus dem Endwirt für 48 Stunden unter der Zugabe von BrdU und 16 bzw. 32 μM Butein in Kultur gehalten. Die Vergleichspopulation bestand aus Paaren, die für die gleiche Zeit ohne Zugabe von Inhibitor aber mit BrdU inkubiert wurden. Die Paarungsquoten glichen in allen Ansätzen den zuvor be-

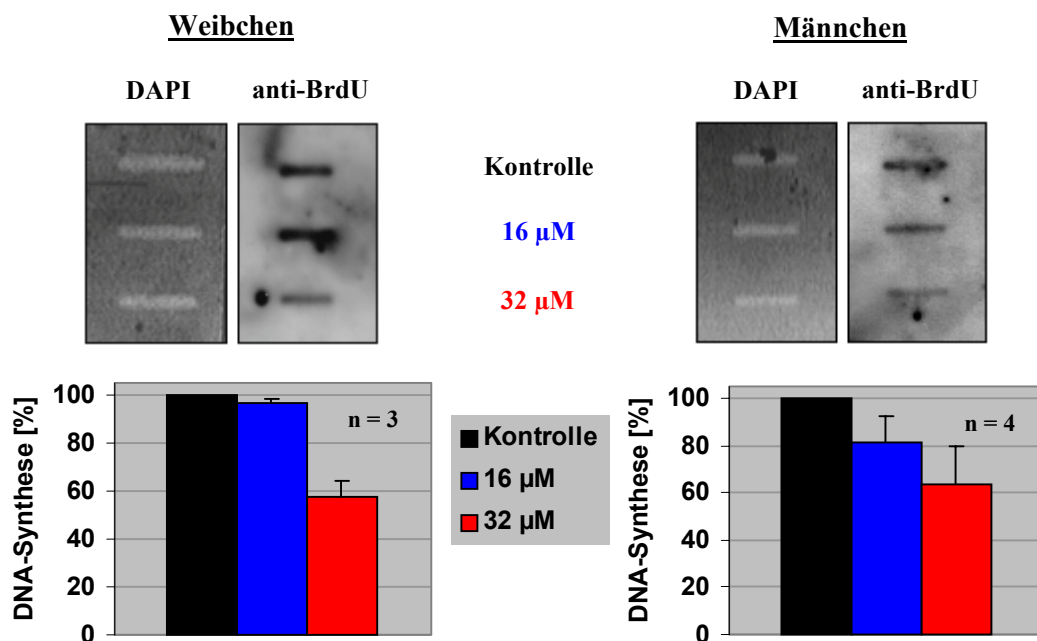


Abb. 3-32. Einfluss von Butein auf die DNA-Synthese in gepaarten Schistosomen. Paare wurden unter Zugabe von BrdU und verschiedenen Konzentrationen von Butein bzw. ohne den Inhibitor (Kontrolle) für zwei Tage in Kultur gehalten. Anschließend wurden die relativen DNA-Syntheseraten beider Geschlechter getrennt voneinander bestimmt. *Oben:* DAPI- und anti-BrdU-Färbung; ca. 500 ng DNA wurden aufgetragen. *Unten:* Graphische Auswertung von n Versuchsreihen. Die DNA-Syntheseraten sind als relative Werte angegeben, die sich auf die Kontrolle (100%) beziehen. n, Anzahl der unabhängigen Versuchsreihen; Standardabweichungen sind angeben

schriebenen Versuchsreihen (vgl. 3.6.2.1). Entpaarte Würmer wurden sofort aussortiert. Die anschließende Messung der relativen DNA-Syntheseraten zeigte, dass die mitotische Aktivität der Männchen bei einer Konzentration von 16 μM um ca. 20% reduziert wird. Die DNA-Syntheserate der Weibchen bleibt hingegen nahezu unverändert. Bei der Zugabe von 32 μM Butein nimmt auch die DNA-Syntheserate im Weibchen deutlich ab und die der Männchen wird weiter reduziert (Abb. 3-32). Dabei ist zu beachten, dass bei dieser Konzentration die Kulturbedingungen für die Schistosomen nicht mehr optimal sind, da vermehrt Entpaarungen auftreten (vgl. 3.6.2.1).

Um zu überprüfen, ob das Lösungsmittel die DNA-Synthese beeinflusst, wurden Wurm-paare für 48 Stunden unter Zugabe von DMSO in Kultur genommen. Der anschließende Vergleich mit unbehandelten Schistosomen zeigte, dass DMSO die mitotische Aktivität von gepaarten Weibchen und Männchen nicht verändert (Abb. 3-33; Daten nicht gezeigt). Die eingesetzte DMSO-Konzentration (20 $\mu\text{l/ml}$) ist deutlich höher als diejenige, die maximal bei einem in dieser Arbeit beschriebenen Inhibitor-Versuch verwendet wurde. Daher ist die DMSO-Kontrolle auch für die anderen Inhibitoren repräsentativ.

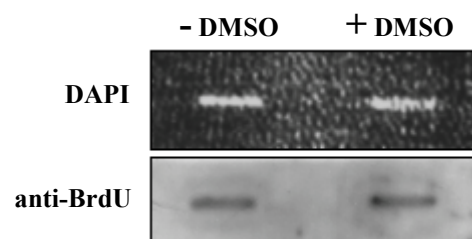


Abb. 3-33. Einfluss von DMSO auf die DNA-Synthese in gepaarten Weibchen. Paare wurden für zwei Tage in An- und Abwesenheit von 20 $\mu\text{l/ml}$ DMSO kultiviert. Von den Weibchen wurden anschließend die relativen DNA-Syntheseraten bestimmt. Gezeigt ist die DAPI-Färbung und die Autoradiographie nach der BrdU-Detektion. Ca. 300 ng DNA sind jeweils aufgetragen.

3.6.2.3. Einfluss auf die p14-Expression

Als repräsentatives Beispiel für die Untersuchungen der Expression von Eischalengenen in maturaen Weibchen unter Zugabe von Butein, wurde das p14-Gen (Koster *et al.*, 1988) verwendet. Dazu wurden Schistosomenpaare für 48 Stunden mit 16 und 32 μM Butein bzw. ohne Inhibitor kultiviert. Anschließend wurden die RNA aus den Weibchen der verschiedenen Ansätze separat extrahiert und eine quantitative Northern-Blot-Analyse mit einer p14-Sonde⁴ durchgeführt. Es zeigte sich, dass unter dem Einfluß von 16 μM Butein fast die doppelte Menge an p14-Transkripten nachgewiesen werden kann wie in der unbehandelten Kontrolle. Durch Zugabe von 32 μM Butein wird die Transkriptmenge hingegen auf gut die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abb. 3-34). Die Tatsache, dass das Lösungsmittel DMSO keinen Einfluß auf die p14-Expression hat, ist an anderer Stelle gezeigt (Kap. 3.6.3.3).

⁴ Als Sonde wurde das 3'-Ende des p14-Gens eingesetzt. Dazu wurde das Insert aus Klon 605 mit den Restriktion-senzymen *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten (350 bp).

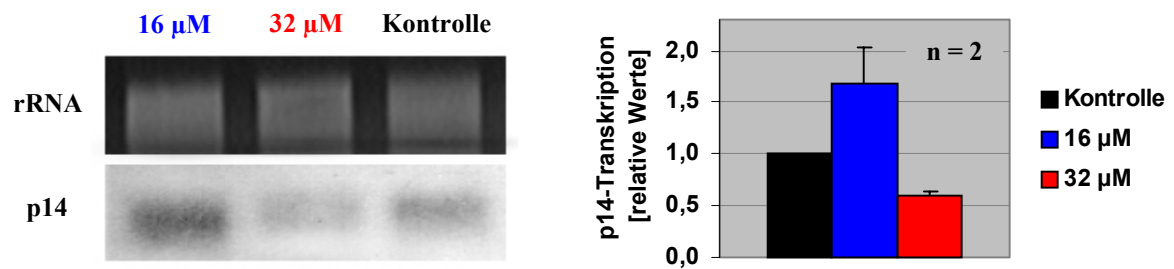


Abb. 3-34. Einfluß von Butein auf die p14-Transkription von gepaarten Weibchen. Paare wurden für 48 Stunden unter Zugabe von 16 µM und 32 µM Butein bzw. ohne Inhibitor (Kontrolle) kultiviert. Ca. 5 µg Total-RNA aus Weibchen von jedem Ansatz wurden auf einem 1.2%igen, denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und auf einem Filter transferiert. Die Hybridisierung der Membran mit einer AP-gekoppelten p14-Sonde, die stringente Waschungen und die Detektion erfolgten nach dem Standardprotokoll des „AlkPhos direct“ Kits (Amersham). Gezeigt sind die 18S-rRNA-Banden nach der Elektrophorese und die Autoradiographie. Zum relativen Abgleich der immobilisierten RNA-Mengen wurden die Intensitäten der 18s-rRNA-Banden densitometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der relativen Unterschiede in den einzelnen Ansätzen bzgl. der Transkriptmengen wurden die p14-Signalsintensitäten mittels Densitometrie bestimmt und in Relation zur transferierten RNA-Menge gesetzt. Der resultierende Wert für die Kontrolle wurde gleich 1 definiert, die anderen Werte darauf bezogen. Die relativen Werte aus n = 2 unabhängigen Versuchsreihen sind graphisch dargestellt; Standardabweichungen sind eingezeichnet.

3.6.3. Herbimycin A, ein selektiver Inhibitor für Tyrosinkinasen der Src-Familie

Im Anschluss an die Versuchsreihen mit dem eher allgemeineren PTK-Inhibitor Butein, sollte als nächstes eine Substanz eingesetzt werden, die selektiv Src-TKs und damit auch SmTK3 und/oder SmTK5 blockiert. Die Wahl fiel schließlich auf das Antibiotikum Herbimycin A, das ursprünglich aus verschiedenen *Streptomyces*-Arten isoliert worden ist (Abb. 3-35; Uehara & Fukazawa, 1991). Herbimycin A blockiert in geeigneter Dosierung selektiv die Phosphorylierungsreaktion von Tyrosinkinasen der Src-Familie. Dazu bindet das Antibiotikum an konservierte Bereiche innerhalb der katalytischen Domäne. Der IC_{50} bzgl. der Blockierung von $pp60^{c-src}$ liegt bei $0.9 \mu\text{M}$ (Uehara *et al.*, 1988; Fukazawa *et al.*, 1991 und 1994).

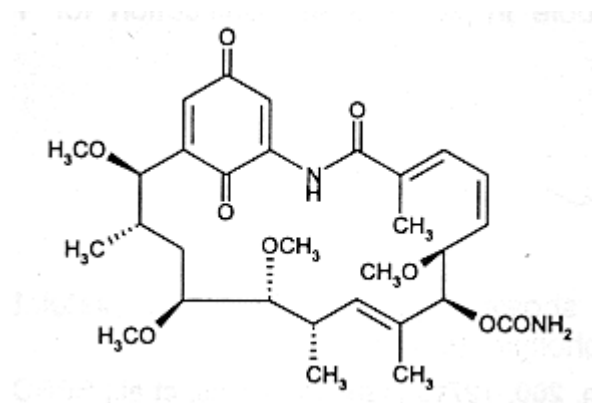


Abb. 3-35. Herbimycin A, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der selektiv Src-TKs blockiert.

3.6.3.1. Einfluss von Herbimycin A auf die Paarung von Schistosomen

Um die Auswirkungen von Herbimycin A auf den Paarungskontakt unter Kulturbedingungen zu untersuchen, wurde vorgegangen, wie es im Kapitel 3.6.2.1 für den Inhibitor Butein beschrieben ist. Die Paarungs- und Re-Paarungsquote bei einer Zugabe von $0.9 \mu\text{M}$ des Antibiotikums unterscheidet sich innerhalb der ersten fünf Tage nicht signifikant von der Kontrolle. Anschließend nimmt die Zahl der gepaarten Würmer jedoch stetig ab, bis nach spätestens 10 Tagen schließlich der Wert null erreicht wird. Wird die doppelte bzw. die fünffache Konzentration eingesetzt, dann unterscheiden sich die Paarungsquoten schon am vierten Tag signifikant von der unbehandelten Würmer. Die Re-Paarung unter Zugabe von $4.5 \mu\text{M}$ Herbimycin A gleicht innerhalb der ersten 24 Stunden der Kontrolle. In den folgenden 48 Stunden wird ein Großteil der Paarungen aufrecht erhalten, bevor sich innerhalb des vierten Tages schließlich alle Würmer entpaaren (Abb. 3-36). Innerhalb der 10-tägigen Inkubationszeiten wurden bei keinem der Ansätze morphologisch veränderte oder tote Schistosomen beobachtet. Zusammengefasst zeigen die (Re-) Paarungsversuche, dass der Inhibitor innerhalb einer Inkubationszeit von drei Tagen keine schwerwiegenden Auswirkungen auf den allgemeinen Stoffwechsel und die Lebensqualität der Schistosomen hat. Das ändert sich jedoch in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration ab dem vierten bis sechsten Tag. Daraus resultiert, dass für die Untersuchungen der weiteren Ziel-

prozesse eine Inkubationszeit von zwei Tagen - entsprechend zu den Versuchsreihen mit Butein - vertretbar ist.

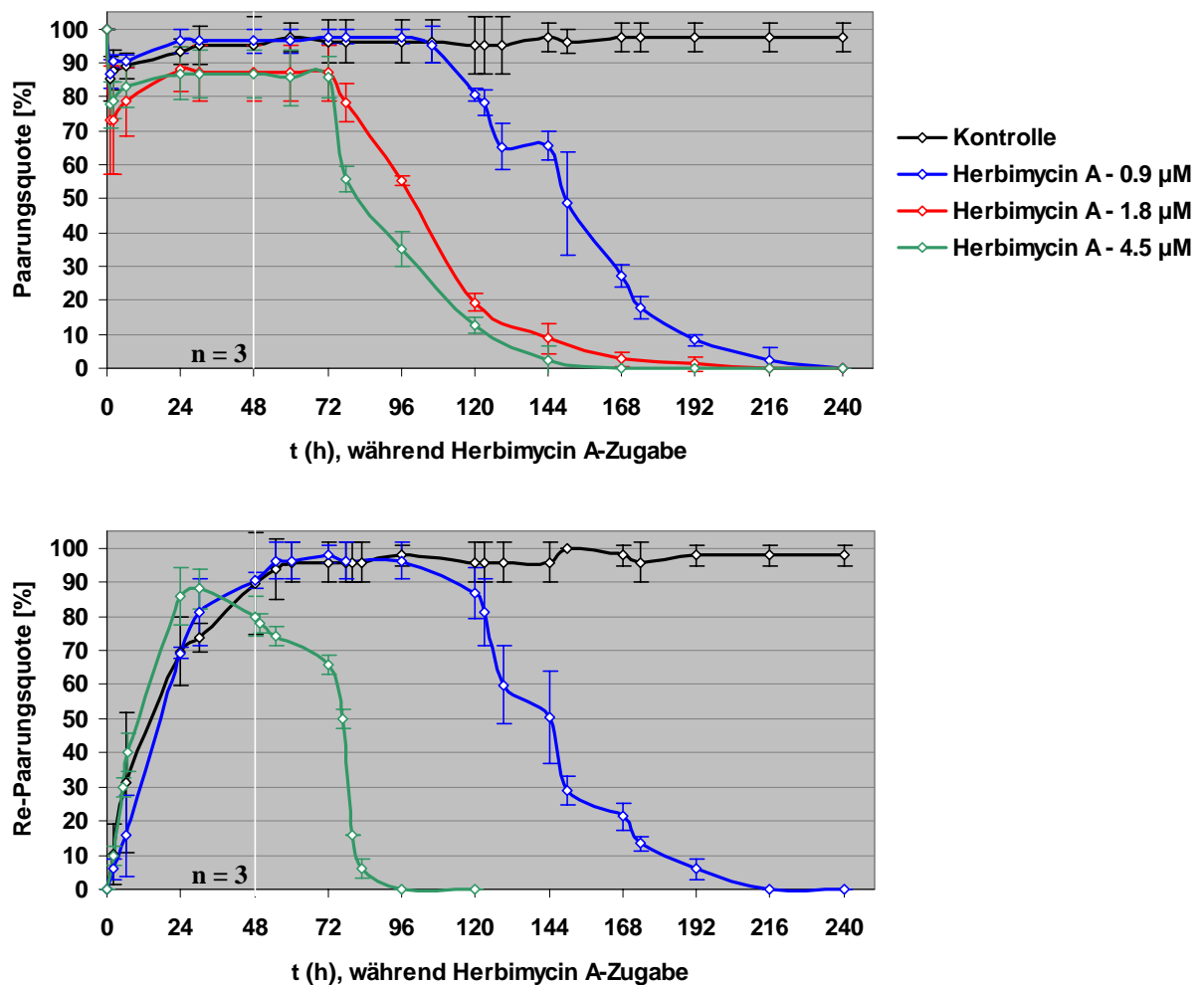


Abb. 3-36. Einfluss von Herbimycin A auf die Paarung und Re-Paarung adulter Schistosomen. In verschiedenen Versuchsreihen wurden 60 Würmer pro Ansatz für die angegebene Zeit (t) in Kultur gehalten. Die Anzahl der Paare zu bestimmten Zeiten ist angegeben als prozentualer Wert, der sich auf die maximal mögliche Anzahl bezieht. *Oben:* Paare wurden unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Herbimycin A bzw. ohne Herbimycin A (Kontrolle) kultiviert. *Unten:* Entpaarte Männchen und Weibchen wurden zusammen in An- und Abwesenheit von Herbimycin A in Kultur gehalten. n, Anzahl der unabhängigen Versuchsreihen; Standardabweichungen sind angegeben; die weiße Linie markiert eine Inkubationszeit von 48 h (siehe Text).

3.6.3.2. Einfluss von Herbimycin A auf die DNA-Synthese gepaarter Schistosomen

Um die Wirkung von Herbimycin A auf die DNA-Synthese in adulten Schistosomen zu untersuchen, wurden Wurmpaare für 48 Stunden unter Zugabe von BrdU und verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors kultiviert. Als Kontrolle wurden Paare ohne Inhibitor aber mit BrdU für den gleichen Zeitraum in Kultur gehalten. Entpaarte Würmer wurden sofort aussortiert. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die beiden Geschlechter jeweils voneinander getrennt

und separat behandelt. Die Bestimmung der DNA-Syntheseraten erfolgte wie zuvor beschrieben (Kap. 3.4), die prozentualen Werte beziehen sich auf die gepaarten, unbehandelten Würmer des jeweiligen Geschlechts (100%). Es zeigt sich, dass Herbimycin A die DNA-Synthese in gepaarten, maturaen Weibchen signifikant reduziert (Abb. 3-37). Je höher die eingesetzte Konzentration, um so deutlicher ist der Effekt. Die Dosis von Herbimycin A, die dem IC_{50} entspricht, bewirkt eine Verringerung der mitotischen Aktivität bei Weibchen um gut 25%. Durch das zehnfache dieser Konzentration wird die Zellteilungsrate um ca. 75% reduziert. Auf die Zellproliferation gepaarter Männchen hingegen hat Herbimycin A keinen Einfluss. Selbst bei einer Konzentration vom $9.0 \mu\text{M}$ findet keine Reduzierung der DNA-Syntheserate statt (Abb. 3-37).

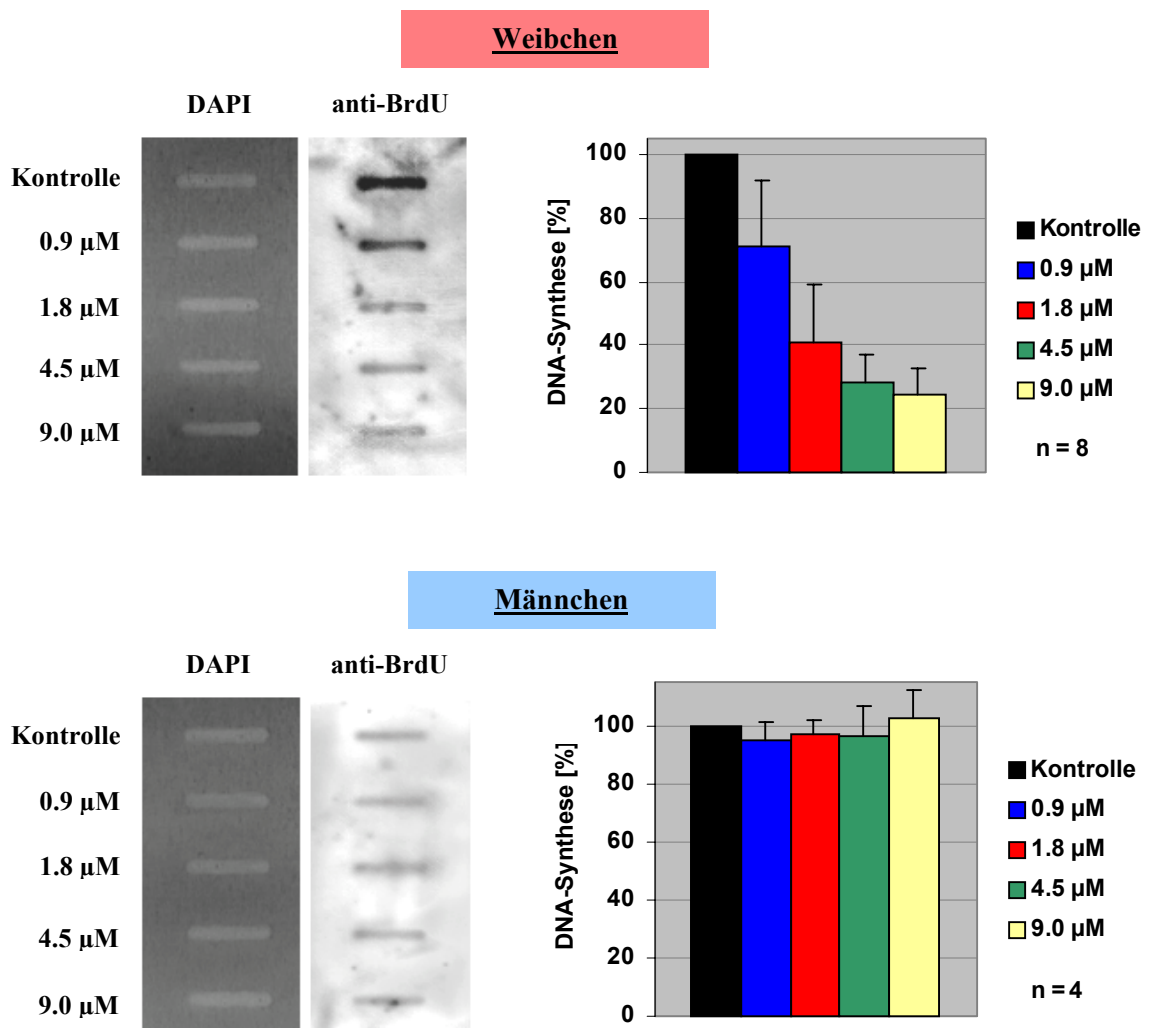


Abb. 3-37. Einfluss von Herbimycin A auf die DNA-Synthese in gepaarten Schistosomen. Paare wurden unter Zugabe von BrdU und verschiedenen Konzentrationen von Herbimycin A bzw. ohne den Inhibitor (Kontrolle) für zwei Tage in Kultur gehalten. Anschließend wurden die relativen DNA-Syntheseraten beider Geschlechter getrennt voneinander bestimmt. *Links:* DAPI- und anti-BrdU-Färbung; ca. 500 ng (Weibchen-) bzw. 400 ng (Männchen-) DNA wurden aufgetragen. *Unten:* Graphische Auswertung von n Versuchsreihen. Die DNA-Syntheseraten sind als relative Werte angegeben, die sich auf die Kontrolle beziehen. n, Anzahl der unabhängigen Versuchsreihen; Standardabweichungen sind angegeben

3.6.3.3. Einfluss von Herbimycin A auf die p14-Expression in gepaarten und entpaarten Weibchen

Für die Untersuchungen der p14-Transkription unter Zugabe von Herbimycin A wurden Wurmpaare für zwei Tage mit verschiedenen Konzentrationen (0.9 μM und 4.5 μM) von Herbimycin A kultiviert. Zum Vergleich wurden zwei Ansätze ohne Inhibitor, einer davon jedoch unter Zugabe des Lösungsmittels DMSO durchgeführt. Die Konzentration an DMSO betrug 5 $\mu\text{l/ml}$ und liegt damit deutlich über der Konzentration, die auch bei anderen Inhibitoren zur Untersuchung der p14-Expression eingesetzt worden ist. Die anschließende quantitative Northern-Blot-Analyse mit einer p14-Sonde erfolgte wie in Kapitel 3.6.2.3 beschrieben. Bei gepaarten Weibchen, die mit 0.9 μM Herbimycin A behandelt worden waren, wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die 2.5-fache Menge an Transkripten nachgewiesen. Die fünffache Konzentration des Inhibitors bewirkte eine moderate Verstärkung des Effektes. DMSO hingegen hat unter den gegebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die p14-Transkription (Abb. 3-38).

Es stellte sich die Frage, ob dieser Effekt von Herbimycin A auf die p14-Transkription von dem Paarungskontakt zu einem Männchen abhängig ist. Um dem nachzugehen, wurden Versuche an entpaarten Weibchen unternommen. Dazu wurden Weibchen aus bestehenden Paaren zunächst vom Männchen getrennt und dann für einen Tag ohne Zugabe von Inhibitor kultiviert. Diese Weibchen wurden für vier verschiedene Ansätze verwendet. Zwei Populationen wurden für weitere 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Herbimycin A (0.9 μM , 4.5 μM) behandelt. Zwei Kontrollpopulationen wurden für den gleichen Zeitraum ohne Inhibitor kultiviert, eine davon jedoch unter Zugabe von DMSO (5 $\mu\text{l/ml}$). Als weitere Kontrolle wurden gepaarte Weibchen in einem fünften Ansatz ohne DMSO und ohne Inhibitor für insgesamt drei Tage in Kultur gehalten. Die quantitative Northern-Blot-Analyse mit einer p14 Sonde bestätigte zunächst einmal publizierte Daten, indem gezeigt wurde, dass die p14-Expression paarungsabhängig ist (Grevelding *et al.*, 1997). Eine dreitägige Entpaarung bewirkte eine Reduktion der p14-Transkription um ca. 75% (Abb. 3-38). Herbimycin A jedoch bewirkte in entpaarten Weibchen das Gegenteil. In den behandelten Weibchen wurde ein drei- bis vierfacher Anstieg verglichen mit den unbehandelten Weibchen nachgewiesen und das unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen IC_{50} bis $5 \times \text{IC}_{50}$ und vom Lösungsmittel DMSO (Abb. 3-38). Damit gleicht die p14-Transkriptionsrate entpaarter, behandelter Weibchen, der von gepaarten, unbehandelten Weibchen.

Als nächstes wurde der Einfluss von Herbimycin A auf die Synthese von p14-Proteinen bei gepaarten Weibchen untersucht. Dazu wurden die gleichen Kulturbedingungen gewählt, wie zuvor bei der quantitativen Northern-Blot-Analyse, lediglich auf den Ansatz mit 0.9 μM Herbimycin A wurde verzichtet. Aus den Weibchen verschiedener Ansätze wurden die Proteine extrahiert und per Slot-Blot auf einen Filter transferiert. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich Gesamtprotein von unbehandelten Männchen aufgetragen. Zum Mengenabgleich wurden die immobilisierten Proteine mit Ponceau-Rot gefärbt und die resultierenden Signalintensitäten densitometrisch bestimmt. Anschließend erfolgte die Umsetzung mit einem anti-p14-Serum und die Detektion der Immunkomplexe. Die resultierenden Signalintensitäten von jedem Ansatz wurden durch Densitometrie gemessen. Von diesen Werten wurde zunächst der Hintergrund der Antikörperreaktion in Form der unspezifischen Bindung an Männchen-Proteine abgezogen. Anschließend wurden die Werte zunächst in Relation zur immobilisierten Proteinmenge gesetzt und daraufhin miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass sich in Herbimycin A-behandelten

Weibchen die 4-fache Menge an p14-Protein im Vergleich zu unbehandelten Weibchen nachweisen lässt. DMSO hat keinen Einfluss auf die Proteinsynthese von p14 (Abb. 3-38).

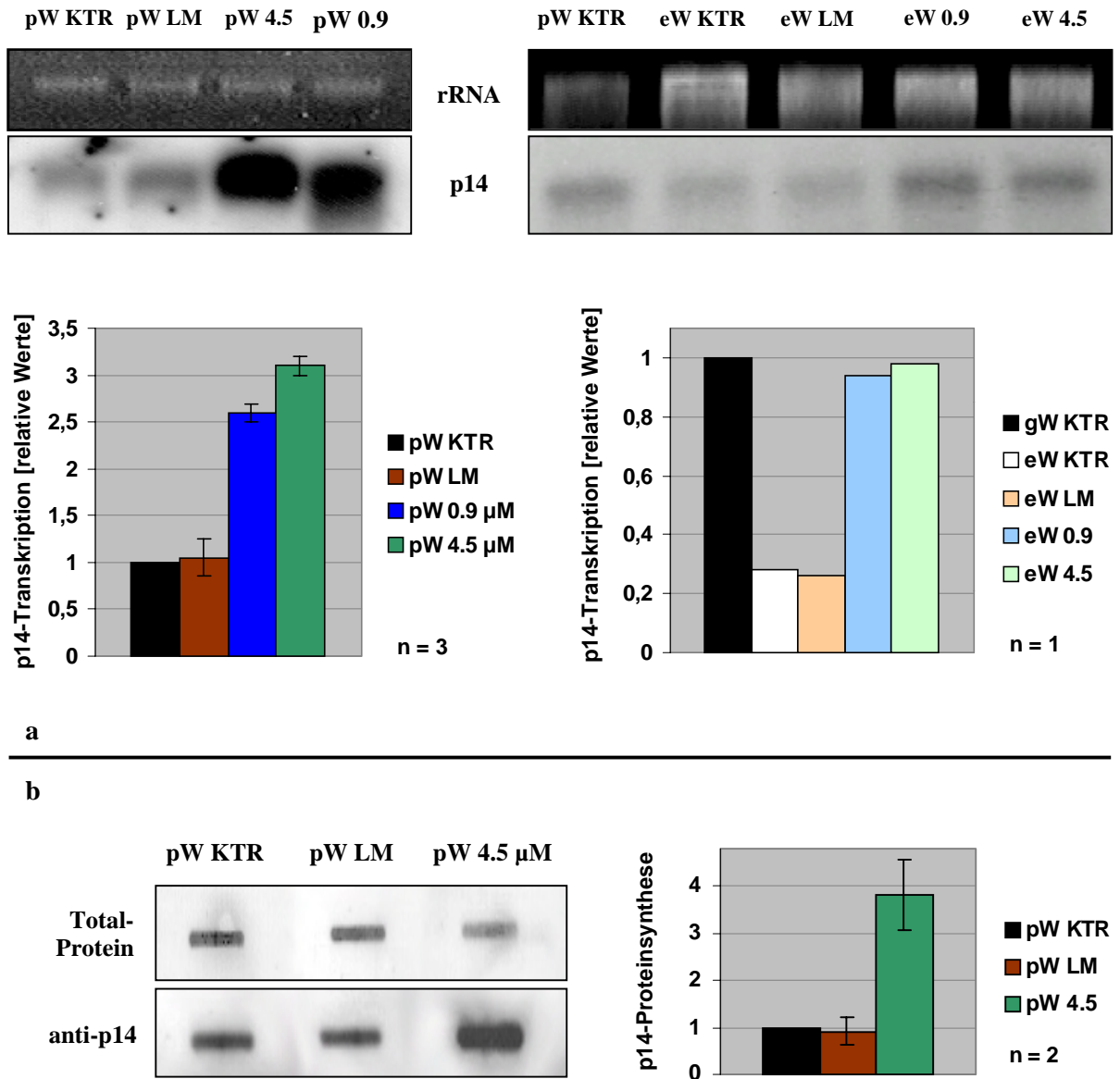


Abb. 3-38. Einfluss von Heribimycin A auf die p14-Expression. a: Gepaarte (pW) und entpaarte (eW) Weibchen wurden unbehandelt (KTR), unter Zugabe von DMSO (LM) oder mit verschiedenen Konzentrationen an Heribimycin A (0.9 μ M, 4.5 μ M) kultiviert. Die Menge an p14-Transkripten wurde bestimmt, wie es in Kap. 3.6.2.3 beschrieben ist; gezeigt sind die 18S-rRNA-Banden nach der Elektrophorese und die Autoradiographie (oben). Die relative Werte beziehen sich auf die gepaarten, unbehandelten Weibchen und sind graphisch dargestellt. b: Gepaarte Weibchen wurden unbehandelt, unter Zugabe von DMSO oder mit 4.5 μ M Heribimycin A kultiviert. Proteinextrakte aus den Weibchen-Populationen und unbehandelten Männchen (nicht gezeigt) wurden auf einen Filter transferiert, mit Ponceau-Rot gefärbt (Total-Protein) und mit p14-Antiserum (α Sx1,1:500) umgesetzt. Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte über einen AP-gekoppelten Zweitantikörper (anti-Kaninchen IgG, 1:15.000) CDP-Star und Autoradiographie (anti-p14). Die Unterschiede in der Menge an p14-Proteinen von jedem Ansatz sind graphisch dargestellt. n, Anzahl der unabhängigen Versuchsreihen; Standardabweichungen sind jeweils angegeben.

3.6.3.4. Einfluss von Herbimycin A auf die Eiablage

Zur Untersuchung der Wirkung von Herbimycin A auf die Eiproduktion wurden in verschiedenen Ansätzen Schistosomenpaare und isolierte Weibchen für einen Tag nach der Präparation aus dem Endwirt kultiviert. Anschließend wurden die bis dahin gelegten Eier entfernt und die Kultivierung entweder ohne weitere Behandlung oder unter Zugabe von DMSO bzw. mit Herbimycin A (0.9 μM oder 4.5 μM) fortgesetzt. Nach 24 Stunden wurden die abgelegten Eier ausgezählt und erneut entfernt. Die Kultivierung wurde unter den gleichen Bedingungen für weitere 24 Stunden fortgesetzt und die Versuchsreihe mit der erneuten Auszählung der produzierten Eier abgeschlossen. Es deutete sich zunächst einmal an, dass mit zunehmender Dauer der Kultivierung die Eiproduktion nachlässt, da ein unbehandeltes, gepaartes Weibchen an Tag 2 im Durchschnitt noch ca. 27 Eier produzierte, an Tag 3 aber nur noch 22. Der Unterschied ist zwar deutlich, wenn auch nicht signifikant, und weist auf die bekannte Tatsache hin, dass die Kulturbedingungen nicht optimal für die Fortpflanzung von Schistosomen sind. Weiterhin bestätigt diese Versuchsreihe publizierte Daten, die zeigen, dass die Eiproduktionsrate paarungsabhängig ist und mit andauernder Trennung vom Männchen stetig sinkt (Kunz, 2001). Im Vergleich zu gepaarten Weibchen wird die Eiproduktion bei entpaarten Weibchen auf knapp 40% an Tag 2 und auf weniger als 20% an Tag 3 in Kultur reduziert. Nach 24-stündiger Inkubation mit Herbimycin A legen sowohl gepaarte als auch entpaarte Weibchen nur noch ca. 50% der Menge an Eiern ab wie entsprechend unbehandelte Weibchen. Nach 48-stündiger Inkubation mit dem Inhibitor wird die Menge bei gepaarten Weibchen signifikant auf knapp 25%, bei entpaarten Weibchen auf gut 30% reduziert. Diese Effekte sind in geringem Maße Dosis-abhängig; das Lösungsmittel DMSO hat weder bei gepaarten noch bei entpaarten Weibchen einen Einfluss auf die Eiproduktion (Abb. 3-39).

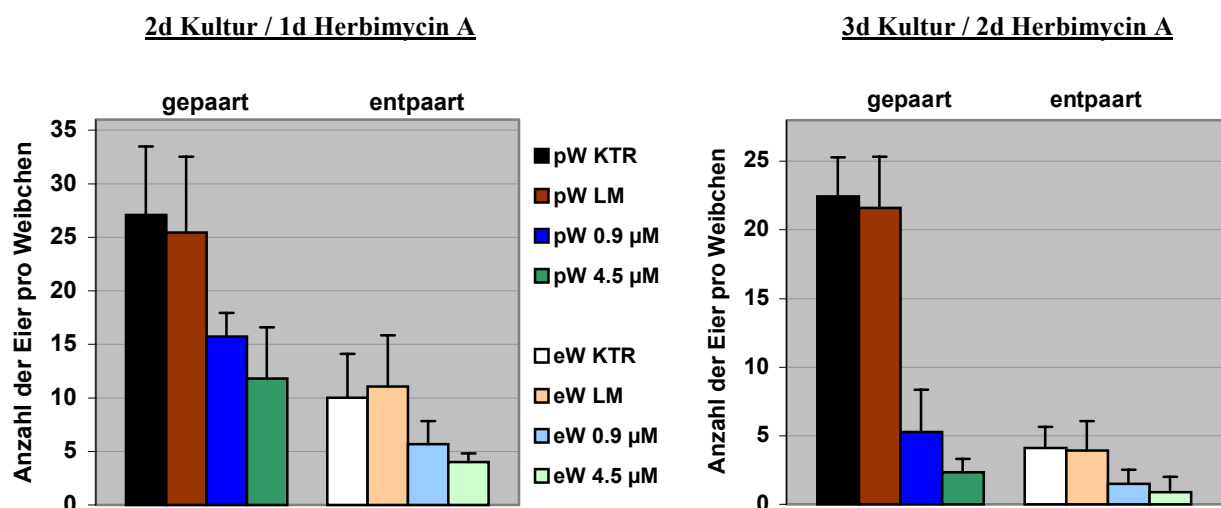


Abb. 3-39: Wirkung von Herbimycin A auf die Eiablage. Schistosomenpaare und isolierte Weibchen wurden in getrennten Ansätzen für einen Tag nach der Isolation aus dem Endwirt kultiviert. Nach Überführung in neue Kulturschalen mit frischem Medium (20 Würmer/Schale) wurde die Kultivierung gepaarter (pW) und entpaarter (eW) Weibchen unter verschiedenen Bedingungen fortgesetzt: Ohne weitere Behandlung (KTR), unter Zugabe von DMSO (8 $\mu\text{l/ml}$, LM) oder unter Behandlung mit Herbimycin A (0.9 μM oder 4.5 μM). Nach 24 Stunden wurden die abgelegten Eier ausgezählt (2d Kultur / 1d Herbimycin A) und durch Wechsel des Mediums entfernt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation unter denselben Bedingungen wurde erneut die Eiproduktionsrate bestimmt (3d Kultur / 2d Herbimycin A). Die Grafiken fassen jeweils vier Versuchsreihen zusammen.

In vitro abgelegte Schistosomen-Eier unterscheiden sich phänotypisch von denen, die im Endwirt produziert werden. Die Eier aus der Kultur sind schmäler, so dass der Stachel größer erscheint. Während die Eier im Endwirt verschiedene Gewebeschichten penetrieren, um von den Blutgefäßen in den Darm zu gelangen, sondern sie nicht nur Substanzen wie z.B. Proteasen ab, sondern sie nehmen auch Nährstoffe auf, wodurch ihr Volumen vergrößert wird. Diese Vorgänge finden bei Eiern in der Kultur nicht statt, so dass ihr Volumen reduziert bleibt. Im Rahmen dieser Studien wurde beobachtet, dass ein Teil der Eier, der von Herbimycin A-behandelten Weibchen abgelegt wurde, zusätzliche phänotypische Abnormitäten aufwies. Das betrifft vor allem die Form, in einigen Fällen aber auch die Pigmentierung der Eier (Abb. 3-40). Die Anzahl der deformierten Eier variierte stark in den verschiedenen Ansätzen, eine präzise Quantifizierung wurde nicht durchgeführt. Die Eier, die von DMSO-behandelten Weibchen produziert wurden, zeigten keine Abnormitäten. Daraus folgt, dass sich Herbimycin A auch auf die Morphologie der Eier auswirkt.

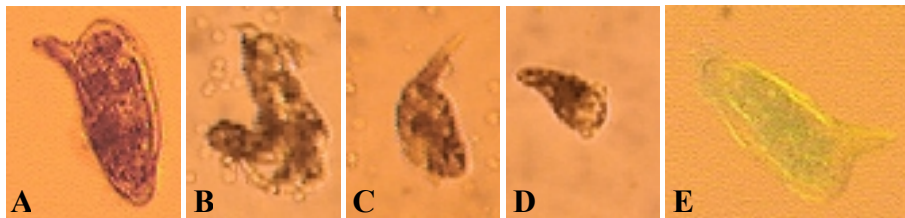


Abb. 3-40. Schistosomen-Weibchen produzieren abnormale Eier bei Behandlung mit Herbimycin A. Gezeigt sind Eier, die nach zwei Tagen Inkubation mit dem Inhibitor von gepaarten Weibchen abgelegt worden sind. A: Phänotypisch normales Ei unter Kulturbedingungen. B-D: Abnormal geformte Eier. E: Abnormal pigmentiertes Ei. Vergrößerung: 1:200.

3.6.3.5. Tyrosinphosphorylierung bei gepaarten Schistosomen unter dem Einfluss von Herbimycin A

Die Tyrosinphosphorylierung ist eine der wichtigsten kovalenten Modifikationen von bestimmten Molekülen als Resonanz auf inter- und intrazelluläre Kommunikationsprozesse und ist essentiell für eine Vielzahl von Abläufen und Ereignissen in vielzelligen Organismen. Ein Vergleich der Tyrosinphosphorylierungsmuster behandelter und unbehandelter Weibchen sollte zeigen, in welchem Maße Herbimycin A die Signaltransduktion beeinflusst. Für den Fall, dass die Auswirkungen auf die DNA-Synthese und die p14-Expression auf die Blockierung weniger Src-TKs in spezifischen Signalwegen zurückzuführen ist, sind nur einzelne, distinkte Veränderungen im Phosphorylierungsmuster zu erwarten. Beeinflusst Herbimycin A allerdings eine große Anzahl von Signalwegen, dann sollten auch die Unterschiede entsprechend groß sein. Die Auswirkungen auf die Zielprozesse wären dann wahrscheinlich sekundärer Natur, also nicht direkt auf die Inhibierung einer Src-TK zurückzuführen.

Schistosomenpaare wurden unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Herbimycin A bzw. ohne Inhibitor für 48 Stunden in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Weibchen von den Männchen noch in Herbimycin-haltigem Medium getrennt und unmittelbar

danach eingefroren. Da Phosphorylierungen schnell ablaufende Ereignisse sind, wurde darauf geachtet, dass der Zeitraum von der Trennung bis zum Einfrieren möglichst kurz gehalten wird (max. 20 sec). Würmer, bei denen dieser Zeitraum nicht eingehalten werden konnte, wurden verworfen. Von den Weibchen der verschiedenen Ansätze wurden (denaturierte) Proteinextrakte hergestellt und auf einem Western-Blot mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper umgesetzt. Da in einem Organismus viele Proteine an Tyrosinen phosphoryliert werden, wurde die Expositionszeit relativ kurz gehalten, um nach der Detektion distinkte Signale zu erhalten. In den verschiedenen Ansätzen konnten jeweils die gleichen neun Proteine detektiert werden. Für acht der Signale wurden jeweils im Vergleich von behandelten und unbehandelten Weibchen keine Unterschiede in der Intensität festgestellt. Das neunte Signal in der Höhe von 70 kD ist jedoch bei den unbehandelten Weibchen deutlich stärker als den behandelten Weibchen (Abb. 3-41). Bemerkenswert ist, dass es sich dabei um einen Größenbereich handelt, dem auch SmTK3 und SmTK5 zuzuordnen sind. Um eventuelle Kreuzreaktionen durch den Zweitantikörper auszuschließen, wurde Gesamtprotein aus Weibchen per Western Blot nur mit dem Zweitantikörper umgesetzt. Dabei wurden keine Signale erhalten (Abb. 3-41).

Für die Auswertung dieses Versuches ist es wichtig zu beachten, dass nur über einen äußerst geringen Anteil aller im Weibchen tyrosinphosphorylierten Proteine eine eindeutige Aussage gemacht werden kann. Trotzdem folgt aus diesen Daten, dass sich das Tyrosinphosphorylierungsmuster bei Weibchen unter dem Einfluss von Herbimycin A sehr wahrscheinlich nicht weitreichend, sondern in begrenztem Umfang verändert. Das spricht für eine spezifische und moderate Wirkung des Inhibitors unter den gegebenen Bedingungen. Damit geben die Resultate einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Auswirkungen auf die Zielprozesse nicht auf eine Blockierung zahlreicher Signalwege zurückzuführen ist.

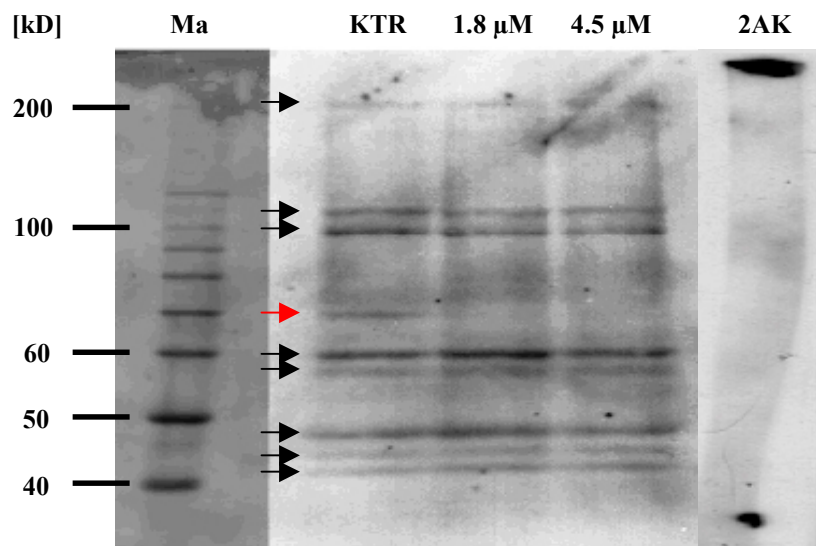


Abb. 3-41. Einfluss von Herbimycin A auf die Tyrosinphosphorylierung bei Weibchen. Gepaarte Würmer wurden mit 1.8 μM und 4.5 μM Herbimycin A bzw. ohne Inhibitor (KTR) für zwei Tage kultiviert. Je 40 μg Total-Proteinextrakt aus den Weibchen wurden auf einem 10%igen, denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt, anschließend auf einen Filter transferiert und mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper (p-Tyr 100, NE BioLabs; 1:2.000) umgesetzt. Die Detektion erfolgte über einen AP-gekoppelten Zweitantikörper (Anti-Maus IgG; 1:20.000), CDP-Star und Autoradiographie. Die Expositionszeit betrug zwölf Stunden. Schwarze Pfeile markieren distinkte Banden, die in allen drei Ansätzen in gleicher Intensität vorliegen. Der rote Pfeil markiert eine Bande, die in der Intensität variiert. 2AK: Zweitantikörper-Kontrolle. Proteinextrakte unbehandelter Weibchen wurden aufgetragen und anschließend mit dem Zweitantikörper (1:1.000) umgesetzt. Ma: 10 kD-Leiter.

3.6.3.6. Die Interaktion von Herbimycin A mit SmTK3

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Auswirkungen von Herbimycin A mit der Blockierung der bereits bekannten Src-TKs von *Schistosoma* in Zusammenhang gebracht werden können. Es ist beschrieben, dass Herbimycin A neben der Unterbindung des Phosphotransfers auch die Degradation einiger Src-TKs durch De-Stabilisierung bewirkt (Uehara *et al.*, 1988; Fukazawa *et al.*, 1994). Um zu untersuchen, ob Herbimycin A auch die Stabilität von SmTK3 beeinflusst, wurden aus *Schistosoma*-Pärchen Proteine nativ und ohne Zugabe von Protease-Inhibitoren extrahiert und für 90 min mit und ohne Herbimycin A bei 20°C und bei 30°C inkubiert. Durch die native Isolierung der Proteine sollte erreicht werden, dass aktive Proteasen im Extrakt erhalten bleiben und durch Herbimycin A de-stabilisierte Proteine abbauen. Eine quantitative Western-Blot-Analyse mit dem anti-SmTK3-Antikörper zeigte eine Temperatur-abhängige Degradation von SmTK3, die durch Herbimycin A bewirkt wird. Bei 20°C konnte keine Degradation von SmTK3-Proteinen nachgewiesen werden. Wurde die Temperatur jedoch auf 30°C erhöht, dann bewirkte die Anwesenheit des Inhibitors eine Reduzierung der Menge an SmTK3-Protein auf weniger als 50% im Vergleich zum Ansatz ohne Herbimycin A (Abb. 3-42, unten). Ob die Temperatur-Abhängigkeit dieses Effektes aus einer erhöhten Aktivität der Proteasen bei 30°C oder aus der beschriebenen effektiveren Bindung von Herbimycin A an Tyrosinkinasen *in vitro* resultierte, konnte nicht geklärt werden. Die Menge anderer Proteine bleibt in An- und Abwesenheit des Inhibitors konstant. Das gilt sowohl für das ebenfalls mit dem anti-SmTK3-Antikörper reagierende 60 kD-Protein (Abb. 3-42, unten; vgl. Kap. 3.1.5), als auch für mehr als fünfzehn weitere Proteine (Abb. 3-42, oben).

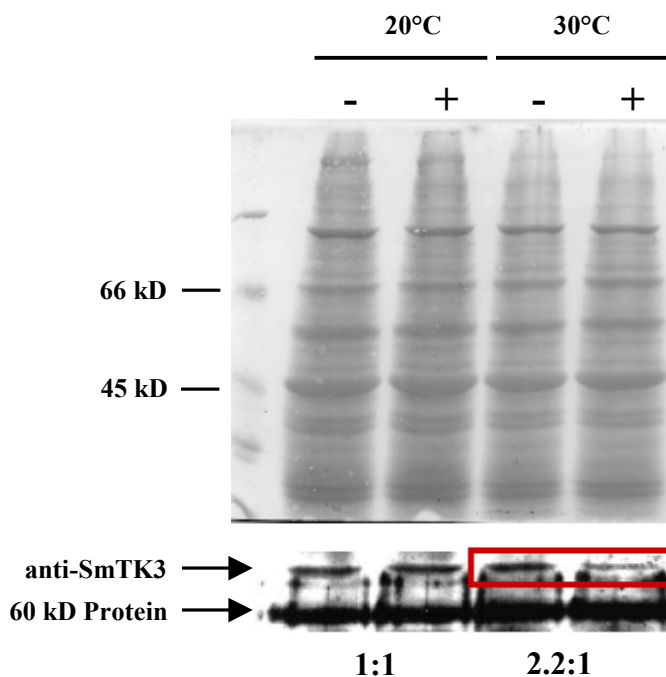


Abb. 3-42. Einfluss von Herbimycin A auf die Stabilität von SmTK3 *in vitro*. Proteinextrakte von jeweils 15 Pärchen wurden für 90 min bei verschiedenen Temperaturen in An- und Abwesenheit von Herbimycin A (25 µg/ml) inkubiert, auf einem 7.5%igen denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und auf einen Filter transferiert. Der Filter wurde zur Abschätzung der immobilisierten Proteinmengen mit Ponceau-Rot gefärbt (oben). Die Messung der Intensitäten einzelner Banden zeigten, dass gleiche Mengen transferiert worden waren. Der Filter wurde anschließend mit dem Anti-SmTK3-Antikörper umgesetzt, die Detektion erfolgte wie in den Kapiteln 2.2.22.2 und 3.1.5 beschrieben (unten). Die Intensitäten der Signale von SmTK3 und dem 60 kD-Protein (vgl. Kap. 3.1.5) wurden mittels Densitometrie bestimmt und sind für SmTK3 als relative Werte angegeben. Der rote Kasten fokussiert Unterschiede in den Signalintensitäten.

3.6.4. Piceatannol, ein selektiver Inhibitor für Tyrosinkinasen der Syk-Familie

Zur Absicherung der Daten, die mit Herbimycin A erhalten worden sind, sollte ein Inhibitor gegen eine andere TK-Familie eingesetzt werden. Das Ziel dieser Versuche bestand darin, weitere Hinweise darauf zu erhalten, dass die Auswirkungen des Antibiotikums auf die Zielprozesse nicht auf eine allgemeine toxische Wirkung, sondern auf die Blockierung spezifischer Signalwege zurückzuführen sind. Daher wurde angestrebt, einen Inhibitor einzusetzen, der sich in seinen Auswirkungen auf die Zielprozesse möglichst

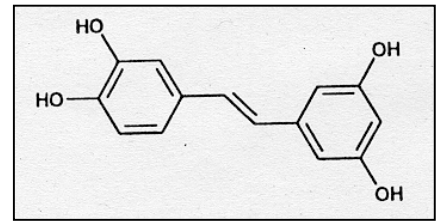


Abb. 3-43. Strukturformel von Piceatannol. 3,4,3',5'-Tetrahydroxy-Trans-Stilben, ein natürliches Pflanzenprodukt.

deutlich von Herbimycin A unterscheidet, aber trotzdem die Schistosomen unter den gegebenen Bedingungen nicht in lebenswichtigen Funktionen beeinträchtigt. Die Wahl fiel auf Piceatannol (Abb. 3-43), ein selektiver Inhibitor für Syk-TKs (Oliver *et al.*, 1994), da bereits eine Tyrosinkinase dieser Familie, SmTK4, bei *Schistosoma* isoliert werden konnte. SmTK4 wird nicht im Vitellarium exprimiert und spielt daher für die Entwicklung dieses Organs wahrscheinlich keine Rolle. Piceatannol inhibiert *in vitro* die Substratphosphorylierung der humanen Syk-TK PTK72 mit einem IC_{50} von ca. 10 μ M, die der humanen Src-TK Lyn hingegen mit einem 10-fach höheren IC_{50} -Wert. Zusätzlich blockiert dieser Inhibitor bei niedrigen Konzentrationen die Autophosphorylierung von PTK72, nicht aber die der humanen Lyn-Tyrosinkinase (Geahlen & McLaughlin, 1989; Oliver *et al.*, 1994). Bei vergleichbaren Dosierungen inhibiert Piceatannol auch Serin/Threonin-Proteinkinasen wie z.B. die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) oder die Proteinkinase C (PKC; Wang *et al.* 1998).

3.6.4.1. Einfluss von Piceatannol auf die Paarung von Schistosomen

Die Wirkung von Piceatannol auf die Aufrechterhaltung des Paarungskontaktes wurde untersucht, wie es in Kapitel 3.6.2.1 beschrieben worden ist. Die Paarungsquote bei Behandlung mit 10 μ M Piceatannol weicht erst nach 19 Tagen signifikant von der unbehandelten Kontrolle ab, erreicht dann aber innerhalb von 48 Stunden nahezu den Nullwert. Bei der doppelten Konzentration treten signifikante Unterschiede schon ab dem achten Tag auf. Allerdings dauert es knapp weitere 14 Tage bis die Paarungsquote den Nullwert erreicht. Unter Zugabe von 35 μ M Piceatannol treten die ersten Entpaarungen schon nach 48 Stunden auf, ab dem sechsten Tag liegen keine Paare mehr vor (Abb. 3-44). Tote oder phänotypisch abnormale Würmer wurden während der gesamten Inkubationszeit nicht beobachtet. Um Piceatannol dem Medium zugeben zu können, wurde der Inhibitor zuvor in DMSO gelöst. Dass dieses Lösungsmittel den Paarungskontakt nicht beeinträchtigt, ist an anderer Stelle gezeigt worden (Kap. 3.6.2.1). Die Paarungsversuche zeigen, dass Piceatannol innerhalb einer 48-stündigen Inkubationszeit in den eingesetzten Dosierungen keine schwerwiegenden Auswirkungen auf den allgemeinen Stoffwechsel und auf die Lebensqualität der Schistosomen hat. Für die Messung von Zielprozessen wie DNA-Synthese und p14-Expression kann daher analog zu den Versuchen mit Butein und Herbimycin A eine Inkubationszeit von zwei Tagen eingehalten werden. Die zahlreichen Entpaarungen bei

den hohen Konzentrationen ab dem dritten bzw. achten Tag zeigen aber auch, dass Piceatannol durchaus eine Wirkung auf Schistosomen hat.

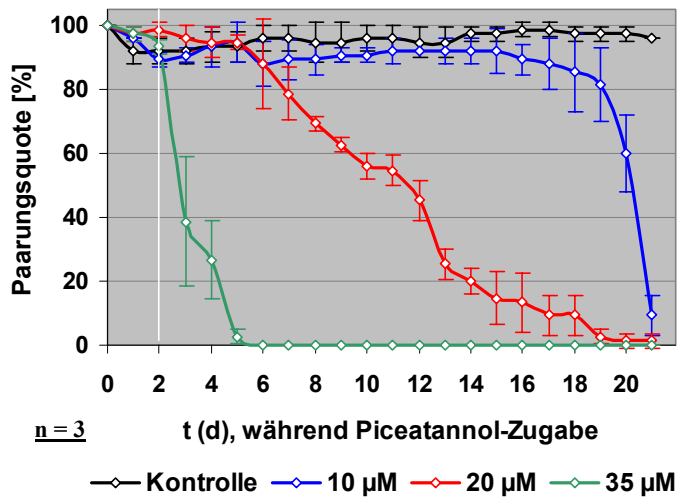


Abb. 3-44. Einfluss von Piceatannol auf die Paarung adulter Schistosomen. Pro Einzelansatz wurden 30 Paare für die angegebene Zeit (t) ohne (Kontrolle) und mit Zugabe von Piceatannol (10 µM, 20 µM und 35 µM) in Kultur gehalten. Die Anzahl der verbliebenen Paare zu bestimmten Zeitpunkten ist angegeben als prozentualer Wert, der sich auf die maximal mögliche Anzahl bezieht. n, Anzahl der unabhängigen Versuchsreihen; Standardabweichungen sind angegeben; die weiße Linie markiert eine Inkubationszeit von 48 h (siehe Text).

3.6.4.2. Einfluss von Piceatannol auf die DNA-Synthese gepaarter Schistosomen

Um die Wirkung von Piceatannol auf die DNA-Synthese in adulten Schistosomen zu untersuchen, wurden Wurmpaare für 48 Stunden unter Zugabe vom BrdU und verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors kultiviert. Als Kontrolle wurden Paare ohne Inhibitor aber mit BrdU für den gleichen Zeitraum in Kultur gehalten. Vereinzelt entpaarte Würmer wurden sofort aussortiert. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die beiden Geschlechter jeweils voneinander getrennt und separat behandelt. Die Bestimmung der DNA-Syntheseraten erfolgte, wie zuvor beschrieben (Kap. 3.4). Es zeigte sich, dass Piceatannol bei 48-stündiger Inkubationszeit weder bei gepaarten Weibchen noch bei Männchen die Mitose-Aktivität signifikant beeinflusst (Abb. 3-45).

3.6.4.3. Einfluss von Piceatannol auf die p14-Expression in gepaarten Weibchen

Um die Wirkung von Piceatannol auf die p14-Expression bei gepaarten Weibchen zu untersuchen, wurden Wurmpaare für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen (10 µM und 35 µM) von Piceatannol kultiviert. Als Kontrolle wurde unter den gleichen Bedingungen ein Ansatz ohne Inhibitor durchgeführt. Die anschließende quantitative Northern-Blot-Analyse mit einer p14-Sonde wurde erfolgte wie zuvor beschrieben (Kap. 3.6.2.3). Es zeigte sich, dass Piceatannol in den eingesetzten Dosierungen die p14-Transkription nicht beeinflusst (Abb. 3-46).

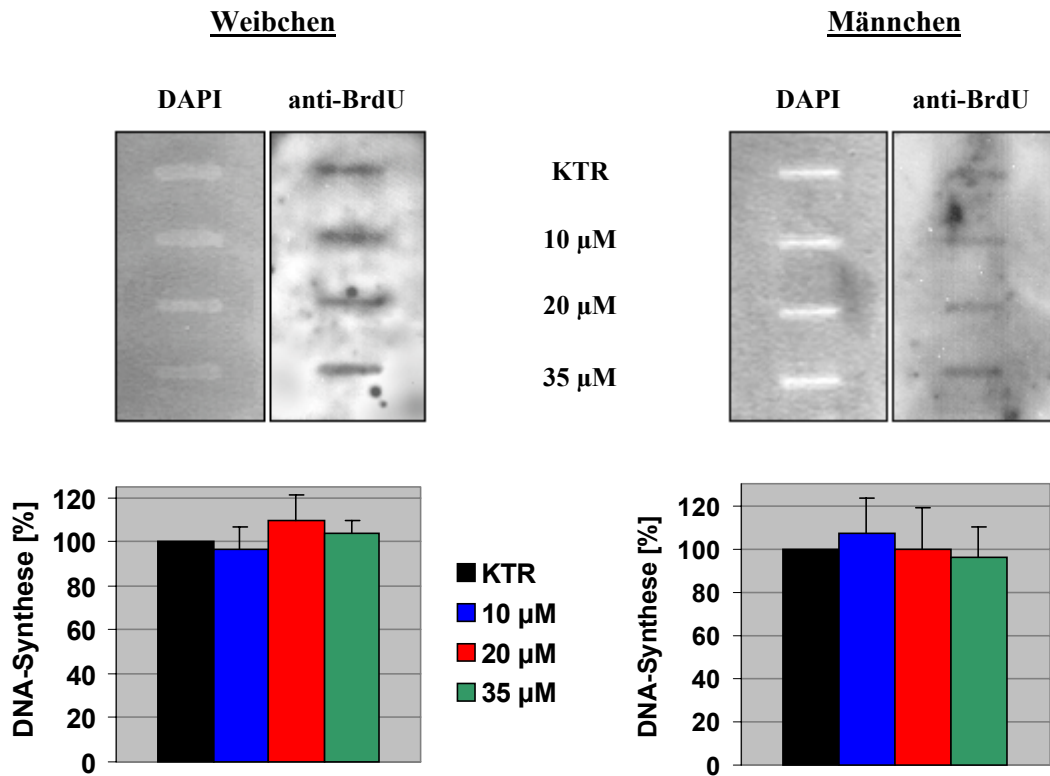


Abb. 3-45. Einfluss von Piceatannol auf die DNA-Synthese in gepaarten Schistosomen. Paare wurden unter Zugabe von BrdU und verschiedenen Konzentrationen von Piceatannol (10 μM, 20 μM, 35 μM) bzw. ohne den Inhibitor (KTR) für zwei Tage in Kultur gehalten. Anschließend wurden die relativen DNA-Syntheseraten beider Geschlechter getrennt voneinander bestimmt. *Oben:* DAPI- und anti-BrdU-Färbung; ca. 200 ng DNA (Weibchen) bzw. 300 ng (Männchen) wurden jeweils aufgetragen. *Unten:* Graphische Auswertung von n Versuchsreihen. Die DNA-Syntheseraten sind als relative Werte angegeben, die sich auf die unbehandelten Würmer (100%) beziehen. n, Anzahl der unabhängigen Versuchsreihen; Standardabweichungen sind angegeben

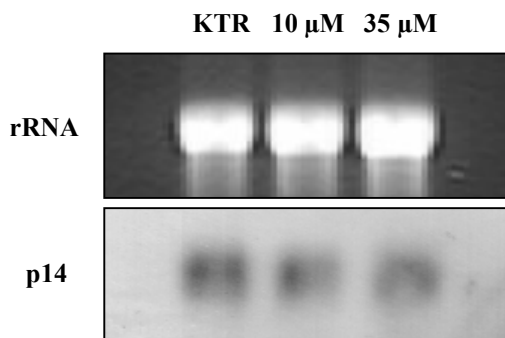


Abb. 3-46. Einfluss von Piceatannol auf die p14-Transkription. Gepaarte Weibchen wurden unbehandelt (KTR) oder mit verschiedenen Konzentrationen an Piceatannol (10 μM, 35 μM) kultiviert. Die Menge an p14-Transkripten wurde, wie zuvor beschrieben, über quantitative Northern-Blot-Analyse bestimmt. Gezeigt sind die 18S-rRNA-Banden nach der Gelelektrophorese für den Mengenabgleich und die Autoradiographie nach Hybridisierung mit der p14-Sonde.

4. DISKUSSION

4.1. Struktur, Regulation und Funktion von Src-Tyrosinkinasen

Zelluläre Tyrosinkinasen vom Src-Typ gehören zur großen Klasse der Protein-Tyrosinkinasen und sind durch sechs funktionale Domänen charakterisiert: Eine SH4-Domäne am N-Terminus, die *unique-site*, eine SH3- und eine SH2-Domäne sowie die TK- (SH1-) Domäne und eine kurze negativ-regulatorische Region am C-Terminus (Abb. 4-1).

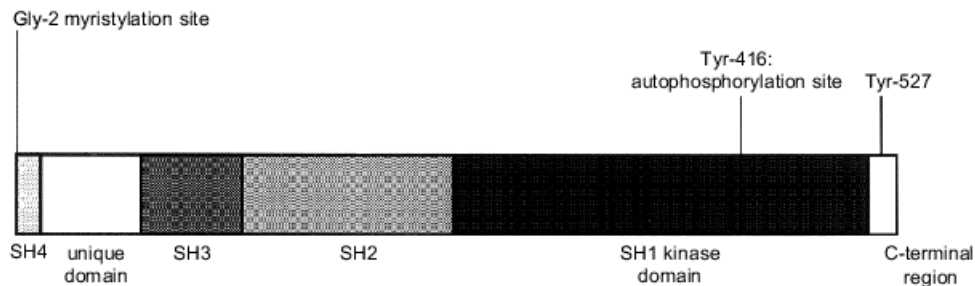


Abb. 4-1. Die Anordnung von konservierten Domänen bei Src-Tyrosinkinasen. Modifiziert nach Tatosyan & Mizenina (2000).

Die TK-Domäne als Bestandteil sämtlicher PTKs ist verantwortlich für die Tyrosinkinaseaktivität und spielt zudem eine Rolle in der Substratspezifität (Tatosyan & Mizenina 2000). Sie setzt sich aus elf Subdomänen zusammen und weist eine große Ähnlichkeit zu den katalytischen Domänen der Serin/Threoninkinasen auf. Bestimmte Aminosäurereste innerhalb dieser Subdomänen sind in allen Tyrosin- aber z.T. auch in allen Serin/Threoninkinasen identisch und spielen Schlüsselrollen bei der ATP-Bindung und beim Transfer des Phosphatrestes auf das Substratmolekül. Zwei Subdomänen enthalten Konsensus-Sequenzen, die Tyrosinkinasen von Serin/Threoninkinasen distanzieren (Hanks & Quinn, 1991). Ein konserviertes Tyrosin innerhalb der TK-Domäne (Tyr⁴¹⁶ der humanen Src) ist die hauptsächliche Autophosphorylierungsstelle und von entscheidender Bedeutung für die Aktivität des Enzyms. Die Autophosphorylierung kann sowohl intramolekular (*in cis*) als auch intermolekular zwischen zwei Src-TKs (*in trans*) erfolgen. Eine Phosphorylierung dieses Tyrosins durch TKs anderer Familien ist nicht ausgeschlossen. Die Autophosphorylierung ist eine Voraussetzung für die Substratphosphorylierung (Brown & Cooper, 1996).

Die konservierte SH2-Domäne bindet inter- oder intramolekular an phosphorylierte Tyrosine. Die Spezifität der Bindung ist hauptsächlich von den drei unmittelbar C-terminal vom Phosphotyrosin gelegenen Aminosäuren abhängig. In klassischen Beispielen wie z.B. in RTK-Signalwegen vermitteln SH2-Domänen die Interaktionen der Src-TKs mit Rezeptoren, also mit Molekülen, die den Src-TKs in der Hierarchie des Signalweges übergeordnet sind. Im Zusammenhang mit dem C-Terminus kommt der SH2-Domäne eine äußerst wichtige autoregulatorische Funktion zu. Src-TKs besitzen in kurzer Distanz C-terminal zur katalytischen Domäne ein hochkonserviertes Tyrosin (Tyr⁵²⁷ bei der humanen Src). Wird dieses Tyrosin z.B. durch die Tyrosinkinase Csk phosphoryliert, so bindet es intramolekular an die SH2-Domäne. Dadurch nimmt die Src-TK eine geschlossene Konformation ein und befindet sich in einem inaktiven

Status (Abb. 4-2). Um das Enzym in die offene Konformation und damit in den aktiven Status zu überführen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Dephosphorylierung des Tyr⁵²⁷ durch eine C-terminale Phosphatase wird ebenso diskutiert wie temporäre posttranslationale Modifikationen an anderer Stelle oder die Bindung eines Proteins an die SH3-Domäne. Die beiden letzteren Vorgänge würden die inaktive Konformation zugunsten der aktiven de-stabilisieren. Ebenfalls denkbar wäre ein Protein, das mit dem C-Terminus der Src-TK um die Bindungsstelle an der SH2-Domäne konkurriert (Brown & Cooper, 1996).

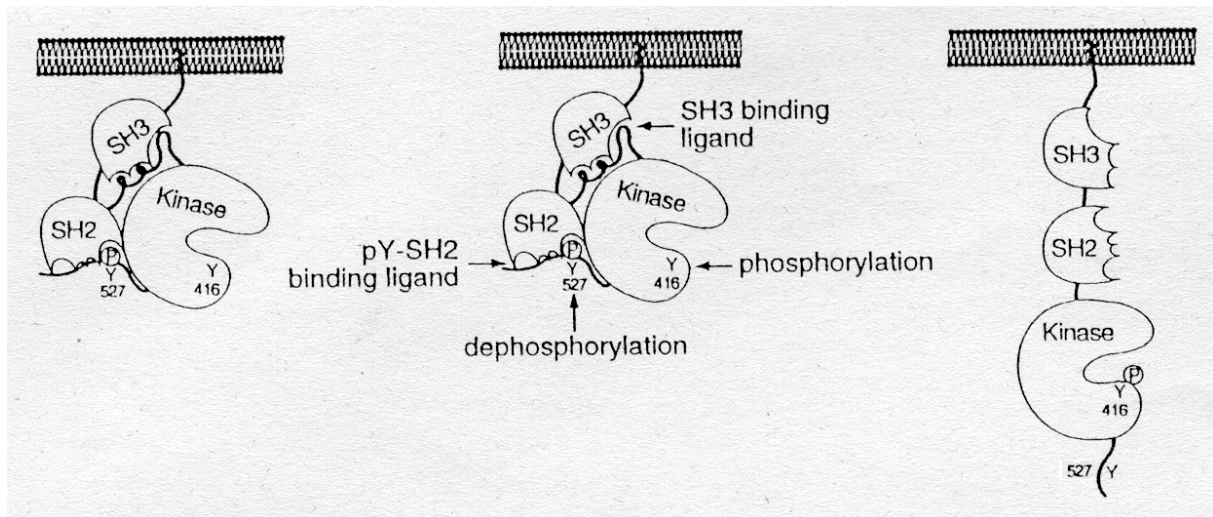


Abb. 4-2. Mechanismen, die eine Aktivierung von Src-Tyrosinkinasen bewirken. *Links:* Ein Modell, dass die Struktur der inaktivierten humanen Src-TK pp60^{c-src} zeigt. Das C-terminal gelegene Tyr⁵²⁷ ist phosphoryliert und bindet intramolekular an die SH2-Domäne. Die SH3-Domäne bindet an den SH2-Kinase-Linker. *Mitte:* Mögliche Mechanismen, die in eine Aktivierung der Tyrosinkinase involviert sind. Das Tyr⁴¹⁶ repräsentiert die hauptsächliche Autophosphorylierungsstelle. *Rechts:* Ein Modell, dass die Struktur der aktivierten Src-TK zeigt. Die SH2- und die SH3-Domäne sind nicht mehr intramolekular gebunden. Nach Thomas & Brugge (1997).

Die SH3-Domäne ist notwendig für die Interaktion der Src-TK mit Substratproteinen in der offenen Konformation. Dabei reagiert sie mit Prolin-reichen Regionen, die PxxP-Grundmotive enthalten, der Bindungspartner. In der inaktiven Form verstärkt sie durch eine intramolekulare Bindung die geschlossene Konformation (Abb. 4-2; Tatosyan & Mizenina, 2000).

Die Funktion der *unique-site* ist bisher kaum geklärt. Es wird lediglich vermutet, dass diese nicht-konservierte Region die Interaktion der Src-TK mit anderen Proteinen moduliert. Dabei ist bekannt, dass die *unique-site* der humanen Lck-Tyrosinkinase die Interaktion mit zwei T-Zell-Rezeptoren ermöglicht (Thomas & Brugge, 1997).

Die konservierte SH4-Domäne ermöglicht der Src-TK die Bindung an die Plasmamembran, indem sie über Aminosäurereste verfügt, die Signale für Fettsäure-Modifikationen enthalten. Für die Assoziation mit den Phospholipiden ist die Myristilierung essentiell. Dazu wird nach Abspaltung des Startmethionins eine Myristinsäure kovalent an das Glycin an Pos. 2 addiert, welches in allen bisher bekannten Src-TKs konserviert ist. Die Rekrutierung zur Membran wird in vielen Fällen durch eine Palmythilierung und/oder durch die Wechselwirkung von basischen Aminosäuren mit negativ geladenen Phospholipiden unterstützt (Resh, 1994).

Signalwege, in die Src-TKs involviert sind, regulieren viele verschiedene zelluläre Ereignisse, wie z.B. Mitoseaktivierung und Mitoseablauf, Zelladhäsion, Apoptose, Differenzierung

und Gentranskription (Brown & Cooper, 1996; Thomas & Brugge, 1997; Tatosyan & Mizenina, 2000). In einem gut untersuchten Signalweg nimmt das humane Src eine Schlüsselfunktion in der Transkriptions-Induktion des Onkogens *c-myc* ein. Dieser Signalweg wird durch den Wachstumsfaktor PDGF induziert, enthält RhoGTPasen und ist unabhängig von Ras (Chiariello *et al.*, 2001). Da der Transkriptionsfaktor *c-myc* mit der intrinsischen Cyclin/Zellzyklus-Maschinerie interagiert (Obaya *et al.*, 1999), ist dieser Signalweg ein exzellentes Beispiel für die Regulation der Zellproliferation über Src-TKs. Für die Src-TK Fyn konnte in der Maus eine Funktion in der Spermatogenese nachgewiesen werden (Maekawa *et al.*, 2002). Dabei gibt es deutliche Hinweise darauf, dass Fyn durch die Assoziation mit Zytoskelett-Proteinen wie z.B. F-Aktin die Differenzierung der Keimzellen in einem bestimmten Stadium der Spermatogenese beeinflusst. Ein prominentes Beispiel für die Funktion einer Src-TK bei der Differenzierung der weiblichen Gonaden ist das Molekül Src64 von *Drosophila*. Im Zusammenspiel mit der Tec-TK Tec29 reguliert Src64 wahrscheinlich ebenfalls über Aktin-Filamente das Wachstum und die Stabilität der Ringkanäle, die die Oozyte mit den Nährzellen verbinden (Roulier *et al.*, 1998).

4.2. Die Charakterisierung von SmTK3 auf Nukleinsäure- und auf Proteinebene

Die Aminosäuresequenz von SmTK3 verfügt über alle für Src-TKs charakteristischen funktionellen Domänen (Kapp, 2000). Die Präsenz sämtlicher essentieller Konsensus-Sequenzen in den einzelnen Subdomänen der SH1-Domäne weist deutlich auf eine konservierte Tyrosinkinase-Funktion hin. Der funktionale Nachweis steht jedoch noch aus.

Durch Northern-Blot-Analyse mit einer Sonde, die den 3'-UTR von SmTK3 repräsentiert, konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass SmTK3 nicht geschlechtspräferentiell exprimiert wird und dass keine verkürzten Transkripte gebildet werden. Damit werden Northern-Blot-Analysen von K. Kapp bestätigt und die Resultate von P. Schussler (1997) widerlegt.

Der erzeugte polyklonale Antikörper gegen die *unique-site* von SmTK3 erkennt zwei Proteine in der Höhe von 60 kD und 70 kD. Bei letzterem handelt es sich um SmTK3, da für die Tyrosinkinase ein theoretisches Molekulargewicht in dieser Größenordnung kalkuliert worden ist. Die eingesetzten relativ hohen Verdünnungen von 1:500 und 1:1.000 und die Tatsache, dass das Prä-Immuneserum nicht mit *Schistosoma*-Proteinen reagiert, belegen die gute Qualität des Antikörpers. Die Ursache des Immunkomplexes bei 60 kD konnte nicht geklärt werden. Durch die Northern-Blot-Analysen können verkürzte SmTK3-Proteine durch die Translation verkürzter Transkripte ausgeschlossen werden. Des weiteren gibt es in der entsprechenden Region der cDNA-Sequenz auch keine Startcodons, die auf einen alternativen Translationsstart hinweisen würden. Eine Kreuzreaktion mit anderen Src-Tyrosinkinasen ist unwahrscheinlich, da der Antikörper gegen eine nicht-konservierte Region gerichtet ist. Post-Adsorption und höhere Verdünnungen des Antikörpers führten nicht zur relativen Verminderung der Anzahl an Antigen-Antikörper-Komplexen bei 60 kD. Gelegentlich weisen Doppelbanden bei einer Antikörperumsetzung auf eine Phosphorylierung (oder auf eine andere posttranslationale Modifikation) des erkannten Moleküls hin. Dadurch wird das Laufverhalten des Proteins im PAA-Gel so verändert, dass ein Shift in einen höhermolekularen Bereich die Folge ist (Osman *et al.*, 2001). Das bedeutet jedoch nicht im Umkehrschluss, dass Phosphorylierungen oder andere posttranslationale Modifi-

kationen ausgeschlossen werden können, wenn keine Doppelbande auftritt. Wäre die vom anti-SmTK3-Antikörper erkannte Doppelbande auf eine Phosphorylierung zurückzuführen, dann müsste das unphosphorylierte SmTK3 ein Molekulargewicht von 60 kD aufweisen. Eine solche große Differenz zum theoretischen Molekulargewicht ist äußerst unwahrscheinlich und wäre nur durch einen ungewöhnlich hohen Alanin- und/oder Glycin-Gehalt¹ in der Primärsequenz zu erklären, was jedoch nicht zutrifft (Kapp, 2000). Den letztendlichen Beweis dafür, dass Phosphorylierung nicht die Ursache für den zweiten Immunkomplex sein kann, brachte ein Versuch, bei dem Proteinextrakt aus Schistosomen vor der Antikörperumsetzung mit Alkalischer Phosphatase behandelt wurde. Trotz dieser Behandlung wurden erneut die beiden bekannten Immunkomplexe unverändert gleichem Mengenverhältnis zueinander detektiert.

Die vergleichende Western-Blot-Analyse zwischen adulten Männchen und maturaen Weibchen mit dem SmTK3-Antikörper ergab keine Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den beiden Geschlechtern. Damit wurden die Northern-Blot-Analysen bestätigt.

Durch vergleichende RT-PCR konnte die Transkription von SmTK3 in allen larvalen und adulten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Das widerspricht Northern-Blot-Analysen von P. Schüssler (1997), die eine entwicklungspezifische Präsenz in maturaen Weibchen nahelegten. Die Resultate der RT-PCR sind durch die Verwendung verschiedener Primerkombinationen reproduziert (Daten nicht gezeigt) und durch entsprechende Kontrollen abgesichert worden.

Die *in-situ*-Hybridisierungen mit zwei verschiedenen Sonden zeigen eindeutig, dass SmTK3 gewebespezifisch im Parenchym und in den Gonaden (Vitellarium, Ovar, Testes) beider Geschlechter exprimiert wird. Diese Ergebnisse wurden durch die Immunlokalisationsstudien bestätigt. Dabei muss beachtet werden, dass der eingesetzte Antikörper auch mit dem 60 kD-Protein reagiert, was allerdings nicht zu Signalen in weiteren Geweben führt. Das kann mehrere Ursachen haben. Entweder wird das 60 kD-Protein nur in Geweben/Organen exprimiert, in denen auch SmTK3 lokalisiert ist, oder es wird bei der Immunhistologie nicht oder weniger deutlich erkannt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass dieses Protein doch eine Variante von SmTK3 ist, wofür es bislang aber keinen Hinweis gibt.

Die Lokalisationsstudien legen die Vermutung nahe, dass SmTK3 neben einer konstitutiven Funktion im Parenchym zusätzliche Aufgaben in den Gonaden erfüllt, die möglicherweise für die Entwicklung dieser Organe von Bedeutung sind. Die Funktion in den Larvenstadien könnte möglicherweise der im Parenchym entsprechen. Die Tatsache, dass SmTK3 nicht weibchenpräferentiell exprimiert wird, scheint den Resultaten der *in-situ*-Hybridisierungen zu widersprechen. Offensichtlich sind die erhaltenen Signale im Vitellarium intensiver als im Parenchym, woraus eine weibchenpräferentielle Transkription folgen müsste. Dabei ist jedoch anzumerken, dass die verwendete Methode der *in-situ*-Hybridisierung keine quantitativen Aussagen zulässt (Wilkinson, 1994). Bei der Immunhistologie unterscheiden sich die Signalintensitäten von Vitellarium und Parenchym nicht voneinander. Ob die mit dieser Technik erzeugten Signale eine quantitative Abschätzung zulassen, ist nicht geklärt. Somit gibt es keinen Widerspruch zwischen *in-situ*-Hybridisierung, Immunhistologie und den weiteren bisher diskutierten Resultaten.

In einer weiteren vergleichenden Western-Blot-Analyse konnte kein Unterschied im relativen Anteil von SmTK3 an der Gesamtproteinmenge zwischen virginen und maturaen Weibchen festgestellt werden. Durch diesen Versuch konnte eine entwicklungspezifische oder -präferen-

¹ Die molekularen Massen von Alanin und Glycin liegen deutlich unter dem Durchschnittswert aller Aminosäuren, der in die theoretische Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen eingesetzt wird.

tielle Proteinsynthese vom SmTK3 zwar nicht nachgewiesen aber auch nicht ausgeschlossen werden. Letzteres ist darauf zurückzuführen, dass dieser Versuch keine Aussagen über die Expression in den einzelnen Organen/Geweben zulässt. Die Möglichkeit einer Funktion von SmTK3 bei der Gonadenentwicklung basiert zum jetzigen Zeitpunkt auf der gewebespezifischen Expression, die eine unterschiedliche Funktion in den entsprechenden Organen/Geweben plausibel erscheinen lässt. Um diese Vermutung durch quantitative Western-Blot-Analysen zu bekräftigen, müsste die Expression von SmTK3 in den weiblichen Gonadenanlagen mit der in den differenzierten Gonaden verglichen werden. Eine Möglichkeit zur quantitativen Untersuchung der Expression bestimmter Moleküle in einzelnen Organen und Geweben besteht jedoch bei helminthischen Parasiten nicht.

4.3. Das Expressionsmuster von SmTK5

Auch SmTK5 enthält alle funktionellen Domänen, die Src-TKs auszeichnen. Diese Tyrosinkinase wird weder geschlechts- noch entwicklungspezifisch exprimiert. Transkripte lassen sich in den Gonaden, im Subtegument, in der Gastrodermis und im Parenchym beider Geschlechter, nicht aber in den Muskeln nachweisen. Auf der Basis dieser Daten lässt sich schwer etwas über eine mögliche Funktion dieser Src-TK sagen. Vieles deutet auf eine konstitutive Funktion in allen Organen/Geweben außer in den Muskeln hin. Dass SmTK5 mittels *in-situ*-Hybridisierung nicht im Tegument detektiert werden konnte, überrascht nicht, da in diesem Gewebe keine Transkriptions- und keine Translationsmaschinerie vorhanden ist. Die tegumentalen Zellkerne befinden sich in Cytonen, die im subtegumentalen Gewebe liegen und mit dem Tegument über zytoplasmatische Brücken verbunden sind. Gene werden demnach in den Cytonen exprimiert und nach post-translationaler Modifikation ins Tegument transportiert (McLaren, 1980). Prinzipiell sind alle Funktionen, die Src-TKs zugeschrieben werden, auch für SmTK5 möglich. Nur die Regulation von Differenzierungsprozessen erscheint eher unwahrscheinlich, da von involvierten Moleküle eine mehr gewebespezifische Expression erwartet wird. Src-gesteuerte Prozesse bei Modellorganismen, die in allen Geweben außer in den Muskeln stattfinden, sind mir nicht bekannt.

4.4. Interaktionspartner von SmTK3 und die Bindungseigenschaften der SH3-Domäne

Zur Identifizierung potentieller Bindungspartner von SmTK3 wurden insgesamt drei Yeast-Two-Hybrid-Screenings mit zwei verschiedenen *bait*-Konstrukten durchgeführt. Das erste Konstrukt enthielt die isolierte SH3-Domäne, das zweite zusätzlich die *unique-site*. Für die Isolierung von Bindungspartnern wurde eine *Schistosoma*-Bank durchsucht (homologer Screen), zur Verifizierung der Daten und für evolutionäre Einblicke in die Signaltransduktion eine *Drosophila*-Bank (heterologer Screen).

Zwei Domänen mit großer Sequenzähnlichkeit müssen nicht zwangsweise gleiche Funktionen haben. Daher stellt sich zunächst die Frage, ob die SH3-Domäne von SmTK3, wie erwartet, als Proteinbindedomäne fungiert. Der Nachweis für diese Funktion ist dadurch erbracht wor-

den, dass die Versuchsreihen zur Identifizierung eines Interaktionspartners mit der isolierten SH3-Domäne (bzw. mit der SH3-Domäne und der *unique-site*) als *bait* in der Klonierung mehrerer putativer Bindungspartner resultierten. Einige davon sind bereits bei Vertebraten als Bindungspartner für SH3-Domänen-haltige Proteine oder sogar Src-Tyrosinkinasen beschrieben worden. Daraus ergibt sich, dass die Homologie bzw. die Konservierung in der Signaltransduktion nicht nur einzelne Domänen oder ganze Moleküle sondern auch die Interaktionen von Sequenzabschnitten bzw. von Proteinen miteinander betrifft. Es ist beachtenswert, dass diese Konservierung, die vor allem für den umfassenden Bereich der Vertebraten, Arthropoden und Nematoden beschrieben ist, auch den evolutionär distanzierten und auf einer niedrigeren Stufe stehenden Plathelminth *Schistosoma* mit einschließt.

4.4.1. Interaktionspartner von SmTK3 im heterologen System

Bei der Auswertung der Daten, die aus dem Screening der *Drosophila*-Bank resultieren, muss beachtet werden, dass diese Interaktionen *in vivo* (im homologen Organismus) keine Relevanz haben. Trotzdem können einige Hinweise auf putative Bindungspartner von SmTK3 bei *Schistosoma* und damit auch auf die Funktion der Tyrosinkinase erhalten werden. Um solche Schlussfolgerungen ziehen zu können, reicht es nicht aus, dass die SH3-Domäne und die Prolin-reiche Region als größere Sequenzabschnitte konserviert sind. Beim Vergleich vieler SH3-Domänen bzw. Prolin-reicher Regionen miteinander fällt auf, dass bestimmte Aminosäuren identisch oder ähnlich sind, aber auch variable Aminosäuren auftreten. Einige dieser variablen Aminosäuren sind für die Spezifität der Interaktion zweier Moleküle über diese Domänen zuständig. Damit also eine Interaktion zwischen zwei bestimmten Molekülen in verschiedenen Organismen konserviert ist, müssen auch diese variablen Aminosäuren innerhalb der Bindedomänen dieser beiden Moleküle konserviert sein. Das trifft für die Interaktion zwischen SH3-Domäne und Prolin-reicher Region zu (Schumacher *et al.*, 1995; Larson *et al.*, 2000; Larson & Davidson, 2000). Allerdings gilt auch in diesem Fall, dass *domain-shuffling* im Laufe der Evolution zu Ausnahmen führen kann. Das ist für Trematoden ein nicht zu unterschätzendes Problem, da sie in der Entwicklungsgeschichte sehr distanziert zu den Säugetieren liegen, über die am meisten aus dem Bereich der Signaltransduktion bekannt ist. Ein Beispiel für eine konservierte Interaktion über eine SH3-Domäne und eine Prolin-reiche Region ist die Bindung der Abl-TK an das Abi-Protein beim Menschen und bei *Drosophila* (Dai & Pendergast, 1995; Juang & Hoffmann, 1999). Die Konservierung von Interaktionen spezifischer Moleküle gilt auch für andere Binderegionen. Beispielsweise konnte durch einen heterologen Yeast-Two-Hybrid-Screen mit Säuger-Rho-GDI² als *bait* das Protein Rac (eine Rho-GTPase) aus der Tabakpflanze kloniert werden. Anschließend wurde durch einen homologen Yeast-Two-Hybrid-Screen mit Rac als *bait* das Rho-GDI-Homolog aus der Tabakpflanze isoliert (Kieffer *et al.*, 2000). Das zeigt, dass die Interaktion spezifischer Signaltransduktionsmoleküle z.T. auch über das Tierreich hinaus bis in das Pflanzenreich konserviert ist.

Als Interaktionspartner von SmTK3 konnten insgesamt dreizehn verschiedene Proteine aus verschiedenen Bereichen der Zellbiologie, wie Signaltransduktion, Zellzyklus, Zellstruktur,

² Rho-GDP *dissoziation inhibitor*

Transkription/Translation und Membrantransport bestimmt werden. Das weist darauf hin, dass SmTK3 möglicherweise in die Regulation mehrerer verschiedener Prozesse involviert ist.

Ein hochinteressanter Bindungspartner von SmTK3 unter experimentellen Bedingungen ist **Abi**, das *Drosophila*-Homolog zu den Tumorsupressor-Genen Abi-1 und Abi-2 (Dai & Pendergast, 1995; Dai *et al.*, 1998). Proteine der Abi-Familie enthalten jeweils eine SH3-Domäne und eine Prolin-reiche Region, mit denen sie reziprok an Abl-Tyrosinkinasen binden. Dabei reagiert die SH3-Domäne jedes Moleküls jeweils mit der Prolin-reichen Region des Partnermoleküls. Abi-Proteine werden von Abl-Tyrosinkinasen phosphoryliert und sind Negativ-Regulatoren des Zellwachstums (Dai & Pendergast, 1995). Eine Interaktion von Abi-Proteinen mit Src-TKs ist bisher nicht beschrieben worden. Da jedes Mitglied der Abi-Familie jedoch über mehrere z.T. voneinander abweichende PxxP-haltige Motive verfügt, ist die Assoziation eines homologen Moleküls aus *Schistosoma* mit einer Src-TK zusätzlich oder alternativ zu der mit einer Abl-TK *in vivo* durchaus vorstellbar. Beispielsweise wäre bei Schistosomen diese Interaktion aufgrund der Funktion von Abi-Proteinen im Zusammenhang mit einer regulierten Zellproliferation während der Gonadenentwicklung gut vorstellbar.

Als ein weiterer Bindungspartner von SmTK3 wurde ein Expressionsprodukt von *Drosophila* mit Homologie zu **CDK2AP1** bestimmt. Über dieses Zellzyklus-Protein ist kaum etwas bekannt. Es weist eine äußerst hohe Sequenzähnlichkeit zu dem Tumorsupressor-Gen DOC-1 aus dem Hamster auf und wird in Zusammenhang mit CDK2 (Cyclin-abhängige Kinase 2) gebracht (Daigo *et al.*, 1997). Die Einbindung von Src-TKs in die Regulation des Zellzyklus ist hinreichend bekannt (Riley, 2001).

Die Interaktion von SmTK3 mit **Mucin**-homologen Proteinen aus *Drosophila* könnte sich als interessant herausstellen. Mucine sind transmembrane Glykoproteine, die in der Regel in Epithelien lokalisiert sind und deren extrazelluläre Regionen Schutzschichten bilden (Jass & Walsh, 2001). Interaktionen mit Src-TKs sind bisher nur über die SH2-Domäne durch EGFR-vermittelte Phosphorylierung bekannt (Li *et al.*, 2001). Damit ist in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass eine Src-TK über die SH3-Domäne an ein Mucin-ähnliches Molekül bindet. Die Funktion der Src/Mucin-Interaktion ist bisher ungeklärt. Für *Schistosoma mansoni* ist bisher ein weibchenspezifisches Mucin-Homolog (A11) beschrieben worden (Menrath *et al.*, 1995). Jedoch werden A11 und SmTK3 in verschiedenen Organen/Geweben exprimiert, so dass eine Interaktion dieser beiden Moleküle ausgeschlossen ist.

Die Resultate des heterologen Screenings geben ebenfalls Hinweise auf eine Interaktion von SmTK3 mit Proteinen aus der Tetraspanin-Superfamilie. Ein positiver Klon ist in sequenzierten Bereich identisch mit **Tsp42Ee** aus *Drosophila* (Adams *et al.*, 2000). Tetraspanine sind Zelloberflächenproteine mit vier Transmembrandomänen. Sie verfügen über ausgeprägte extrazelluläre Loops, weniger ausgeprägte zytosolische Regionen und einige hochkonservierte Bereiche. Tetraspanine bilden homo- und heterotetramerische Komplexe (Hemler, 2001). Einige Vertreter dieser Superfamilie assoziieren mit Integrinen, RTKs, Immunrezeptoren und andern Molekülen aus dem Bereich der Signaltransduktion (Boucheix & Rubinstein, 2001). Im diesem Zusammenhang sind sie möglicherweise in Prozesse involviert, die Zellbewegung, Zellaktivierung, Zellteilung, Zelldifferenzierung und Zelladhäsion regulieren (Maecker *et al.*, 1997; Hemler, 2001). Das humane Tetraspanin CD82 wird z.B. mit dem Aktin-Zytoskelett und dem Rho-GTPase-Signalweg in Zusammenhang gebracht (Delaguillaumie *et al.*, 2002). Diese postulierten Funktionen von Tetraspaninen lassen eine Interaktion mit Src-TKs möglich erscheinen. Im Zu-

sammenhang mit Phosphorylierungsereignissen wäre die Bildung eines Komplexes aus Tetraspaninen, Rezeptoren und Src-TKs möglicherweise zur Rekrutierung weiterer Signalmoleküle denkbar. Hierbei sei angemerkt, dass Tsp42Ee innerhalb seiner nur 228 Aminosäuren langen Sequenz über vier putative Tyrosin-Phosphorylierungsstellen verfügt. Eine direkte Interaktion eines Tetraspanins mit einer Src-TK ist jedoch bisher noch nicht beschrieben worden. Tetraspanine konnten auch in Schistosomen nachgewiesen werden und kommen z.T. in der Immundiagnostik zum Einsatz (Wright *et al.*, 1990; Davern *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 1997; Fan & Brindley, 1998).

Die Interaktion zwischen SmTK3 und **β -Tubulin** von *Drosophila* korreliert mit publizierten Daten, da Bindungen von Src-TKs an (α - und β -) Tubuline seit langem bekannt sind (Matten *et al.*, 1990). Dabei phosphorylieren Tubulin-assoziierte Src-TKs nicht nur das Mikrofilamentprotein selbst sondern auch exogene Substrate (Abu-Amer *et al.*, 1997). Als Bestandteile des Zytoskeletts sind Tubuline in viele Prozesse, wie z.B. Zellteilung (Abruzzi *et al.*, 2002), Oogenese und Spermatogenese (s.u.) involviert, so dass deren Phosphorylierung verschiedene Auswirkungen haben kann. Bei Schistosomen konnte bisher nur α -Tubulin kloniert werden (Duvaux-Miret *et al.*, 1991).

Das Aktin-bindende *focal adhesion* Protein **Vinculin** ist Bestandteil der *adherens junctions*, über die eine Zelle mit der Nachbarzelle oder der extrazellulären Matrix verbunden ist. An diesen Stellen hoher Proteinkonzentration ist das Aktin-Zytoskelett tierischer Zellen mit der Plasmamembran verankert (Rudiger, 1998). Die Phosphorylierung von Vinculin durch c-Src ist lange bekannt (Sefton *et al.*, 1981). Unklar ist jedoch, über welche Domäne(n) die beiden Moleküle miteinander interagieren. Die Bindung der SmTK3-*bait*-Konstrukte an *Drosophila*-Vinculin ist ein deutlicher Hinweis auf eine Interaktion zwischen der SH3-Domäne von c-Src und der Prolin-reichen Region des humanen Vinculins. Dieser Hinweis wird dadurch bekräftigt, dass weitere Proteine, wie z.B. Vinnexin, bekannt sind, die über ihre SH3-Domäne an Vinculin binden (Akamatsu *et al.*, 1999). Das zeigt, dass die Prolin-reiche Domäne von Vinculin das Potential dazu hat, bestimmte SH3-Domänen zu binden. Vinculin ist ein Tumorsuppressor-Gen und beeinflusst die Zelladhäsion bzw. -bewegung und damit auch Zellentwicklung- und -differenzierung (Levi *et al.*, 1991; Rudiger, 1998). Vinculin ist im Gegensatz zu Aktin (Oliveira & Kemp, 1995) bisher bei Schistosomen noch nicht nachgewiesen worden.

Die Interaktion von SmTK3 mit dem **SF1-Spleißfaktor** aus *Drosophila* könnte sich als bedeutsam herausstellen. Das humane SF1-Protein ist Bestandteil des ersten ATP-abhängigen *spliceosomal complex* und bindet direkt an die RNA. Da SF1 und das RNA-bindende, ausschließlich im Zellkern nachgewiesene Protein Sam68 in einem Abschnitt von 160 Aminosäuren identisch in der Sequenz sind, wird spekuliert, ob beide Moleküle in ähnliche Prozesse involviert sind (Arning *et al.*, 1996). Für Sam68 ist bekannt, dass es mit Src über die SH2- und die SH3-Domäne interagiert und während der Mitose phosphoryliert wird. Die Interaktion zwischen Src und Sam68 ist wahrscheinlich auf die M-Phase beschränkt, da dann die Kernmembran aufgelöst wird und die beiden Moleküle in den weiteren Stadien des Zellzyklus räumlich voneinander getrennt sind (Brown & Cooper, 1995).

SmTK3 bindet an ein *Drosophila*-Protein mit signifikanter Homologie zu **SAP18**, einem Transkriptions-Co-Repressor. SAP18 bindet direkt an den Transkriptionsrepressor Sin3, ein Protein, das durch Komplexierung mit Histon-Deacetylasen an der Modifizierung von Histonen beteiligt ist (Zhang *et al.*, 1997). Das *Drosophila*-Homolog von SAP18 interagiert mit Bicoid,

ein Homeodomänen-Protein, dass in der Embryonalentwicklung Segmentierungsgene in räumlicher Abhängigkeit entlang der anterior-posterior-Achse aktiviert. Es wird vermutet, dass SAP18 für das Silencing der Expression von Bicoid-Target-Genen im anterioren Bereich des Embryos zuständig ist (Zhu *et al.*, 2001). Der Sin3-Komplex von *Drosophila* ist beteiligt an der Reprimierung von Hormonrezeptor-regulierten Genen in Abwesenheit des Liganden. Der Ecdyson-Rezeptor EcR bildet mit dem *Drosophila*-Retinoid-X-Rezeptor USP ein Heterodimer, welches eine Schlüsselfunktion während der Metamorphose einnimmt und als Transkriptionsaktivator und -repressor fungiert. In Abwesenheit des Liganden bindet Sin3 vermutlich über den Co-Repressor SMRTER an EcR, wodurch die Transkription EcR/USP-regulierter Gene reprimiert wird (Ahringer, 2000). Zwei Retinoid-X-Rezeptor-homologe Moleküle sind auch bei Schistosomen bekannt (vgl. Kap. 1), jedoch ist ihre Funktion als Steroidhormonrezeptoren umstritten, da die Synthese von Steroidhormonen bei Schistosomen bezweifelt wird (Escriva *et al.*, 1997; de Mendonca *et al.*, 2000). Eine Interaktion von SAP18 mit Src-TKs oder sonstigen Proteinen, die SH3-Domänen enthalten, ist bisher nicht bekannt. Hierbei muss auch eine mögliche räumliche Diskrepanz zwischen SmTK3 und einem SAP18-Homolog bei *Schistosoma* in Betracht gezogen werden. Wie die meisten Src-TKs ist SmTK3 ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Transkriptionsrepressoren hingegen erfüllen ihre Funktion im Zellkern. Zwar ist von einigen Beispielen her bekannt, dass Transkriptionsfaktoren zwischen Kern und Zytoplasma wechseln, für SAP18 gibt es dafür jedoch bislang keine Hinweise. Daraus folgt, dass die putative Interaktion von SmTK3 mit einem SAP18-homologen Molekül *in vivo* bei Schistosomen möglicherweise nicht stattfindet oder auf die M-Phase beschränkt ist.

Ein weiterer positiver Klon kodiert für ein **L31**-homologes Protein. L31 ist Bestandteil der 60s-Untereinheit von eukaryontischen Ribosomen (Nobori *et al.*, 1989). Eine direkte Interaktion von Tyrosinkinase mit Ribosomen-Untereinheiten bzw. deren Phosphorylierung an Tyrosinen ist bisher nicht beschrieben worden.

Weitere positive Klone weisen signifikante Homologien zu Ionen transportern z.B. zu einer **HCO₃⁻-Co-Transportdomäne** und zur **E1-E2-ATPase** (eine Na⁺/K⁺-ATPase) auf. Das Zusammenspiel von Ionen transportern und Src-Tyrosinkinase ist mehrfach beschrieben. Es gibt Hinweise darauf, dass der Anionen- (Cl⁻/HCO₃⁻) Austauscher AE1 von der Src-TK Fyn phosphoryliert wird. In diesem Zusammenhang ist Fyn in die Regulation des intrazellulären pH-Werts involviert. Daraus ergibt sich eine indirekte Regulation von Ionenkanälen und die Beeinflussung der intrazellulären Konzentration von *second messengern* wie z.B. Ca²⁺ durch Fyn (Puceat *et al.*, 1998). An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die Interaktion von SmTK3 mit dem CG17162-Expressionsprodukt (homolog zur HCO₃⁻-Co-Transportdomäne) aus *Drosophila* aufgrund der chimären Eigenschaften des isolierten Klons experimentell nicht abgesichert ist. Die Bindung von Src an die (Ouabain-bindende) Na⁺/K⁺-ATPase ist ebenfalls nachgewiesen. Damit vermittelt Src die Interaktion zwischen der ATPase und dem EGF-Rezeptor und ermöglicht so die Signalübertragung von Ouabain zur Ras/MAPK-Kaskade (Haas *et al.*, 2002). Eine Na⁺/K⁺-ATPase und Ras sind auch bei *Schistosoma mansoni* nachgewiesen worden (Pardon & Noel, 1994; Kampkotter *et al.*, 1999). Zudem gibt es Hinweise auf die Präsenz von MAP-Kinasen bei Schistosomen (Schussler *et al.*, 1997). Folglich erscheint eine Interaktion zwischen SmTK3 und einer orthologen oder einer anderen Na⁺/K⁺-ATPase aus *Schistosoma* naheliegend.

Weitere positive Klone, die keine signifikante Homologie zu Proteinen aus durchsuchten Datenbanken aufweisen, werden nicht weiter diskutiert, da über ihre Funktionen keine Aussagen gemacht werden können.

Die Interaktionsstudien im heterologen System zeigen, dass SmTK3 das Potential hat, mehrere verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Funktionen zu binden. Das deutet darauf hin, dass die Src-TK in mehrere Signalwege involviert ist und möglicherweise verschiedene Prozesse reguliert. Diese Schlussfolgerungen sind mit den Lokalisationsstudien in Einklang zu bringen, da die gewebespezifische Expression von SmTK3 in mehreren Organen/Geweben auf verschiedene Funktionen hinweist. Dass eine Src-TK eine relativ große Anzahl von verschiedenen Proteinen phosphoryliert, ist bekannt, für v-Src sind beispielsweise bisher über 30 Substrate nachgewiesen worden (Thomas & Brugge, 1997).

Die Interaktion von bestimmten SH3-Domänen mit bestimmten Prolin-reichen Regionen ist durch große Spezifität und hohe Konservierung gekennzeichnet. Daraus folgt, dass die von der SmTK3-SH3-Domäne erkannten *target*-Sequenzen von *Drosophila*-Proteinen sehr wahrscheinlich auch in *Schistosoma*-Proteinen vorkommen. Aufgrund der Konservierung von Signalmolekülen bzgl. der Präsenz und Anordnung von Bindedomänen im gesamten Tierreich ist es wahrscheinlich, dass die erkannten Prolin-reichen Sequenzen bei *Drosophila* und *Schistosoma* in homologen Proteinen vorkommen. Daher ist anzunehmen, dass für jedes isolierte *Drosophila*-Protein auch ein entsprechendes Pendant bei *Schistosoma* existiert und mit SmTK3 interagiert. Einschränkend muss allerdings hinzugefügt werden, dass mit Ausnahmen zu rechnen ist, die auf das evolutionär bedingte *domain* bzw. *exon shuffling* zurückzuführen sind.

Aus dem Nachweis der Interaktionen von SmTK3 mit dem Spleißfaktor SF1 und dem Tetraspanin Tsp42Ee ergeben sich neue Hinweise auf eine mögliche Einbindung dieser beiden Proteine in Signaltransduktionsprozesse bei *Drosophila*. Die Resultate dieser Versuchsreihe weisen erstmals auf die Bindung von SF1 und Tsp42Ee an Proteine, die SH3-Domänen enthalten, bzw. an Src-TKs *in vivo* bei *Drosophila* hin.

4.4.2. Interaktionspartner von SmTK3 im homologen System

In diesem Kapitel werden die einzelnen Bindungspartner, die aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screening der *Schistosoma*-Bank mit SmTK3-*bait*-Konstrukten isoliert werden konnten, im Einzelnen vorgestellt. Von einer Ausnahme abgesehen, sind die abgeleiteten Proteine aller klonierten cDNAs³ bisher weder bei *Schistosoma* noch bei anderen Trematoden nachgewiesen worden.

Der interessanteste Interaktionspartner von SmTK3, der aus dem Screening im homologen System isoliert werden konnte, ist das *Schistosoma*-Homolog zum Diaphanous 3-Protein (DIA3) aus *Mus musculus* (AcNr.: 9789931). Dieser Klon wurde SmDRF-V genannt und wird in einem separaten Kapitel behandelt.

Ebenfalls interessant ist die Klonierung einer cDNA mit signifikanter Homologie zu **Verprolin** aus Hefe (VRP1). Das Strukturprotein VRP1 interagiert über eine Aktin-bindende Domäne an Aktin und ist u.a. in Prozesse wie Zellwachstum, Zytoskelett-Organisation und Endozytose sowie an der Proteinsortierung zwischen Mitochondrien und Zytosol involviert (Vadu-

³ Jede der klonierten cDNAs verfügt über ein ORF im sequenzierten Bereich.

va *et al.*, 1997). VRP1 enthält eine ausgeprägte Prolin-reiche Domäne, die an SH3-Domänen von Typ I Myosinen bindet (Anderson *et al.*, 1998). Die Interaktion mit der SH3-Domäne von SmTK3 ist der erste Hinweis auf eine Funktion von Verprolin als Zielmolekül von Signaltransduktionskaskaden. VRP1 besitzt in einem relativ großen Bereich der Aminosäuresequenz eine große Ähnlichkeit zu Vinculin aus *Gallus gallus*, was hauptsächlich auf teilweise identische Prolin-reiche Regionen, die auch im *Drosophila*-Vinculin zu finden sind, zurückzuführen ist (Donnelly *et al.*, 1993). Im sequenzierten Teil des *Schistosoma*-Homologs zu Verprolin befinden sich zahlreiche PxxP-Grundmotive und drei putative Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Beides weist darauf hin, dass die Interaktion mit SmTK3 "echt" ist, auch wenn eine Phosphorylierung von Verprolin durch TKs bisher in keinem Organismus nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der angedeuteten Verwandtschaft kann spekuliert werden, dass die Erkennungsmotive für die SH3-Domäne von SmTK3 bei *Drosophila*-Vinculin (s.o.) und *Schistosoma*-Verprolin gleich sind.

Ein weiterer putativer Bindungspartner von SmTK3 weist signifikante Ähnlichkeit zu einer **60 kD-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes** bei *Mus musculus* auf. Der SWI/SNF-Komplex remoduliert ATP-abhängig die Nukleosomenstruktur und fungiert dadurch als Transkriptions- (Co-) Aktivator oder Repressor (Sudarsanam & Winston, 2000). Genetische Studien in Mensch und Maus haben gezeigt, dass diverse Untereinheiten dieses Komplexes als Tumorsuppressor-Gene bezeichnet werden können. Beispielsweise gibt es deutliche Hinweise auf die Regulation der Transkription von Proto-Onkogenen wie *c-myc*, *c-jun* und *c-fos* und diversen Cyclinen durch die Interaktion von SWI/SNF mit Aktivator- und Repressor-Proteinen. Das verdeutlicht die Integration des SWI/SNF-Komplexes in viele Signaltransduktionsprozesse, auch solche, die Zellproliferation und Differenzierung steuern. Studien an den homologen Komplexen von Hefe und *Drosophila* bekräftigen diese Aussagen (Klochender-Yeivin *et al.*, 2002). Die Isolierung eines Proteins mit signifikanter Homologie zu einer 60 kD-Untereinheit konnten deuten auf die Existenz eines SWI/SNF-homologen Komplexes bei Schistosomen hin. Die Relevanz der Interaktion dieser Untereinheit mit SmTK3 *in vivo* bei Schistosomen muss jedoch angezweifelt werden, da bisher meines Wissens nach weder die temporäre Lokalisation einzelner Untereinheiten oder des gesamten Komplexes im Zytoplasma noch deren Tyrosinphosphorylierung beschrieben worden ist. Möglicherweise ist die Interaktion auch auf die M-Phase beschränkt.

Der humane Translations-Initiationsfaktor **eIF-4 γ** (p220) ist Bestandteil des Proteinkomplexes eIF-4, der in folgende Prozesse involviert ist: Erkennung des mRNA-Caps, Entwindung der 5'-terminalen Sekundärstruktur und Rekrutierung der mRNA zum Ribosom (Yan *et al.*, 1992). Die durch Stimulation von Wachstumsfaktoren ausgelöste mitotische Aktivität von Zellen erfordert eine gesteigerte Proteinsynthese und wahrscheinlich auch die gesteigerte Translation selektiver Transkripte. Hierbei ist die Aktivierung der Translation über die Phosphorylierung des eIF-4-Komplexes (genauer: des Faktors eIF-4E) durch die MAP-Kinasen ERK und Mnk1 von zentraler Bedeutung (Gomperts *et al.*, 2002). Die Isolation eines eIF-4 γ -homologen Moleküls als putativer Bindungspartner von SmTK3 weist zum ersten Mal darauf hin, dass dieser Translations-Initiationskomplex auch bei Schistosomen existiert und möglicherweise an eine Tyrosinkinase bindet. Das humane eIF-4 γ -Protein verfügt über zahlreiche Phosphorylierungsstellen (Yan *et al.*, 1992), eine Tyrosinphosphorylierung konnte jedoch bisher noch nicht nachgewiesen werden. Es gibt allerdings deutliche Hinweise darauf, dass die Zusammensetzung des Komplexes

auf der multiplen Phosphorylierung einzelner Untereinheiten basiert. In diesem Zusammenhang könnte auch eine Tyrosinphosphorylierung von eIF-4 γ durch Src-TKs von Bedeutung sein.

Ein weiterer positiver Klon ist über den sequenzierten Bereich der abgeleiteten Aminosäuresequenz identisch zum bereits von M. Menrath (1989) isolierten **YME1**-Homologs von *Schistosoma mansoni*. Bei YME1 aus Hefe handelt es sich um eine ATP- und Zink-abhängige Metalloprotease, die zur Familie der AAA-Proteine⁴ gehört und die in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist (Leonhard *et al.*, 1999). Dort degradiert YME1 spezifisch ungefaltete Membranproteine. YME-1-homologe Proteine sind auch in anderen Metazoen wie *Drosophila* und in *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen worden (Juhola *et al.*, 2000). Im Zusammenhang mit Signaltransduktion ist diese Proteinfamilie bisher noch nicht beschrieben worden. Das *Schistosoma*-Homolog zu YME-1 enthält ein PxxP-Grundmotiv, auf das wahrscheinlich die Bindung zur SH3-Domäne von SmTK3 zurückzuführen ist; putative Tyrosin-Phosphorylierungsstellen konnten jedoch nicht bestimmt werden. Die Interaktion mit SmTK3 weist erstmals auf eine Beteiligung von YME-1-Metalloproteasen an Signaltransduktionsprozessen hin. Für die Disintegrin-Metalloprotease ADAM12 ist eine Assoziation mit Src über die SH3-Domäne in Myoblasten beschrieben worden, wodurch ihr eine Funktion in der Zelldifferenzierung zugeschrieben wird (Kang *et al.*, 2000).

Auf die Interaktionen von SmTK3 mit **mRNA-Methyltransferase-** und **Nikotinat-Nukleotid-Pyrophosphorylase**-homologen Proteinen wird nur sporadisch eingegangen, da vor allem über letzteres Molekül wenig bekannt ist. Dem entsprechend sind beide Moleküle im Zusammenhang mit Src-TKs bisher nicht beschrieben worden. Einige Methyltransferasen sind jedoch nachweislich in Signaltransduktionsprozesse involviert (z.B. Cimato *et al.*, 2002). Weitere positive Klone weisen keine signifikante Homologie zu Proteinen aus Datenbanken auf, so dass entweder die vollständigen Moleküle oder nur die sequenzierten Bereiche spezifisch für *Schistosoma* sind.

Es gibt einige Beispiele für eine Interaktion von Proteinkinasen über ihre Substratbindungsstellen mit Proteinen *downstream* im Signalweg, bei denen die Phosphorylierung des Bindungspartners ausbleibt. Solchen Fällen liegt meistens die Bildung von multiplen Proteinkomplexen zugrunde, bei denen die Proteinkinase eine Untereinheit bindet und eine andere phosphoryliert (Gomperts *et al.*, 2002). Daher ist das Fehlen von putativen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in SmTK3-Substraten kein Hinweis darauf, dass die Interaktion *in vivo* bei Schistosomen nicht stattfindet.

4.4.3. Die Qualität der *Schistosoma*-Yeast-Two-Hybrid-Bank und des homologen Screenings

Wird ein putativer Bindungspartner durch ein Screening mehrfach kloniert, so ist dies ein Hinweis auf die Echtheit der Interaktion. Dementsprechend kann die Interaktion von SmTK3 zu SmDRF-V innerhalb des Hefe-Systems als sicher betrachtet werden, da acht DIA3-homologe Klone isoliert werden konnten. Das gilt auch für die Bindung an das eIF-4 γ -homologe Protein (vier positive Klone) und vor allem für die Klongruppe A, die aus zwanzig nahezu identischen

⁴ *ATPases associated with diverse cellular activities*

Klonen besteht, zu denen aber keine signifikant ähnlichen Proteine in den Datenbanken gefunden werden konnten. Im Gegensatz dazu können jedoch Klone, die nur einmal erhalten werden, nicht ohne weiteres als falsch-positiv bezeichnet werden. Wird nur eine geringe Anzahl an Klonen isoliert, die für denselben Bindungspartner kodieren, so kann das eventuell auf eine Unterrepräsentation von cDNA-Populationen, die für die entsprechende Bindungsstelle kodieren, in der Bank zurückzuführen sein. Dafür gibt es zwei Gründe: Entweder wird das Gen wenig-abundant in Schistosomen transkribiert oder die Ursache basiert auf technischen Gründen. Ersteres wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass durch die heterologen und den homologen Screenings insgesamt nur zwei Signaltransduktionsmoleküle (*Drosophila*-Abi und SmDRF-V) isoliert werden konnten. Und dass, obwohl mehr als die Hälfte aller bekannten v-Src-Substrate diesem Bereich zuzuordnen sind. Das deutet aber um so mehr entweder auf eine starke Bindung zwischen SmTK3 und SmDRF-V oder auf eine abundante Transkription des DIA3-homologen Moleküls oder auf beides hin. Wird bei der Konstruktion der Bank ein Oligo(dt)-Primer für die Erststrangsynthese⁵ eingesetzt, dann führt das möglicherweise zu technischen Problemen, wenn der für die Bindungsstelle des gesuchten *target*-Moleküls kodierende Abschnitt im 5'-Bereich des Gens liegt. Das ist darauf zurückzuführen, dass bei der cDNA-Synthese die Wahrscheinlichkeit für einen vorzeitigen Abbruch der reversen Transkription zunimmt, je länger die mRNA ist. Daher sind cDNA-Populationen, die Bindungsstellen im N-terminalen Bereich eines Proteins repräsentieren, um so weniger in einer Bank vertreten, je weiter N-terminal die Bindungsstelle liegt und je länger die kodierende DNA-Sequenz des Proteins ist. Beide angeführten Punkte können auch die Ursache dafür sein, dass (weitere) *in vivo* bei Schistosomen relevante Bindungspartner von SmTK3 möglicherweise nicht isoliert werden konnten.

Für solche übergreifenden Betrachtungen der Resultate des Yeast-Two-Hybrid-Screenings muss auch die Qualität der *Schistosoma*-Bank berücksichtigt werden. Es gibt mehrere Punkte, die darauf hinweisen, dass in dieser Bank hauptsächlich Transkripte von mittlerer Größe repräsentiert sind. Die Analyse der LD-PCR zeigte deutlich bis zu 4 kB große Amplifikationsprodukte. Die durchschnittliche Insertgröße wurde mit 1.2 kB bestimmt. Das größte Insert dieser Testreihe war ca. 3.5 kB lang. Durch das Screening mit der SH3-Domäne von SmTK3 konnten Klone von 1.0 kB bis 2.7 kB isoliert werden. Das bedeutet nicht unbedingt, dass diese Bank keine Inserts enthält, die größer als 4 kB sind. Es weist jedoch darauf hin, dass große Klone unterrepräsentiert sind. Dementsprechend muss im Vergleich zu diesem Screen die Zahl der zu durchsuchenden Klone deutlich erhöht werden, wenn Bindungsstellen im N-terminalen Bereich größerer Moleküle erwartet werden. Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass bei der Konstruktion der Bank cDNAs bis zu 500 bp Länge durch eine Filtertechnik aussortiert und daher beim Screen auch nicht isoliert worden sind.

Es ist wichtig zu bemerken, dass alle hier beschriebenen Interaktionen mit SmTK3 zunächst einmal nur in der Hefe, also in einem heterologen Organismus nachgewiesen worden sind. Damit sind deutliche Hinweise auf eine Bindung von SmTK3 *in vivo* bei *Schistosoma* an diese Proteine erbracht worden, aber noch keine Nachweise. In der Regel werden Resultate aus Yeast-Two-Hybrid-Studien durch die Reproduktion der Interaktionen *in vitro* z.B. durch Immunopräzipitation abgesichert. Aufgrund der begrenzten Zeit war das im Laufe dieser Arbeit für keinen Bindungspartner möglich. Hinweise darauf, dass die Interaktionen auch *in vivo* in *Schi-*

⁵ Die Erststrangsynthese ist das initiale Umschreiben des RNA-Templates in cDNA durch die Reverse Transkriptase.

stosoma von Relevanz sind, könnten durch vergleichende Lokalisationsstudien erhalten werden. Weiterführende Versuche, wie z.B. die Charakterisierung von *knock outs* beider an der Interaktion beteiligten Proteine sind bei *Schistosoma* in Zukunft vielleicht auf der Basis des neu entwickelten Gentransfer-Systems (Wippersteg *et al.*, 2002) möglich.

4.4.4. Heterologer und Homologer Screen im Vergleich

Überraschenderweise konnte kein positiver Klon aus dem homologen Screen durch den heterologen Screen bestätigt werden. Möglicherweise handelt es sich bei einigen Interaktionspartnern um *Schistosoma*-spezifische Proteine. Es mag aber auch daran liegen, dass viele Proteine bei *Drosophila*, aber nicht bei *Schistosoma* bekannt sind. Viele der positiven Klone des homologen Screens konnten wegen Zeitmangel nur partiell sequenziert werden, so dass in vielen Fällen nicht einmal der für die Bindungsstelle kodierende Bereich erfasst worden ist. Damit liegen möglicherweise von einigen Klonen nur Sequenzinformationen vor, die einen nicht-konservierten Bereich abdecken. Werden diese Sequenzinformationen für Datenbankvergleiche verwendet, so fällt es schwer, das abgeleitete Protein zu identifizieren bzw. einzuordnen. Daraus folgt, dass gleichartige positive Klone aus beiden Screenings möglicherweise nicht als solche erkannt worden sind.

In diesem Zusammenhang ist ebenfalls zu beachten, dass die *Drosophila*-Bank Transkripte aus Embryonen und die *Schistosoma*-Bank Transkripte aus adulten Tieren repräsentiert. Möglicherweise werden einige der isolierten Interaktionspartnerentwicklungsspezifisch transkribiert, so dass sie nicht in beiden Banken in vorhanden sind.

Eine weitere Erklärung für diese Diskrepanz zwischen den beiden Screenings besteht in dem Ereignis *domain-shuffling* (*exon-shuffling*), welches zwischen verschiedenen Proteinen in der Entwicklungsgeschichte von Trematoden zu Arthropoden stattgefunden haben könnte. Dieses Phänomen beschreibt den Austausch von Domänen zwischen zwei Molekülen durch Rekombinationsereignisse auf DNA-Ebene (Saier & Reizer, 1990; Thornton & DeSalle, 2000). Damit bleibt die Bindungsspezifität zwischen einer bestimmten SH3-Domäne und einer bestimmten Prolin-reichen Region zwar erhalten, jedoch ändern sich die miteinander interagierenden Proteine.

4.4.5. Die Bindungseigenschaften der SH3-Domäne von SmTK3

Die Bindungseigenschaften von SH3-Domänen sind bei Vertebraten eingehend untersucht worden. SH3-Domänen binden an Prolin-reiche Regionen, die bis auf wenige Ausnahmen, über ein PxxP-Grundmotiv verfügen (Kay *et al.*, 2000). Die variablen Aminosäuren im Zentrum dieses Motivs, sowie die benachbarten Aminosäuren sind für die Spezifität verantwortlich (Rickles *et al.*, 1995). SH3-Liganden können entweder in N-terminal-C-terminaler (Klasse I) oder in umgekehrter (Klasse II) Orientierung binden (Abb. 4-3). Die SH3-Bindungstasche enthält zwei hydrophobe Fugen, die mit der Kernsequenz (xPxxP) des Prolin-reichen Motivs in Wechselwirkung treten. Eine zweite Region der SH3-Domäne (*specificity pocket*) bindet die Aminosäurereste N-terminal (Klasse I) oder C-terminal (Klasse II) zur Kernsequenz (Thomas &

Brugge, 1997). Die SH3-Domänen humaner Src-Tyrosinkinasen interagieren bevorzugt mit zwei Konsensus-Motiven: +xxPxxP (Klasse I) und PxxPx+ (Klasse II). Die Bindungsaffinitäten zwischen SH3-Domänen und den Prolin-reichen Sequenzen sind relativ gering. Wahrscheinlich werden solche Interaktionen *in vivo* durch zusätzliche Kontakte zwischen Substratprotein und Src-TK (z.B. durch die Kinase-Domäne) verstärkt.

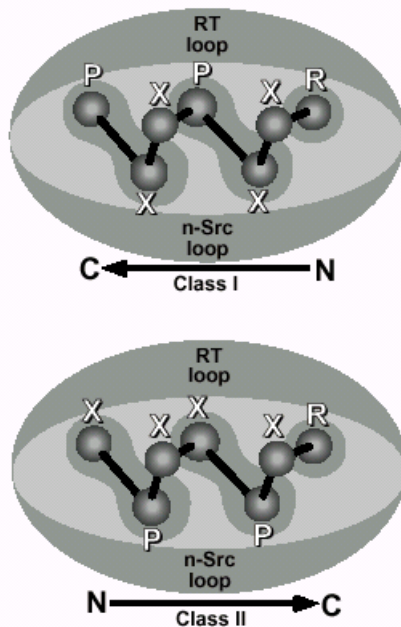


Abb. 4-3. Die Interaktion von SH3-Domänen mit Prolin-reichen Motiven. Schematisch dargestellt sind die Bindungen von Klasse I- (oben) und Klasse II-Motiven (unten). Die beiden hydrophoben Fugen der SH3-Bindungstasche sind jeweils links, die *specificity pocket*, die in diesem Fall ein Arginin als basische Aminosäure bindet, ist jeweils rechts grau unterlegt. Die Orientierung des Prolin-reichen Motivs ist unter jedem Diagramm angegeben. RT- und N-Src-Loops sind variable Regionen der SH3-Domäne. Die Wechselwirkung dieser Loops mit Aminosäuren, die benachbart der PxxP-Grundmotive liegen, machen z.T. die Spezifität einer Interaktion zwischen SH3-Domäne und Prolin-reicher Region aus (Mayer, 2001). Die ungefähren Positionen der RT- und N-Src-Loops sind eingezeichnet. Modifiziert nach Mayer (2001).

Die Interaktionspartner der SH3-Domäne von SmTK3 erfüllen die vorgestellten Konsensus-Sequenzen nur bedingt. Aussagen über Prolin-reiche Domänen, die putativ an die SH3-Domäne von SmTK3 binden, können nur von der Interaktionspartnern, die aus dem Screening der *Drosophila*-Bank stammen, von dem YME-1-Homolog und von SmDRF-V gemacht werden. Das liegt daran, dass die vollständigen Aminosäuresequenzen der *Drosophila*-Proteine und des YME-1-Homologs in Datenbanken einzusehen sind, und dass SmDRF-V im Gegensatz den anderen positiven Klonen vollständig sequenziert worden ist. Einige der ermittelten Interaktionspartner, wie auch SmDRF-V verfügen über ausgeprägte Prolin-reiche Domänen mit zumindest mehreren PxxP-Grundmotiven. In diesen Fällen kann über eine genaue Bindungsstelle keine Aussage gemacht werden. Es wird allerdings spekuliert, dass die Spezifität und die Affinität der Interaktion durch die Präsenz wiederholter Bindungsmotive innerhalb eines Proteins durch die Erhöhung ihrer lokalen Konzentration für die SH3-Domäne erhöht wird (Brown & Cooper, 1996). Einige der isolierten Subklone verfügen über ein Klasse I-Motiv. Das trifft vor allem auf Proteine wie z.B. Vinculin oder Abi-GP zu, für die eine Interaktion mit einer SH3-Domäne bereits beschrieben ist. Daneben gibt es einen weiteren Klon (SF1), der in der Primärsequenz zwei voneinander räumlich getrennte Grundmotive enthält. Überraschenderweise fehlt sieben weiteren Subklonen das Grundmotiv. In fünf Fällen gibt es ein PxxxP-Motiv, in einem Fall nur eine Ansammlung von drei Prolinen direkt nebeneinander und in einem weiteren Fall nur einzelne Prolin. Zwei Ausnahmen, die vom PxxP-Grundmotiv abweichen, sind bisher beschrieben worden: Ein PxxDY-Motiv (Mongiovi *et al.*, 1999) und das Motiv RKxxYxxY, das ohne jedes Prolin auskommt (Kang *et al.*, 2000). Beide Motive interagieren mit der konventionellen PxxP-

Bindungstasche vom SH3-Domänen. Jedoch ist keines dieser Motive in einem der sieben angesprochenen Subklone vorhanden.

Für Src-TKs von Vertebraten ist gezeigt worden, dass bei der inaktiven Konformation, die eigene SH3-Domäne an den SH2-Kinase-Linker⁶ bindet. Obwohl diese Linker-Regionen oft nur einen einzelnen Prolinrest enthalten, formen diese Sequenzen eine linkshändige Typ II- (PPII-) Helix (Mayer & Eck, 1995) und binden die SH3-Domäne in derselben Orientierung wie Klasse II-Liganden. Zwei Regionen der SH3-Domäne, die benachbart der hydrophoben Bindungstasche liegen, interagieren mit der katalytischen Domäne (Thomas & Brugge, 1997). Möglicherweise liegt der Bindung von SmTK3 an die Expressionsprodukte ohne PxxP-Grundmotiv ein ähnlicher Mechanismus zugrunde. Es sei allerdings angemerkt, dass SmTK3 (im Gegensatz zu SmTK5) innerhalb des SH2-Kinase-Linkers über ein PxxP-Grundmotiv verfügt.

Dass diese Klone ohne Grundmotiv nicht leichtfertig als "falsch-positiv" abgehandelt werden dürfen, zeigt allein schon die Tatsache, dass es PxxP-alternative Bindungsstellen für SH3-Domänen nachgewiesen worden sind (s.o.). Es ist zu bedenken, dass die Kenntnisse über die Bindungseigenschaften von SH3-Domänen ausschließlich von Untersuchungen an Vertebraten-Molekülen stammen. Wie bereits erwähnt, scheinen viele Interaktionen zwischen zwei Proteinen konserviert zu sein, die auf einer Wechselwirkung zwischen SH3-Domäne und Prolinreicher Region basieren (Kap. 4.4.1). Trotzdem können weitere Abweichungen (zusätzlich zu den bereits beschriebenen) des SH3-Domänen-Bindungsmotivs nicht ausgeschlossen werden. Bei Betrachtung des Ausnahme-Motivs RKxxYxxY fällt auf, dass die Proline des PxxP-Grundmotivs durch Tyrosine ersetzt worden sind; das Lysin hingegen steht für die positive Aminosäure des Klasse I-Motivs. Möglicherweise ist diese Substitution auch an andere Stelle möglich. Wird einer dieser Austausche in umgekehrter Richtung bei dem PxxDY-Motiv durchgeführt, so ergibt sich PxxDP oder, als reduzierte Variante, PxxxP. Das ist ein Motiv, das in einigen positiven Klonen aus dem heterologen Yeast-Two-Hybrid-Screen zu finden ist.

Abschließend soll erwähnt werden, dass Barnett *et al.* (2000) eine weitere Bindungsstelle für SH3-Domänen nachgewiesen haben, die unabhängig vom PxxP-Grundmotiv ist und auf einer amphipathischen α -Helix basiert. Dieses noch nicht detailliert bestimmte Motiv wird von einer SH3-Domäne erkannt, die auch an PxxP-Grundmotive bindet.

4.4.6. Die Bindungseigenschaften der *unique-site* von SmTK3

Wie einleitend angemerkt, ist über die Funktion der *unique-site* wenig bekannt. Es wird spekuliert, dass sie einen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Src-TK zu Substraten hat (Thomas & Brugge, 1997). Diese Vermutung wird durch die Quantifizierung der Bindungsstärken zwischen einzelnen positiven Klonen und den zwei verschiedenen SmTK3-*bait*-Konstrukten bekräftigt. Die Bindungsaffinitäten zwischen der SH3-Domäne und den *Drosophila*-Proteinen Abi-GP, SF1 und Tubulin sowie dem *Schistosoma*-Protein SmDRF-V werden durch die *unique-site* um 50% bis zu mehr als 100% erhöht. Nur bei der Interaktion mit *Drosophila*-Vinculin wird die Bindung durch die *unique-site* geschwächt. Es wäre falsch, aufgrund dieses Resultates den Schluss zu ziehen, dass die Bindung an Vinculin *in vivo* bei Schistosomen nicht stattfindet (zumal schon eine Interaktion einer Src-TK mit Vinculin beschrieben ist). Es ist vielmehr davon

⁶ Das ist ein kurzer Bereich zwischen der SH2- und der TK-Domäne.

auszugehen, dass die *unique-site* dafür (mit-) verantwortlich ist, die Bindungsaffinität der SH3-Domäne zum Substrat den *in vivo* notwendigen Gegebenheiten in Hinsicht auf die Anzahl der zu phosphorylierenden Substrate pro Zeiteinheit anzupassen. Diese "Feinjustierung" hat sich wahrscheinlich im Laufe der Evolution etabliert und betrifft mit Sicherheit neben der *unique-site* weitere Regionen von Src-TK und Substrat, wie z.B. die der PxxP-Sequenz benachbarten Aminosäuren. Es muss bedacht werden, dass eine SH3-Domäne an mehrere verschiedene Substrate mit möglicherweise ähnlichen Prolin-reichen Regionen bindet. Dann erscheint es sinnvoll, mit der *unique-site* über eine Region zu verfügen, die dafür sorgt, dass zwei solche Substrate unterschiedlich häufig gebunden werden, indem sie die Bindungsaffinität zu einem Substrat erhöht und zu einem anderen reduziert.

4.5. FH-Proteine, Diaphanous-Proteine und SmDRF

4.5.1. Diaphanous-Proteine als Mitglieder der FH-Protein-Superfamilie

Mitose und Meiose benötigen die räumliche und zeitliche Koordination der Zellteilung mit der Kernteilung. FH- (*formin homology*-) Proteine nehmen eine wichtige Funktion bei dieser Koordination ein, indem sie Bildung und die Stabilisierung des kontraktiven Rings regulieren. Mitglieder dieser Proteinfamilie sind in viele Aktin-vermittelte Prozesse involviert, die Zellpolarität und Zellform betreffen. FH-Proteine sind durch die drei *formin homology*-Domänen FH1, FH2 und FH3 sowie durch die Präsenz von mindestens einer *coiled-coil*-Region charakterisiert und konnten bisher bei Vertebraten (*Homo sapiens*, *Mus musculus*), Invertebraten (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*), Hefen und Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) nachgewiesen werden (Petersen *et al.*, 1998; Wassermann, 1998).

Eine Gruppe von Mitgliedern der FH-Proteinfamilie sind die Diaphanous-Proteine (DRF-Proteine), die das Aktin-Filament mit den Rho-GTPasen physikalisch verbinden. Diese Verbindung ist wahrscheinlich essentiell für die GTPase-vermittelte Regulierung der Aktin-Zytoskelett-Organisation. Diaphanous-Proteine sind durch die drei FH-Domänen und durch zwei weitere konservierte Regionen definiert (Abb. 4-4), die bei verschiedenen Vertretern mit Ausnahme der FH2-Domäne, alle stark in der Länge variieren können (Petersen *et al.*, 1998).



Abb. 4-4. Die Anordnung der konservierten Domänen von Diaphanous-Proteinen. Modifiziert nach Alberts, (2001).

Über die RBD- (GBD-) Domäne binden DRF-Proteine an aktivierte Rho-GTPasen (Krebs *et al.*, 2001). Rho-GTPasen sind Mitglieder der Ras-Superfamilie, die alle monomeren GTP-bindenden Proteine umfasst. GTPasen fungieren als molekulare Schalter zwischen einer aktiven GTP-bindenden und einer inaktiven GDP-bindenden Form. In der aktiven Form intera-

gieren sie mit *target*-Molekülen und induzieren eine Signalweiterleitung. Eine intrinsische GTPase-Aktivität überführt die Proteine in den inaktiven Status (Bishop & Hall, 2000).

Die FH3-Domäne ist für die Lokalisation der DRF-Proteine innerhalb der Zelle verantwortlich. Für die FH3-Domäne eines Diaphanous-Proteins der Maus (mDia1) konnte gezeigt werden, dass diese Region das Protein an die mitotische Spindel positioniert (Kato *et al.*, 2001). Bei einigen DRF-Proteinen überschneiden sich RBD- und FH3-Domäne, bei anderen sind sie durch eine Linker-Region getrennt (Petersen *et al.*, 1998).

Die FH1-Domäne ist eine Prolin-reiche Proteinbindedomäne und vermittelt die Bindung von DRF-Proteinen mit dem G-Aktin-bindenden Protein Profilin. Wahrscheinlich werden die Aktin-Profilin-Komplexe durch die Interaktion mit DRF-Proteinen an eine bestimmte Position innerhalb der Zelle rekrutiert und zur Aktin-Polymerisation angeregt (Krebs *et al.*, 2001). Es gibt in Hefe auch Hinweise auf eine Profilin-unabhängige DRF-Aktin-Verbindung (Evangelista *et al.*, 1997). Die Maus-homologen Diaphanous-Proteine mDia1 und mDia2 binden über ihre FH1-Domänen an die SH3-Domäne von Src, wodurch sie mit RTK- (*receptor tyrosine kinase*) und/oder FAK- (*focal adhesion kinase*) Signalwegen und der SRF- (*serum response factor*) abhängigen Transkriptionsaktivität verbunden werden (Tominaga *et al.*, 2000). Der Transkriptionsfaktor SRF bindet als Heterodimer an SRE-Elemente in genregulatorischen Sequenzen und moduliert so die Expression von Genen wie z.B. Aktin und Vinculin (Psichari *et al.*, 2002).

Über die Funktion der FH2-Domäne ist wenig bekannt. Für mDia1 ist gezeigt worden, dass sie an der Koordination des Mikrotubuli- und des Aktin-Filament-Netzwerkes beteiligt ist (Ishizaki *et al.*, 2001). Die molekulare Basis dieser Verbindung ist jedoch unklar.

Diaphanous-Proteine verfügen mit der DAD-Domäne am C-Terminus über eine autoregulatorische Region. Ähnlich wie bei Src-TKs wechseln DRF-Proteine zwischen einer inaktiven, geschlossenen und einer aktiven, offenen Konformation. In Anwesenheit von Rho-GDP bindet die DAD- an die RBD-Domäne und DRF befindet sich im inaktiven Status. Diese Selbstinhibition wird durch die Bindung von Rho-GTP an die RBD-Domäne aufgehoben (Abb. 4-5; Alberts, 2001).

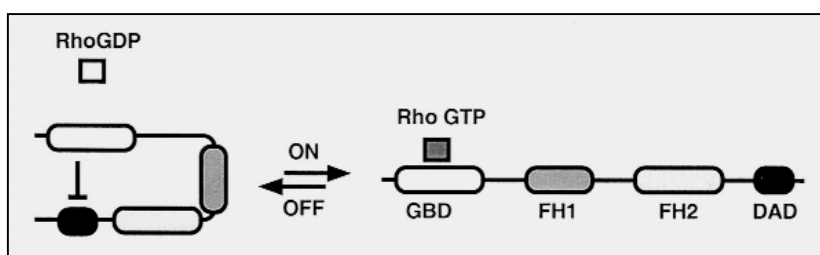


Abb. 4-5. Ein Modell, das den autoregulatorischen Mechanismus von DRF-Proteinen beschreibt. Modifiziert nach Alberts (2001). GBD = RBD.

Coiled-coil-Regionen sind eine der am weitesten verbreitetsten Motive, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Die Leucin-Zipper Domäne einiger Transkriptionsfaktoren ist das beste Beispiel für diese Regionen (Lupas, 1996). Diaphanous-Proteine besitzen meistens zwei bis drei solcher Motive (vgl. Kap. 3.3.6.3).

Aufgrund ihrer Funktion als Organisatoren des Aktin-Zytoskeletts sind DRF-Proteine wahrscheinlich in viele Signalwege involviert, z.B. in solche, die Zellproliferation, Zellform und Differenzierung regulieren (Krebs *et al.*, 2001). Während der tierischen Zytokinese resultiert die Kontraktion des Membran-assoziierten Aktin/Myosin-Rings in einer äquatorialen Invagination der Zellmembran, worauf die Teilung von einer Zelle in zwei Tochterzellen erfolgt. Die Position

dieses kontraktilen Rings wird wahrscheinlich durch die mitotische Spindel und durch die Interaktion zwischen zentrosomalen Mikrotubuli und dem Zellkortex festgelegt (Afshar *et al.*, 2000).

Für mDia1, einem Diaphanous-Protein aus der Maus, wird eine Funktion bei der Interaktion zwischen mitotischer Spindel und *cleavage furrow* bei der Zellteilung vermutet (Kato *et al.*, 2001). Bei *Drosophila* sind Diaphanous (Dia1) homozygot-mutierte Männchen aufgrund eines Zytokinese-Defekts während der Meiose steril. Weibchen mit einer heterozygoten Dia1-Mutation legen Eier mit defekten Eischalen und sind ebenfalls steril, wahrscheinlich weil die Zytokinese in der Follikel-Zellschicht abnormal verläuft (Castrillon & Wasserman, 1994). Dia1 spielt auch in der *Drosophila*-Embryogenese eine entscheidende Rolle. Dia1-defiziente Embryonen weisen Abnormitäten bei der Bildung der Metaphasefurche, bei der Zellularisierung und bei der Formation der Polzellen durch Fehler in der Aktin-Zytoskelett-Organisation auf (Afshar *et al.*, 2000). Interessant ist auch, dass die C-terminale Verkürzung des humanen DRF1 (hDia1) im Zusammenhang mit einer autosomal dominanten Form von Taubheit gebracht wird (Lynch *et al.*, 1997). Und sehr wahrscheinlich verantwortet mutiertes hDia1 auch einen Defekt in der Ovarentwicklung bei POF- (*premature ovarian failure*) Patienten (Bione *et al.*, 1998).

4.5.2. SmDRF/SmDRF-V

Durch den homologen Yeast-Two-Hybrid-Screen zur Identifizierung von SmTK3-Interaktionspartnern wurden insgesamt acht Klone mit signifikanter Homologie zu Diaphanous-Proteinen isoliert. Aus den längsten Klonen wurde eine vorläufige, gut 2.7 kB lange cDNA-Sequenz (SmDRF-V⁷) erstellt, die ein ORF von knapp 2.5 kB Länge enthält. Die abgeleitete Aminosäuresequenz beinhaltet eine FH1-, eine FH2, eine partielle FH3 und eine CIID/DAD-Domäne sowie drei *coiled-coil*-Regionen. Es gibt mehrere Gründe, die darauf hin deuten, dass SmDRF-V im 5'-Bereich bzw. am N-Terminus unvollständig ist. An Position 17 der abgeleiteten Aminosäuresequenz befindet sich ein putatives Startmethionin, das jedoch mitten in der FH3-Domäne liegt. Folglich ist es sehr unwahrscheinlich, dass dort tatsächlich die Synthese des vollständigen Proteins beginnt. Zudem fehlt SmDRF-V im Vergleich mit anderen Diaphanous-Proteinen der N-terminale Teil der FH3-Domäne und die vollständige, N-terminal gelegene RBD-Domäne. FH- bzw. Diaphanous-Proteine umfassen in der Regel 1.000 bis 2.000 Aminosäuren (Wasserman, 1998), das mDia3- (DRF3-) Gen der Maus, zu dem SmDRF-V die größte Ähnlichkeit aufweist, verfügt über gut 3.5 kB kodierende Sequenz (1171 AS). Durch eine Northern-Blot-Analyse konnte die Länge des vollständigen Transkriptes von SmDRF ebenfalls auf ca. 3.5 kB abgeschätzt werden. Damit fehlen SmDRF-V noch etwa 800 bp im 5'-Bereich zum vollständigen Protein. Die Länge der fehlenden Sequenz reicht aus, um für eine RBD-Domäne (ca. 630 bp) zu kodieren. Für den Fall, dass RBD- und FH3-Domäne bei SmDRF den erwarteten Größen entsprechen, würden sie bei einer insgesamt 3.5 kB großen cDNA-Sequenz überlappen, wie es z.B. auch bei mDia1 der Fall ist (Krebs *et al.*, 2001). Dabei stellt sich die Frage, wie die simultane Bindung von Rho-GTP und die Lokalisierung vom mDia1 an zwei sich überschneidende Domänen möglich ist. Für die zuvor beschriebene Positionierung von mDia1 an die mitotische Spindel ist von den drei Clustern von homologen Sequenzen innerhalb der FH3-Domäne nur das C-terminal gelegene von Bedeutung (Kato *et al.*, 2001). Möglicherweise spielt das N-

⁷ SmDRF-V bezeichnet die unvollständige cDNA von SmDRF bzw. das daraus abgeleitete partielle Protein.

terminale Cluster, das sich größtenteils innerhalb der RBD-Domäne befindet, keine Rolle für die Lokalisierung von mDia1.

Für die autoregulatorische Funktion der DAD-Domäne sind innerhalb des Motivs MDxLLExL vor allem das N-terminale Methionin und das N- sowie das C-terminale Leucin für die interne Bindung an die RBD-Domäne essentiell (Alberts, 2001). Bei SmDRF-V findet sich nur das C-terminale Leucin wieder, die anderen beiden Aminosäuren sind durch Isoleucin bzw. Methionin ersetzt. Für den Fall, dass bzgl. der intramolekularen Bindung keine Co-Evolution der beiden beteiligten Domänen stattgefunden hat, verfügt SmDRF möglicherweise nicht über diesen autoregulatorischen Mechanismus.

Die zuvor erwähnte Northern-Blot-Analyse von SmDRF-V ergab, dass zusätzlich zum Vollängentranskript ein verkürztes Transkript von ca. 1.3 kB in mindestens gleicher Menge gebildet wird. Anhand von Sequenzmerkmalen und der Isolation eines Klons mit einer Deletion wurden Überlegungen angestellt, welche Bereiche ein putatives verkürztes Protein umfassen könnte (s. Kap. 3.3.6.5). Daraus resultierten zwei hypothetische Varianten. Das erste Protein würde fast die vollständige FH1-Domäne, die FH2-Domäne und eine *coiled-coil*-Region enthalten. Dieses verkürzte Protein würde wahrscheinlich seine Funktion über die FH2-Domäne im Zusammenspiel mit FH1-Bindungspartnern wie Profilin unabhängig von Rho-GTPasen ausüben, da es keine entsprechende Bindungsstelle besitzt. Da diesem putativen Protein sowohl die RBD- als auch die DAD-Domäne fehlt, würde es wahrscheinlich über keinen autoregulatorischen Mechanismus verfügen. Eine konstitutive, unregulierte Funktion ist für ein Protein, das die Zytoskelett-Organisation steuert, schwer vorstellbar. Möglicherweise wird es durch eine Interaktion über die FH1-Domäne reguliert. Bei dem putativen Protein stellt sich auch zwangsläufig die Frage nach der Lokalisierung, da die FH3-Domäne fehlt. Die zweite Möglichkeit besteht in einem verkürzten Protein mit FH2- und CIID-Domäne und zwei *coiled-coil*-Regionen. Für dieses putative Protein fällt es schwer, eine Funktion zu beschreiben. Protein-Protein-Interaktionen wären nur über die *Coiled-coil*-Regionen möglich, eine FH1-vermittelte Bindung z.B. an Profilin sowie die Regulation durch Rho-GTP sind ausgeschlossen, da die zuständigen Domänen fehlen. Seine Funktionalität würde das Protein vielleicht aufgrund der intakten FH2-Domäne bewahren können. Auch hier würde sich die Frage nach der Lokalisierung stellen.

Die Präsenz von alternativen Transkripten ist auch für *Drosophila*-Diaphanous (Castrillon & Wasserman, 1994) und für das humane Dia1 beschrieben worden. Von den vier verschiedenen hDia1-mRNA-Varianten ist eine Testis-spezifisch. Die vollständigen hDia1-Transkripte werden ubiquitär in vielen Geweben, jedoch präferentiell in den Testes, in den Ovarien und im Darm gebildet (Bione *et al.*, 1998).

4.5.3. SmTK3 und SmDRF/SmDRF-V

Von allen putativen Interaktionspartnern, die durch das Screening von Yeast-Two-Hybrid-Banken isoliert werden konnten, ist SmDRF bzw. SmDRF-V der interessanteste Kandidat. Das liegt zum einen an der (konservierten) Funktion von DRF-Proteinen im Zusammenhang mit dem Zytoskelett, woraus u.a. die Einbindung in die Regulation von Zellproliferation und von Differenzierungsprozessen folgt. Damit ist die Isolierung von SmDRF als SmTK3-Bindungspartner ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Funktion dieser Tyrosinkinase in der Gona-

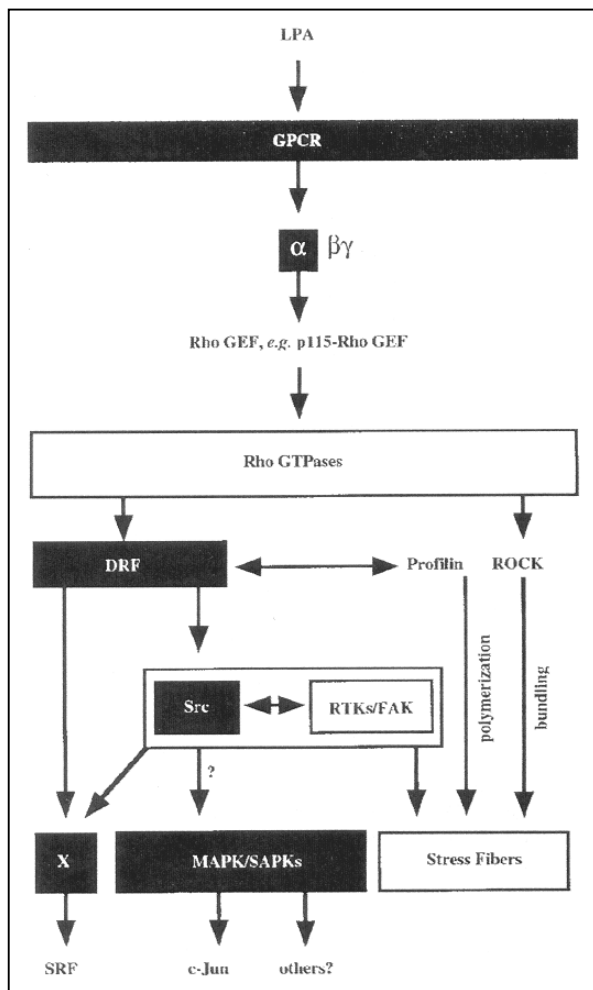


Abb. 4-6. Diaphanous-Proteine verbinden Rho-GTPasen und Src. Src und Rho sind beide in Prozesse involviert, die durch Wachstumsfaktoren gesteuert werden. LPA aktiviert z.B. Signale, die durch die direkte Interaktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) mit Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren Veränderungen im Zytoskelett und in Kinase-Kaskaden bewirken. Rho aktiviert DRF, welches direkt und indirekt durch die Interaktion mit aktiviertem Src über einen unbekanntem Faktor die Expression SRF-abhängiger Gene wie Aktin und Vinculin stimuliert. Unabhängig von Src beeinflusst Rho aber auch über DRF und Profilin bzw. über ROCK (Rho-Kinase) die Organisation der Mikrofilamentbündel (*stress fibers*). Modifiziert nach Tominaga *et al.* (2000).

denentwicklung. Wie schon zuvor angemerkt, sind Funktionen von Diaphanous-Proteinen in der Spermatogenese, in der Oogenese/Ovarienentwicklung und in der Embryogenese bei *Drosophila* und/oder beim Menschen nachgewiesen worden. Zum anderen ist die Interaktion zwischen SmTK3 und SmDRF deswegen interessant, da auch schon bei *Mus musculus* die Bindung von Diaphanous-Proteinen (mDia1 und mDia2) an Src gezeigt werden konnte. Für diese Protein-Protein-Interaktion ist die Bindung der SH3-Domäne von Src an die FH1-Domäne von mDia2 nachgewiesen worden (Tominaga *et al.*, 2000). Daraus folgt, dass die SmTK3/SmDRF-Interaktion wahrscheinlich über die gleichen Domänen abläuft.

Für die Interaktion von Src mit Diaphanous bei der Maus wird eine Funktion in der Zytokinese postuliert. In einem Schema ist dargestellt, wie Diaphanous-Proteine Rho-GTPase- und Src-Signalwege miteinander verbinden (Abb. 4-6). Das aktive Src-Protein hat eine essentielle Funktion während der späten Mitose. Es wird vermutet, dass die Serin-/Threoninkinase Cdc2 die Tyrosinkinase Src durch Phosphorylierung in den frühen Stadien der Mitose aktiviert. Src bleibt aber auch nach der Metaphase aktiv, wenn aufgrund der Degradierung von Cyclin B kaum mehr Cdc2-Kinase-Aktivität vorhanden ist. In diesem Zusammenhang wird spekuliert, dass Diaphanous-Proteine an aktive Src-Proteine binden, sie stabilisieren und dadurch ihre Inaktivierung beispielsweise durch Csk-TKs verhindern (Tominaga *et al.*, 2000). Möglicherweise gilt das auch für die SmTK3/SmDRF-Interaktion.

Bisher ist meines Wissens nach keine Phosphorylierung an Tyrosinen für Diaphanous-Proteine beschrieben worden. Trotzdem ist die Präsenz von sieben putativen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in der Aminosäuresequenz von SmDRF-V ein weiterer Hinweis auf die Echtheit der Interaktion mit SmTK3, da Tyrosinkinasen ihre SH3-Bindungspartner in der Regel phosphorylieren.

4.6. Die Entwicklung einer Technik zur Quantifizierung von DNA-Synthese bei Schistosomen

Einige Versuchsreihen dieser Promotionsarbeit erforderten die Anwendung einer zuverlässigen Methode, die es ermöglicht, in größerem Maßstab DNA-Syntheseraten von in Kultur gehaltenen Schistosomen zu quantifizieren. Da bis zu Beginn dieser Arbeit keine geeignete Technik für diese Zwecke publiziert worden war, musste eine neue Methode entwickelt werden. Das Resultat ist eine Technik, die auf den kombinierten Einsatz von DAPI und BrdU zur Quantifizierung relativer DNA-Syntheseraten basiert. Durch die Reproduktion bekannter Daten (s. Kap. 3.4.3 u. 3.5) konnte die Qualität dieser Methode demonstriert werden.

Der Einbau von BrdU als Marker für replizierte DNA ist weit verbreitet (Dolbear & Selden, 1994). Die zur Detektion benötigten anti-BrdU-Antikörper binden ihr Antigen stöchiometrisch, wenn bis zu 25% aller Thymidine durch BrdU substituiert sind. Bei einem höheren Prozentsatz limitieren sterische Faktoren die Immunreaktion und die Proportionalität zwischen Einbauraten und Intensität der Antikörperfärbung ist nicht mehr gegeben. Um eine geeignete Einbauraten zu erreichen, sind für die Zellkultur BrdU-Konzentrationen zwischen 0.1-10 mM üblich (Dolbear & Selden, 1994). Es ist zu beachten, dass BrdU gerade bei multizellulären Organismen in hohen Konzentrationen auch toxisch wirken kann. Um Signalstärken zu erhalten, die sich für eine Auswertung eignen, ist für Schistosomen eine 24- bis 48-stündige Inkubation von in 1mM BrdU-haltigem Kulturmedium notwendig. Da auch nach vierwöchiger Kultivierung von Würmern mit 1mM BrdU eine Mortalitätsrate von null bestimmt werden konnte und keine phänotypischen Veränderungen beobachtet worden sind (Daten nicht gezeigt), wirkt diese Konzentration nicht toxisch auf Schistosomen.

Durch die DAPI-Färbung werden die Mengen der filtergebundenen DNA von zu vergleichenden Wurmpopulationen gegeneinander abgeglichen. Das Potential dieser Chemikalie in Lösung, auf Agarose- und auf PAA-Gelen spezifisch einzel- und doppelsträngige DNA zu färben, ist seit langem bekannt (Kapuscinski & Yanagi, 1979; Kapuscinski, 1995). Meines Wissens nach neu, wenn auch nicht überraschend, ist die Möglichkeit, auch bis zu 1 µg filtergebundene DNA mit DAPI (2.5 µg/ml) quantifizieren zu können. Bei größeren DNA-Mengen tritt eine Sättigung der Farbreaktion auf, so dass sich die Intensität der Färbung nicht mehr proportional zur DNA-Menge verhält. Hierbei ist zu beachten, dass die Erhöhung der DAPI-Konzentration in der Färbelösung eine vorzeitige Sättigung bewirken kann (vgl. Kapuscinski, 1979).

Aufgrund ihres besonderen Abschlussgewebes, dem Tegument, sind adulte Schistosomen für die Aufnahme endogener Chemikalien wie z.B. BrdU besonders gut geeignet (vgl. Kap. 1). Ob BrdU auch in Organismen eindringen kann, die durch azelluläre Deckschichten wie z.B. eine Cuticula abgeschlossen werden, sei in Frage gestellt. Allerdings gibt es diverse Techniken, um eine Cuticula für Chemikalien permeabel zu machen. Abgesehen von dieser Problematik eignet sich die DAPI/BrdU-Technik wahrscheinlich auch zur Quantifizierung der DNA-Synthese von anderen vielzelligen Organismen, die im wässrigen Milieu gehalten werden können. Möglicherweise stellt sie auch eine Alternative zu den Methoden dar, die in der Zellkultur praktiziert werden.

4.7. Einblicke in die Vitellarentwicklung durch Inhibitorstudien

4.7.1. Der Src-selektive Tyrosinkinase-Inhibitor Herbimycin A

Herbimycin A ist ein Antibiotikum, das ursprünglich aus *Streptomyces*-Arten isoliert worden ist. Das Potential des Benzenoid-Ansamycins, die abnormale Morphologie von *Rous sarcoma virus*- (RSV-) transformierten Zellen wieder zurück in die normale Morphologie zu konvertieren, weckte das Interesse an Herbimycin A in Hinblick auf die Signaltransduktion und die Tumorbilogie. Das für die abnormale Morphologie verantwortliche Onkogen ist v-Src, eine C-terminal mutierte, konstitutiv aktive Form der Src-TK pp60^{c-src}. Herbimycin A inaktiviert die enzymatische Aktivität von v-Src und reduziert den zellulären Gehalt an Phosphotyrosin in RSV-transformierten Zellen (Uehara & Fukazawa, 1991).

Seit dieser Beobachtung haben sich viele Forschungsgruppen mit dem Inhibitor beschäftigt. Es stellte sich heraus, dass Herbimycin A auch die onkogene Wirkung weiterer Src-TKs wie z.B. die von mutiertem c-Yes revertiert. Des weiteren unterbindet der Inhibitor auch die transformierende Wirkung von Tyrosinkinasen aus nahe verwandten Familien, wie z.B. die von v-Abl. Die onkogenen Wirkungen von mutierten Molekülen, die nicht zur Klasse der PTKs gehören, wie die von der Serin/Threoninkinase Raf, die der GTPase Ras oder die des Transkriptionsfaktors *c-myc*, werden durch den Inhibitor nicht aufgehoben (Uehara *et al.*, 1988). Weitere Versuche in diese Richtung zeigten, dass Herbimycin A die Phosphorylierungsaktivität von Serin/Threoninkinasen wie z.B. die der ERK-MAP-Kinase nicht beeinträchtigt (Kang *et al.* 1999; Shioitsu *et al.*, 2000). Gestützt durch diese Beobachtungen wurde Herbimycin A immer häufiger als Tyrosinkinase-spezifischer Inhibitor eingesetzt.

4.7.2. Die Selektivität von Herbimycin A für Tyrosinkinasen der Src-Familie

Wie bereits in Kapitel 3.6.1.2 besprochen, ist die Spezifität der Inhibitoren jeweils von der eingesetzten Dosis abhängig. Die zur Aufhebung der onkogenen Wirkung benötigte Herbimycin A-Konzentration in der Zellkultur ist bei Src-TKs geringer als bei anderen TKs, wie z.B. bei einer mutierten Variante der Fes-TK Fps (Uehara *et al.*, 1988). Daher wird Herbimycin A oft auch als selektiver oder "relativ spezifischer" Inhibitor für Tyrosinkinasen der Src-Familie (Musgrave *et al.*, 1999; Jow & Wang, 2000; Hobson *et al.*, 2000; Langlais *et al.*, 2000; Matrougui *et al.*, 2000) oder sogar als Src-TK-spezifischer-Inhibitor (Lutz *et al.*, 1998) bezeichnet und eingesetzt. Dementsprechend blockiert Herbimycin A bei geringer Dosierung die Kinase-Aktivität von Src-TKs wie z.B. die von Fyn (Migita *et al.*, 1994), nicht aber die anderer TKs, wie die von FAK (Schlaepfer *et al.*, 1998), die vom Syk-Homolog ZAP-70 (Soede *et al.*, 1998) und die von Jak2 (Fresno Vara *et al.*, 2001). Abl-TKs werden jedoch bei vergleichbar geringen Konzentrationen inaktiviert (Uehara *et al.*, 1988; Fukazawa *et al.*, 1994).

Herbimycin A hat sehr wahrscheinlich keinen direkten Einfluss auf die Kinase-Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie z.B. PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) und EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Fukazawa *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1995; Murakami *et al.*, 1998, Haas *et al.*, 2002). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor die PDGF-induzierte Zellproliferation in SMC-Zellen (*smooth muscle cells*) reduziert (Fujio *et al.*, 1993;

Murakami *et al.*, 1998). Dabei wird jedoch vermutet, dass c-Src in den Inhibierungsprozess involviert ist. Die blockierende Wirkung von Herbimycin A auf EGFR und *erbB* (eine RTK vom HER-Typ) betrifft wahrscheinlich ausschließlich die Stabilität der Tyrosinkinase (Fukazawa *et al.*, 1994; Murakami *et al.*, 1998). Um durch Degradation bei RTKs einen vergleichbaren Effekt in der Zellkultur zu erzielen, wie durch die Inaktivierung der Kinase-Aktivität bei Src-TKs, wird mindestens die zehnfache Dosis von Herbimycin A benötigt (vgl. Uehara, 1988).

Bei Betrachtung dieser Daten erscheint es durchaus angebracht, Herbimycin A als Src-TK-selektiven Inhibitor zu bezeichnen. Jedoch ist es wichtig zu bedenken, dass bei Konzentrationen, die im Bereich des IC_{50} von Src-TKs liegen, wahrscheinlich zumindest auch Abl-TKs inhibiert werden.

4.7.3. Die Veränderung der mitotischen Aktivität bei maturaen Weibchen durch Herbimycin A

Virgine und entpaarte Weibchen verfügen im Vergleich zu maturaen, gepaarten Weibchen über eine deutlich verringerte mitotische Aktivität (Den Hollander & Erasmus, 1984; Den Hollander & Erasmus, 1985). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine sieben Tage andauernde Entpaarung bei Weibchen zu einer Reduzierung der DNA-Syntheserate um 75% führt. Die mitotische Aktivität der Männchen bleibt hingegen unverändert. Werden die Weibchen für weitere sieben Tage isoliert gehalten, bleibt die DNA-Syntheserate konstant. Werden entpaarte Weibchen re-gepaart, erreichen sie nach kurzer Zeit wieder die DNA-Syntheseraten gepaarter Weibchen. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass das Männchen beim Weibchen ca. 75% der Mitosen induziert. Die Männchen-induzierte DNA-Synthese wird in Zusammenhang mit der Gonaden- und dabei vor allem mit der Vitellarentwicklung der Weibchen gebracht (Kunz, 2001; vgl. Kap. 1). Nach der Hypothese aus Kapitel 1 (Abb. 1-5), äußert sie sich in der starken mitotischen Aktivität der S1-Zellen. Elektronenmikroskopische Beobachtungen zeigten, dass bei entpaarten Weibchen das Vitellarium innerhalb von wenigen Tagen degeneriert (Popiel *et al.*, 1984; vgl. Kap. 1). Demzufolge erscheint eine Langzeitstimulation der DNA-Synthese bei den Weibchen durch das Männchen zumindest im Zusammenhang mit der Vitellarentwicklung unwahrscheinlich. Damit scheinen die verbleibenden 25% der mitotischen Aktivität bei für 14 Tage entpaarten Weibchen unabhängig vom Männchen zu sein. Die starke mitotische Aktivität des differenzierten Vitellariums erklärt nicht nur die Differenz in der DNA-Syntheserate zwischen virginen und maturaen Weibchen, sondern auch die Beobachtung, dass matura Weibchen ca. dreimal mehr DNA replizieren als adulte Männchen.

Herbimycin A bewirkt bei gepaarten, maturaen Schistosomen-Weibchen eine deutliche, dosisabhängige Reduzierung der mitotischen Aktivität um bis zu 75% innerhalb von zwei Tagen. Auf die Zellproliferation in adulten Männchen hat der Inhibitor hingegen keinen Einfluss. Damit imitiert die Chemikalie die Trennung der Weibchen vom Männchen in Bezug auf die mitotische Aktivität. Weiterhin beweist diese Versuchsreihe die Existenz eines weibchenspezifischen Signalweges, der die Zellproliferation im Vitellarium steuert. Dieser von Herbimycin A blockierte Signalweg ist aufgrund der Differenz zwischen den DNA-Syntheseraten virginen und maturaer Weibchen auch als entwicklungspräferentiell zu bezeichnen.

Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass die Signaltransduktionsprozesse einer Zelle in einem komplexen Netzwerk miteinander verbunden sind und daher ein Prozess meistens durch mehrere Signalwege beeinflusst wird⁸. Daher sind zwei grundlegende Modelle für die Steuerung der mitotischen Aktivität im Vitellarium denkbar. Entweder basiert die Regulation der Mitosen auf mehreren gleichwertigen Signalwegen oder auf einer zentralen Signaltransduktionskaskade, wobei weitere Signalwege dann nur eine untergeordnete Rolle spielen. Da der Einsatz von Herbimycin A die DNA-Synthese bei murenen Weibchen in gleichem Maße wie eine Entpaarung reduziert, ist die Regulation der mitotischen Aktivität im Vitellarium durch einen zentralen Signalweg wahrscheinlich. Bei einer Steuerung durch mehrere gleichwertige Signalwege müsste für diesen Effekt jeder mindestens ein Molekül enthalten, das vom Inhibitor blockiert wird. Und das ist aufgrund der Selektivität von Herbimycin A unter den Versuchsbedingungen eher unwahrscheinlich.

4.7.4. Die Veränderung der p14-Expression und der Eiablage bei murenen Weibchen durch Herbimycin A

Nach der in Kapitel 1 vorgestellten Hypothese (Abb. 1-5) sind sowohl die Expression des Eischalengens p14 als auch die Eiproduktion Folgeprozesse der Männchen-induzierten Zellproliferation im Vitellarium. In den differenzierten Vitellozyten findet die Synthese der Eischalenproteine und vermutlich auch die Erzeugung von Dotterkomponenten statt. Ca. 40 S4-Zellen werden mit einer Oozyte zu einem Ei zusammengesetzt (vgl. Kap. 1). Bei entpaarten Weibchen sind die S1-Zellen kaum noch bzw. nicht mehr mitotisch aktiv, und die differenzierten Stadien sind nicht mehr vorhanden oder weisen Abnormitäten auf (Popiel *et al.*, 1984). Virgine und entpaarte Weibchen produzieren im Endwirt keine Eier bzw. stellen die Eiproduktion ein (Kunz, 2001). Daher überrascht es nicht, dass die Quantifizierung der abgelegten Eier in der Wurmkultur ebenfalls Unterschiede zwischen gepaarten und entpaarten Weibchen aufzeigt. Die Eiproduktionsrate von Weibchen, die für drei Tage entpaart worden sind, reduziert sich auf 20% im Vergleich zu gepaarten Weibchen. Die Behandlung von gepaarten Weibchen mit Herbimycin A führt innerhalb von 48 Stunden zu einer Reduzierung der Eiablage auf einen ähnlich niedrigen Wert. Damit imitiert der Inhibitor die Entpaarung der Weibchen nicht nur bzgl. der Zellproliferation im Vitellarium sondern auch in Hinsicht auf die Eiablage. Da Herbimycin-A-behandelte Weibchen z.T. auch Eier mit abnormaler Morphologie produzieren, ist dieser Effekt eventuell nicht nur auf die reduzierte mitotische Aktivität der S1-Zellen (vgl. Kap. 1 u. 4.7.3) sondern vielleicht auch auf weitere Auswirkungen des Inhibitors zurückzuführen.

Durch quantitative Northern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Entpaarung in Korrelation mit der verminderten DNA-Synthese und der reduzierten Eiproduktion eine deutliche Abnahme der p14-Genexpression bewirkt (Grevelding *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu resultierte die Behandlung gepaarter Weibchen mit Herbimycin A überraschenderweise in einer deutlich gesteigerten p14-Transkription und p14-Proteinsynthese. Damit imitiert der Inhibitor in diesem Fall nicht die Entpaarung, sondern wirkt sich Gegenteilig aus.

⁸ Ein gutes Beispiel ist die Regulierung der Zellproliferation von humanen Epidermiszellen durch zwei zentrale Signalwege: Durch einen EGF-gesteuerten Signalweg und durch eine über die Fokalkontakte regulierte Kaskade (über FAK), die dafür sorgt, dass auch in Anwesenheit des Wachstumsfaktors sich ausschließlich im Zellverband integrierte Zellen teilen (Gomperts *et al.*, 2002).

Nach einer Hypothese stimuliert ein männliches Signal direkt oder indirekt die mitotische Aktivität von S1-Zellen und löst als sekundäre Antwort ein terminales Differenzierungsprogramm aus. Hat die Differenzierung einer S1-Zelle einmal begonnen, ist der weitere Verlauf bis zur S4-Zelle und deren Einbau in das Ei unabhängig vom Männchen und wird durch Signale des Weibchens reguliert (Kunz *et al.*, 1995). Aufgrund der bisherigen experimentellen Daten (vgl. auch Kap. 1) ist es jedoch auch möglich, dass ein oder mehrere Signale vom Männchen neben der Zellproliferation auch einige oder sämtliche Differenzierungsereignisse im Vitellarium (z.B. die p14-Expression) und die Eiproduktion induzieren. Dieser Gedanke wird in den beiden folgenden Kapiteln bekräftigt.

4.7.5. Die zeitliche Koordination der Stimulierung von Zellproliferation und p14-Expression im Vitellarium.

Eine 24-stündige Entpaarung führt bei Weibchen nur zu einer geringen Reduzierung der DNA-Syntheserate (auf ca. 90%). Nach einer Zeitspanne von zwei Tagen liegt sie bei ca. 50%, nach drei Tagen bei ca. 30% und ab dem sechsten Tag fast konstant bei ca. 25%. Bei Weibchen, die für zwei Tage entpaart worden sind, fehlen in den Vitellarloben S2- und S3-Zellen fast vollständig (Popiel *et al.*, 1984). Das ist wahrscheinlich auf die reduzierte mitotische Aktivität der S1-Zellen zurückzuführen, wodurch kaum noch Zellen für die Differenzierung bereitgestellt werden. Insofern korrelieren die ermittelten DNA-Syntheseraten mit den histologischen Beobachtungen. Zur Reduzierung der p14-Expression nach der Entpaarung gibt es zwei Datenreihen. Grevelding *et al.* (1997) zeigten, dass nach Tag 3 der Entpaarung noch knapp 15% der Menge an Transkripten gebildet werden, wie nach Tag 1. Nach Tag 6 konnten keine Transkripte mehr detektiert werden. Versuche im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass die p14-Transkription nach drei Tagen Entpaarung auf 30% im Vergleich zu der von gepaarten Weibchen reduziert wird.

Die Betrachtung und der Vergleich der entpaarungsbedingten Reduzierung von DNA-Synthese und p14-Transkription in Abhängigkeit von der Zeit führt zu zwei wichtigen Erkenntnissen:

1. Der zeitliche Verlauf der Abnahme ist bei beiden Prozessen in etwa gleich.
2. Die Reduzierung auf einen Männchen-unabhängiges Level benötigt bei beiden Prozessen eine relativ lange Zeit (ca. sechs Tage). Das bedeutet, dass trotz Abwesenheit des vom Männchen abgegebenen Stimulus erst eine längere Zeitspanne vergehen muss, bis dessen Wirkung vollständig aufgehoben ist.

Untersuchungen zur Bestimmung des Zeitraums, der benötigt wird, damit ungepaarte Weibchen nach erstmaliger oder erneuter Paarung die DNA-Synthese- und die p14-Expressionsraten maturer, gepaarter Weibchen erlangen, sind bisher nicht beschrieben. Es ist lediglich gezeigt, dass die DNA-Syntheserate noch während des zweiten Tages der Paarung eines virginalen Weibchens mit einem Männchen ansteigt (Den Hollander & Erasmus, 1985). Das weist darauf hin, dass ein bestimmter Zeitraum vergeht, bis sich die Anwesenheit des männlichen Stimulus in vollem Maße auswirkt. Diese zeitliche Verzögerung bei der Reaktion der Vitellarzellen auf das Signal stehen im Widerspruch zu den Sekunden- oder Minuten-schnellen Reaktionen einer Zelle auf Hormone oder Wachstumsfaktoren, wie sie üblicherweise beschrieben sind. Es stellt sich die Frage, ob das vom Männchen abgegebene Signal auf direktem Weg (durch den direkten Kontakt mit

einem Rezeptor an der Oberfläche der Vitellinzellen) oder indirekt die DNA-Synthese stimuliert. Beim direkten Weg ist zu bedenken, dass der vom Männchen abgegebene Faktor zunächst vom Tegument aus mehrere Gewebe und Epithelien passieren müsste, um, wie in Abb. 1-5/Kap. 1 dargestellt, die Vitellinzellen zu erreichen. Schistosomen besitzen kein Gefäßsystem, die Räume zwischen den Organen sind statt dessen mit Parenchymgewebe ausgefüllt (Mehlhorn & Piekarski (2002). Daher müssten Signalmoleküle trotz des syncytialen Aufbaus von Tegument, Subtegument und Parenchym mehrere Zellmembranen durchdringen.

Ein hydrophober Faktor könnte wahrscheinlich relativ problemlos durch Zellen bzw. Zellmembranen diffundieren und auf diesem Weg das Vitellarium erreichen. Diese Annahme lässt sich gut mit Daten vereinbaren, die zeigten, dass die Wirkung des Faktors lokal begrenzt ist (Popiel & Basch, 1984; Basch, 1988). Sie korreliert aber weniger gut, mit der zeitlich verzögerten Resonanz des Weibchens auf das Signal. Außerdem gehören hydrophobe Signalmoleküle meistens zu den Phospholipiden oder zu den Steroidhormonen, und gerade die Existenz letzterer Molekülklasse wird bei Trematoden angezweifelt (de Mendoca *et al.*, 2000).

Bei der Vermutung eines hydrophilen Faktors stellt sich zunächst die Frage, wie ein solches Molekül die genannten Gewebe passieren könnte. Möglicherweise werden die Signalmoleküle von Rezeptoren im Tegument aufgenommen und durch einen der Transcytose⁹ ähnelnden Mechanismus in den interzellulären Raum und/oder in das Lakunensystem abgegeben. Von dort aus würden sie dann die Vitellinzellen erreichen. Diese Möglichkeit wäre mit der lokal begrenzten Wirkung des Faktors und eventuell auch mit der zeitlich verzögerten Resonanz in Einklang zu bringen.

Die dritte Möglichkeit ist die indirekte Wirkung des Faktors auf die mitotische Aktivität im Vitellarium. Hierbei könnte das Signal je nach chemischem Charakter das (Sub-) Tegument oder ein anderes Gewebe/Organ zur Synthese weiterer Signalmoleküle und zu deren Exkretion in den interzellulären Raum und/oder in das Lakunensystem anregen. Diese "sekundären" Signale könnten dann direkt oder wiederum indirekt die Ereignisse am Vitellarium steuern. Dieses Modell korreliert mit der zeitlich verzögerten Antwort auf den vom Männchen abgegebenen Faktor. Es würde auch erklären, warum die Auswirkungen von Herbimycin A auf die DNA-Synthese und die p14-Expression zeitlich schneller erfolgen, als die Auswirkungen der Entpaarung auf diese Prozesse. Das wäre dann darauf zurückzuführen, dass Herbimycin A Signalwege blockiert, die weiter unten in der Hierarchie liegen, als der Weg, den der vom Männchen abgegebene Faktor direkt aktiviert. Ob dieser indirekte Weg allerdings auch mit der lokal begrenzten Wirkung des initialen Stimulus vereinbar ist, lässt sich kaum beantworten. Das scheint jedoch um so unwahrscheinlicher, je mehr Stationen zwischen dem initialen Signal und dem direkt an den Vitellinzellen wirkenden Signal liegen.

4.7.6. Der Regulation der p14-Genexpression

Obwohl sich einige Untersuchungen in den letzten Jahren mit der Regulation der p14-Expression befasst haben, ist darüber kaum etwas bekannt. Die Vermutung der Transkriptionsregulation durch bisher klonierte Steroid- bzw. RXR-Rezeptoren (Freebern *et al.*, 1999a; Freebern

⁹ Die Transcytose bezeichnet den rezeptorvermittelten Transport von Makromolekülen aus dem extrazellulären Raum durch die Zelle hindurch.

et al., 1999b), wird angezweifelt (de Mendoca *et al.*, 2000). Nach ihrer Aktivierung durch Liganden bilden Steroidrezeptoren in der Regel Homo- oder Heterodimere. In diesem Zustand binden sie an geeignete DNA-Sequenzen (*hormone response elements*, HRE) innerhalb der genregulatorischen Bereiche (Gomperts *et al.*, 2002). Für die *upstream*-Region des p14-Gens ist ein Sequenzmotiv mit Ähnlichkeit zu einem USP-*response-element*¹⁰ beschrieben; dieses liegt jedoch in falscher Orientierung vor (Freebern *et al.*, 1999a). Die ligandenbindenden Domänen der beiden *Schistosoma*-RXR-Rezeptoren weisen im Gegensatz zum Rest des jeweiligen Moleküls nur wenig Ähnlichkeit zu den entsprechenden Bereichen der RXR-Rezeptoren anderer Organismen auf. Daraus folgt, dass diese Domänen möglicherweise keine hormonbindende Funktion haben (de Mendoca *et al.*, 2000). Weiterhin werden beide Rezeptoren in nahezu allen Geweben transkribiert (Fantappie *et al.*, 2001), was den üblicherweise entwicklungs- und gewebespezifischen Funktionen dieser Molekülklasse bei anderen Organismen widerspricht (Gomperts *et al.*, 2002). Und letztendlich wird, wie zuvor schon öfter angedeutet, die Existenz von Steroidhormonen bei Plathelminthen aufgrund der Stammesgeschichte angezweifelt (de Mendoca *et al.*, 2000). Daher unterscheiden sich möglicherweise die RXR-homologen Moleküle bei *Schistosoma* von denen der Vertebraten und Arthropoden in ihrer Funktion voneinander.

Der einfachste Weg zur Aktivierung einer gewebespezifischen Transkription ist die Stimulation eines Signalweges, der die Bereitstellung eines aktivierenden Transkriptionsfaktors bewirkt (Alberts *et al.*, 1995). Diese Möglichkeit ist für p14 durch die Inhibitorstudien auszuschließen, da die im Folgenden zusammengefassten Daten mit diesem Modell nicht vereinbart werden können:

1. Virgine und entpaarte Weibchen transkribieren kein bzw. kaum p14.
2. Gepaarte Weibchen bilden p14-Transkripte.
3. Gepaarte Weibchen, die mit Herbimycin A behandelt werden, transkribieren mehr p14 als unbehandelte gepaarte Weibchen.

Diese drei Punkte deuten verstärkt auf einen Repressionsmechanismus hin, der durch den Inhibitor aufgehoben wird. Die Resultate einer vierten Versuchsreihe, bei der entpaarte Weibchen durch die Behandlung mit Herbimycin A ähnliche Mengen an p14-Transkripten bilden wie gepaarte Weibchen, bekräftigen diese Vermutung. Damit kann folgendes Modell postuliert werden (Abb. 4-7):

1. In virginen Weibchen bindet ein Repressor, der unabhängig vom Paarungskontakt synthetisiert wird, in der regulatorischen Sequenz des p14-Gens und blockiert damit die Transkription.
2. Beim Paarungskontakt induziert das vom Männchen abgegebene Signal direkt oder indirekt die Produktion eines Kompetitor-Moleküls. Dieser Kompetitor bindet an den Repressor und bewirkt dadurch, dass dieser nicht mehr an den regulatorische Sequenz des p14-Gens binden kann. Folglich wird p14 exprimiert. Die Zusammensetzung der Eier ist ein komplizierter Prozess, bei dem die Expression einzelner Komponenten bzgl. der Zeit und der Menge bis ins Detail aufeinander abgestimmt sind. Folglich ist eine kontrollierte p14-Expression notwendig. Diese könnte dadurch gewährleistet werden, dass der Repressor im Überschuss zum Kompetitor in der Zelle vorliegt.
3. Der Inhibitor Herbimycin A bewirkt in gepaarten und virginen Weibchen durch die Blockierung eines Signalweges, dass die Produktion des Repressors reduziert wird. Daraufhin wird

¹⁰ Bei dem Protein USP handelt es sich um einen RXR-Rezeptor bei *Drosophila*.

die p14-Transkription (weiter) verstärkt. Eine Folge davon ist, dass die Synthesen der einzelnen Komponenten für die Eiformation jetzt nicht mehr aufeinander abgestimmt sind, so dass Defekte in den Eiern zu erwarten sind. Und tatsächlich produzieren Herbimycin A-behandelte Weibchen z.T. abnormale Eier (Kap. 3.6.3.4).

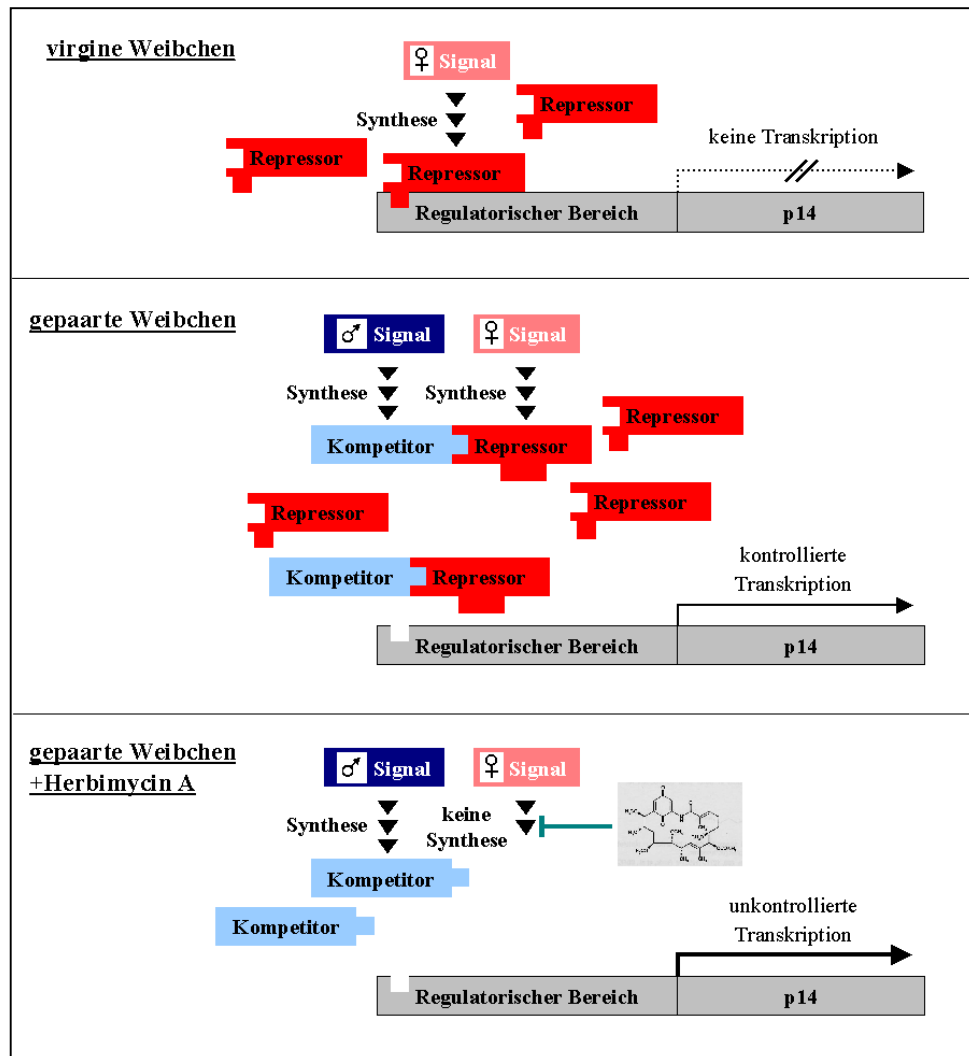


Abb. 4-7. Modell zur Transkriptionsregulation des p14-Gens. In virginen Weibchen bindet ein vom Männchen unabhängig gebildeter Repressor im regulatorischen Bereich des p14-Gens und blockiert damit die Transkription (oben). Bei gepaarten Weibchen wird durch das vom Männchen abgegebene Signal die Produktion eines Kompetitor-Moleküls induziert. Dieser Kompetitor bindet an den Repressor und bewirkt dadurch, dass dieser nicht mehr an die regulatorische Sequenz binden kann und p14 transkribiert wird. Da der Repressor jedoch im Überschuss vorliegt, handelt es sich um eine kontrollierte Transkription (mitte). Der Inhibitor Herbimycin A bewirkt nun in gepaarten und virginen Weibchen durch die Blockierung eines Signalweges, dass die Produktion des Repressors reduziert wird. Daraufhin wird die p14-Transkription (weiter) verstärkt und kann als unkontrolliert bezeichnet werden (unten).

Die Versuche zeigen weiterhin, dass entpaarte, behandelte Weibchen nicht das gleiche Expressionsniveau wie gepaarte, behandelte Weibchen erreichen, und dass eine Erhöhung der Inhibitor-konzentration keine deutliche Steigerung der p14-Expression bewirkt. Diese Daten können durch das simplifizierte Modell nicht ausreichend erklärt werden. Daher ist es durchaus wahrscheinlich, dass weitere Transkriptionsfaktoren, deren Bereitstellung durch alternative Signalwege re-

guliert wird, für die p14-Expression von Bedeutung sind. In diesem Fall würde Herbimycin A nur einen der beteiligten Signalwege beeinflussen.

Popiel *et al.* vermuteten, dass die Männchen-abhängige Reifung des Weibchens möglicherweise ein evolutionäres Relikt ist (1984). Bei plathelminthischen Hermaphroditen ist der Kontakt mit einem Wurm derselben Spezies keine Bedingung zur Erlangung des maturen Status. Trotzdem entwickeln sich männliche und weibliche Fortpflanzungsorgane nicht notwendigerweise zur gleichen Zeit. Im Gegenteil, um Selbstbefruchtung zu vermeiden, ist Protandrie¹¹ bei den *Digenea* die Regel. Daher ist es wahrscheinlich, dass Signalwege, die zur Entwicklung der weiblichen Fortpflanzungsorgane führen, sich zeitweise in einem reprimierten Zustand befinden. Die Vermutung liegt nahe, dass sich Schistosomen aus proterandrischen Vorfahren entwickelt haben, bei denen die Reifung der weiblichen Reproduktionsorgane von der vollständigen Entwicklung des männlichen Systems abhängig war. Demnach würde der vom Männchen abgegebene Stimulus die Signalwege, die zur Gonadenentwicklung beim Weibchen führen, deprimieren. Die zuvor vorgestellte Hypothese der reprimierten p14-Expression in virginen Schistosomen-Weibchen und deren De-Reprimierung durch das Männchen korreliert mit dieser Vermutung. Trifft diese Vermutung zu, so würde die Situation bei *Schistosomatium douthitti*, wo die Weibchen die sexuelle Reifung auch in Abwesenheit des Männchens erreichen können (Short, 1951), eine evolutionär weiter fortgeschrittene als die bei *Schistosoma mansoni* darstellen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten bekräftigen im Zusammenhang mit der Hypothese über die stammesgeschichtliche Herkunft der Männchen-Weibchen-Interaktion die Vermutung, dass das vom Männchen abgegebene Signal eher chemischer Natur als ein taktile Reiz ist. Es ist ausgeschlossen, dass die Induktion der Entwicklung der weiblichen Fortpflanzungsorgane bei den hermaphroditischen Vorfahren von *Schistosoma* auf einen Berührungszurückzuführen ist, da ein zweiter Wurm derselben Spezies dazu wahrscheinlich nicht benötigt wurde (s.o.). Daraus folgt mit hoher Wahrscheinlichkeit, dass die Reprimierung der weiblichen Fortpflanzungsorgane bei diesen Organismen durch Wachstumsfaktoren oder Hormone aufgehoben worden ist. Wenn die Männchen-Weibchen-Interaktion bei Schistosomen tatsächlich ein evolutionäres Relikt sein sollte, dann ist es unwahrscheinlich, dass sich im Laufe der Stammesgeschichte eine neue Art der Stimulation in Form eines taktilen Reizes entwickelt hat.

4.7.7. Die Spezifität der Wirkung von Herbimycin A auf die DNA-Synthese, die p14-Expression und die Eiproduktion

Die Paarungsversuche haben gezeigt, dass Herbimycin A bei den eingesetzten Konzentrationen die Würmer innerhalb von 48 Stunden nicht in lebenswichtigen Funktionen beeinträchtigt. Zudem zeigen andere Inhibitoren wie Butein und Piceatannol innerhalb des gleichen Zeitraums in vergleichbaren Konzentrationen eine andere bzw. keine Wirkung auf die DNA-Synthese und die p14-Expression. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Auswirkungen von Herbimycin A auf die DNA-Synthese, die p14-Expression und die Eiproduktion nicht auf toxische Wirkungen zurückzuführen sondern spezifisch und von direkter Art sind. Bei einer indirekten Wirkung würden Signalwege blockiert werden, die den die Zielprozesse direkt steuernden

¹¹ Vormännlichkeit

Kaskaden vorgeschaltet sind. Da Signalwege jedoch üblicherweise in ein komplexes Netzwerk integriert sind, steigt bei einer indirekten Wirkung die Wahrscheinlichkeit dafür, dass auch andere Prozesse als die angeführten Zielprozesse beeinflusst werden.

Eine weitere Kontrolle, bei der die Tyrosinphosphorylierungsmuster von Herbimycin A-behandelten und unbehandelten Weibchen miteinander verglichen worden sind, zeigt, dass das wahrscheinlich nicht oder nur in äußerst begrenztem Maße der Fall ist. Bei diesem Vergleich konnte nur für eines von neun detektierten Proteinen eine vom Inhibitor abhängige Expression und/oder Phosphorylierung festgestellt werden. Da sich die Signalstärken dieser neun Proteine von allen anderen tyrosinphosphorylierten Proteinen abheben, handelt es sich hierbei um abundant exprimierte Proteine. Daher ist es relativ wahrscheinlich, dass die meisten der erhaltenen Signale Strukturproteine repräsentieren, weil Signaltransduktionsmoleküle meistens wenig-abundant exprimiert werden (Gomperts *et al.*, 2002). Doch auch zur Phosphorylierung von Strukturproteinen sind Signalwege nötig. Die unveränderte Intensität von Signalen, die auf dem Autoradiogramm bei behandelten und unbehandelten Weibchen das gleiche Protein repräsentieren, bedeutet nicht nur, dass dieses Protein unabhängig vom Inhibitor exprimiert und an Tyrosinen phosphoryliert wird. Das zeigt vielmehr auch, dass Herbimycin A die Expression und die posttranslationale Modifikation der Moleküle, die der Phosphorylierung des detektierten Strukturproteins bzw. Signalmoleküls vorgeschaltet sind, ebenfalls nicht beeinflusst. Dem entsprechend weist die Herbimycin A-unabhängige Expression und Phosphorylierung von acht Proteinen deutlich daraufhin, dass der Inhibitor auf die angeführten Zielprozesse durch die spezifische Blockierung der direkt regulierenden Signalwege wirkt.

Die Tatsache, dass ein abundantes Protein unter den gegebenen Bedingungen Herbimycin A-abhängig exprimiert und/oder phosphoryliert wird, korreliert mit der Wirkung des Inhibitors auf abundante Vorgänge wie DNA-Synthese und p14-Expression. Möglicherweise besteht die Erwartung, dass mehr Unterschiede im Tyrosinphosphorylierungsmuster zu finden sein müssten. Mit Sicherheit gibt es mehr als ein tyrosinphosphoryliertes Molekül innerhalb dieser Signalwege, welche die Zielprozesse steuern. Jedoch sei darauf hingewiesen, dass der verwendete anti-Phosphotyrosinantikörper nicht mit jedem phosphorylierten Tyrosin reagiert. Das ist darauf zurückzuführen, dass für die Immunreaktion auch die sehr variablen Nachbarsequenzen der phosphorylierten Tyrosine benötigt werden und der Antikörper nur einen Teil dieser Sequenzen erkennt.

4.7.8. Herbimycin A und SmTK3

Wie zuvor ausführlich diskutiert, kann Herbimycin A bei geeigneter Dosierung als selektiver Inhibitor für Src-TKs eingesetzt werden. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass auch TKs der Abl-Familie bei diesen Konzentrationen blockiert werden. Die geeigneten Konzentrationen liegen im Bereich des für Src-TKs relevanten IC_{50} bis zum doppelten davon. Bei höherer Dosierung steigt die Wahrscheinlichkeit für eine Blockierung weiterer Tyrosinkinasen (vgl. Uehara *et al.*, 1988). Die beschriebenen Effekte auf die DNA-Synthese, auf die p14-Expression und auf die Eiproduktion sind u.a. auch mit Dosierungen innerhalb dieses Bereiches erzielt worden. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Src- oder Abl-TKs Bestandteil von zentralen Signalwegen sind, die diese Prozesse steuern. Da SmTK3 und SmTK5 in den Vitellari-

en exprimiert werden, kommen beide Proteine für eine Beteiligung an der Regulation dieser Prozesse in Frage.

Der Wirkungsmechanismus von Herbimycin A ist eingehend untersucht worden (Fukazawa *et al.*, 1994). Der Inhibitor reagiert mit der TK-Domäne von Src-Tyrosinkinasen und verhindert damit, dass das Enzym ATP binden kann. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass Herbimycin A an eines von zwei bei allen zellulären und einigen Rezeptor-Tyrosinkinasen konservierten Cysteinen (Hanks & Quinn, 1991) innerhalb der TK-Domäne bindet (Cys⁴⁸⁷ und Cys⁴⁹⁸ bei c-Src). Allerdings scheinen für die Interaktion mit dem Inhibitor auch die benachbarten Aminosäuren eine Rolle zu spielen, worauf sich die dosisabhängige Selektivität von Herbimycin A zurückführen lässt. Die beiden Cysteine sind wahrscheinlich für die Stabilität und für die katalytische Aktivität der Tyrosinkinasen von großer Bedeutung. Die Substitution jeweils eines der beiden Cysteine durch eine andere Aminosäure führt bei der Src-TK p56^{lck} zum Verlust der enzymatischen Aktivität und zu einer deutlich reduzierten Halbwertszeit (Veillette *et al.*, 1993). Das korreliert mit der Beobachtung, dass Herbimycin A in der Zellkultur bei einigen Zelltypen bestimmte Tyrosinkinasen degradiert (Uehara *et al.*, 1988). Trotzdem wird nicht die Degradation der Tyrosinkinasen sondern die Verhinderung der ATP-Bindung als Hauptursache für ihre Inaktivierung angenommen. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass nicht jede Tyrosinkinase die durch Herbimycin A inaktiviert wird, auch degradiert wird (Fukazawa *et al.*, 1994). Jedoch ist die Degradation einer Tyrosinkinase in Anwesenheit des Inhibitors ein deutlicher Hinweis darauf, dass Herbimycin A an dieses Molekül bindet und auch seine enzymatische Aktivität blockiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SmTK3 in Anwesenheit von Herbimycin A (Dosis: 25 µg/ml) bei 30°C *in vitro* degradiert wird. Nach 90 minütiger Inkubation von *Schistosoma*-Gesamtprotein mit dem Inhibitor konnte nur noch knapp die Hälfte an SmTK3-Protein im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Andere abundant exprimierte Proteine werden nicht degradiert, was erneut auf die Spezifität des Inhibitors hinweist. Bei 20°C tritt keine nachweisbare Degradation von SmTK3 in Anwesenheit von Herbimycin A auf. Die temperaturabhängige Wirkung von Herbimycin A auf Src-TKs *in vitro* ist bereits bekannt (Uehara & Fukazawa, 1991; Fukazawa *et al.*, 1994). *In vivo* konnte die Degradation von SmTK3 bei einer Konzentration von 5 µg/ml nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Degradation von Proteinen *in vivo* ein Prozess ist, der durch zelluläre Systeme spezifisch gesteuert wird (Lodish, 2001). *In vitro* hingegen wirken die Proteasen weitestgehend unspezifisch. Folglich sind die beiden Versuche nicht direkt miteinander vergleichbar, da *in vitro* wahrscheinlich deutlich mehr Proteasen Herbimycin A-gebundenes SmTK3-Protein als Substrat erkennen als *in vivo*. Hinzu kommt, dass die für das *in vivo*-Experiment eingesetzte Herbimycin A-Dosis deutlich geringer als die des *in vitro*-Versuches war. Damit war sie vielleicht zu gering, um *in vivo* einen ähnlichen Effekt wie *in vitro* zu erzielen. Deutlich höhere Konzentrationen wirken jedoch toxisch auf die Würmer (Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, dass die Degradation weder bei allen Tyrosinkinasen auftritt, die durch Herbimycin A blockiert werden, noch die hauptsächliche Ursache der Inaktivierung der Enzyme ist. Allerdings gilt andersherum, dass die zellulären TKs, die durch die Reaktion mit dem Inhibitor degradiert werden, auch in ihrer Kinase-Aktivität beeinträchtigt werden (Fukazawa *et al.*, 1994). Durch den *in vitro*-Versuch wird zunächst nur gezeigt, dass Herbimycin A in der eingesetzten Dosis an SmTK3 bindet. Das allerdings ist ein

deutlicher Hinweis darauf, dass der Inhibitor auch bei weitaus niedrigeren Dosierungen mit SmTK3 reagiert und die enzymatische Aktivität des Enzyms blockiert.

Mit dieser Vermutung korreliert der Vergleich der Tyrosinphosphorylierungsmuster von Herbimycin A-behandelten und unbehandelten Weibchen. Bei diesem Versuch wurde nur ein Protein detektiert, das in der Expression und/oder in der Phosphorylierung durch Herbimycin A beeinflusst wird. Dieses Protein wird in der Höhe von 70 kD aufgetrennt, dem nachgewiesenen Molekulargewicht von SmTK3. Das entsprechende Signal ist bei behandelten Weibchen deutlich schwächer als bei unbehandelten. Da bei maturen Weibchen die DNA-Synthese im Vitellarium ein abundanter Prozess ist, kann postuliert werden, dass auch die involvierten Signalmoleküle abundant exprimiert und phosphoryliert werden. Auf eine abundante Transkription von SmTK3 weist die überdurchschnittlich große Anzahl Klonen hin, die durch Genbank-Screenings mit Tyrosinkinasefragmenten erhalten worden sind (Kapp, 2000). Wenn SmTK3 wirklich abundant exprimiert und wird, dann ist es im Zusammenhang mit den zuvor diskutierten Resultaten relativ wahrscheinlich, dass das Signal bei 70 kD tatsächlich diese Tyrosinkinase repräsentiert. Wie bereits angemerkt, bewirkt Herbimycin A *in vivo* keine Degradierung von SmTK3, so dass die Signalunterschiede nicht auf unterschiedliche Mengen des Proteins zurückzuführen wären. Folglich wäre die Differenz wahrscheinlich in einer unterschiedlich starken Autophosphorylierungsaktivität von SmTK3 in An- und Abwesenheit des Inhibitors begründet. Hierbei ist anzumerken, dass das Laufverhalten von SmTK3 im PAA-Gel möglicherweise unabhängig von der Phosphorylierung ist (s. Kap. 3.1.5). Es ist allerdings auch denkbar, dass eine weitere Tyrosinkinase, die SmTK3 phosphoryliert, in ihrer Funktion durch den Inhibitor beeinträchtigt wird. Aber auch das würde die Blockierung von SmTK3 durch Herbimycin A - wenn auch indirekt - bedeuten. An dieser Stelle sei noch darauf hingewiesen, dass die Src-TK SmTK5 ebenfalls ein (theoretisches) Molekulargewicht im Bereich von 70 kD hat (Kapp, 2000) und damit auch bzw. zusätzlich zu SmTK3 durch das Signal repräsentiert werden könnte.

Durch eine phylogenetische Analyse konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenzen der katalytischen Domänen von SmTK3 und SmTK5 große Ähnlichkeiten zu denen von Src-TKs von Vertebraten aufweisen, an die Herbimycin A nachweislich bindet. Die Vertreter aller weiteren TK-Familien - mit Ausnahme der SH1-Domänen von Abl-TKs - liegen im Cladogramm deutlich distanziert. Diese Resultate korrelieren mit der Vermutung von Suga *et al.* (2001), dass bei Tyrosinkinasen die meisten *domain shuffling*-Ereignisse stammesgeschichtlich sehr alt sind und auf einem Zeitpunkt vor der Trennung von Parazoen¹² und Eumetazoen zurückgehen. Zusammen mit den zuvor diskutierten Daten weist das deutlich darauf hin, dass Herbimycin A tatsächlich die Kinase-Aktivität von SmTK3 blockiert. Möglicherweise wird SmTK5 durch das Antibiotikum ebenfalls inhibiert.

4.8. SmTK3, SmDRF und die Vitellarentwicklung

Im vorherigen Kapitel ist der mögliche Zusammenhang zwischen SmTK3 und den Auswirkungen von Herbimycin A auf die DNA-Synthese, die p14-Expression und die Eiproduktion ausführlich diskutiert worden. Hinzu kommt, dass SmTK3 gewebespezifisch u.a. im Vitellarium

¹² Parazoen sind multizelluläre Organismen, die über eine lockere Organisation von Zellen verfügen und keine distinkten Gewebe oder Organe bilden.

exprimiert wird. Daher kann eine Funktion von SmTK3 in der Vitellarentwicklung vermutet werden. In diesem Zusammenhang ist auf die in Hefe nachgewiesene Interaktion von SmTK3 mit den Diaphanous-Homolog SmDRF hinzuweisen. Wie bereits ausführlich diskutiert, sind Diaphanous-Proteine als Zytoskelett-Organisatoren auch in Zellteilungsereignisse involviert. Das legt die Vermutung nahe, dass SmTK3 durch die Interaktion mit SmDRF die Zellteilungen in den Vitellarien reguliert.

Wie bereits angedeutet, legen gepaarte Weibchen bei Behandlung mit Herbimycin A nicht nur deutlich weniger, sondern auch z.T. abnormal geformte Eier. Das ist wahrscheinlich auf die fehlerhafte Anordnung der Eischalenproteine zurückzuführen und u.a. die Konsequenz der verstärkten p14-Expression (s. Kap. 4.7.6.). Bei *Drosophila* legen Weibchen mit mutiertem Diaphanous-Gen ebenfalls Eier mit defekten Eischalen (s. Kap. 4.5.1). Das weist daraufhin, dass SmDRF möglicherweise als Interaktionspartner von SmTK3 auch in die Formation der Eier involviert ist.

4.9. Der Tyrosinkinase-Inhibitor Butein

Butein ist ein spezifischer, allgemeiner Tyrosinkinase-Inhibitor, der präferentiell EGF-Rezeptoren und Src-TKs hemmt (Yang *et al.*, 1998). In Dosierungen, die dem IC₅₀ für den humanen EGRF entsprechen, bewirkt Butein bei gepaarten Weibchen keine deutliche Veränderung in der mitotischen Aktivität. Bei den Männchen hingegen wird die DNA-Syntheserate um ca. 20% reduziert. Bisher ist mit dem Transmembranprotein SER ein EGFR-Homolog bei *Schistosoma* bekannt (Shoemaker *et al.*, 1992). SER wird hauptsächlich in den Muskeln adulter Schistosomen exprimiert (Ramachandran *et al.*, 1996). Der Großteil der DNA-Synthese bei adulten Männchen ist wahrscheinlich auf die Mitosen in des Testes zurückzuführen. In dem Zusammenhang erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die durch Butein reduzierte DNA-Synthese in Männchen auf das Muskelgewebe zurückzuführen ist. Wahrscheinlich inhibiert Butein (zusätzlich) bisher unbekannte EGFR-homologe Moleküle oder andere Tyrosinkinasen, die vielleicht in den Testes eine Rolle spielen. Eine Inhibierung von Src-TKs, die in die Regulation der DNA-Synthese involviert sind, ist bei dieser Konzentration unwahrscheinlich, da sonst in Korrelation mit der Wirkung von Herbimycin A ein deutlicher Effekt bei den Weibchen zu sehen sein müsste.

Die p14-Transkription gepaarter Weibchen wird durch Butein in der EGFR-relevanten IC₅₀-Dosis zusätzlich stimuliert. Aus den Versuchen mit Herbimycin A geht hervor, dass wahrscheinlich deutlich geringere Konzentrationen eines Src-TK-Inhibitors zur zusätzlichen Stimulierung der p14-Expression als zur Reduzierung der DNA-Synthese benötigt werden. Das wird dadurch deutlich, dass die fünffache IC₅₀-Konzentration von Herbimycin A im Vergleich zur einfachen zwar kaum eine weitere Steigerung der p14-Transkription aber eine verstärkte Reduzierung der mitotische Aktivität verursacht. Das bedeutet, dass die EGFR-relevante IC₅₀-Konzentration von Butein, die deutlich unter dem IC₅₀ für pp60^{c-src} liegt, möglicherweise schon für eine Steigerung der p14-Transkription durch die Blockierung einer Src-TK ausreicht. Allerdings ist es ebenso denkbar, dass ein bisher unbekannter EGFR-Rezeptor oder eine andere Tyrosinkinase an der Regulation der p14-Expression beteiligt ist.

Beim Einsatz von höheren Butein-Konzentrationen beginnen sich die Würmer zu entpaaren, so dass über die Blockierung von Männchen-induzierten Signalwegen, die DNA-Synthese und p14-Expression steuern, keine Aussagen mehr gemacht werden können. Die Reduzierung der DNA-Synthese und der p14-Expression bei der doppelten EGFR-relevanten IC₅₀-Konzentration kann also auf die Entpaarung, auf den Inhibitor oder auf beides zurückzuführen sein. Die lokalen morphologischen Veränderungen, die bei Behandlung der Weibchen mit 64 µM Butein beobachtet worden sind, werden an dieser Stelle nicht weiter diskutiert, da sie bisher nicht erklärt werden können.

4.10. Die Syk-Tyrosinkinase SmTK4

4.10.1. Struktur, Regulation und Funktion von Syk-Tyrosinkinasen

Syk-TKs enthalten zwei tandemartig angeordnete SH2-Domänen und eine TK-Domäne im C-terminalen Bereich (Abb. 1-4/Kap. 1), die durch zwei Interdomänen A und B voneinander getrennt werden. Für Syk-TKs aus Vertebraten konnte gezeigt werden, dass die SH2-Domänen selektiv an ITAM-Motive¹³ diverser Immunrezeptoren binden (Turner *et al.*, 2000). Fast über die gesamte Aminosäuresequenz verteilt befinden sich Autophosphorylierungsstellen, die z.B. für die Kinase-Aktivität oder für die Signalweiterleitung von Bedeutung sind. Dabei wird spekuliert, dass die Aktivität von Syk-TKs durch das Gleichgewicht von (Auto-) Phosphorylierung und De-Phosphorylierung reguliert wird (Sada *et al.*, 2001). Es ist möglich, dass eine aktivierte Syk-TK die Bindung zum Rezeptor löst und zur Interaktion mit einem Substrat frei im Zytosol vorliegt (Peters *et al.*, 1996). Die Syk-TKs der Vertebraten haben hauptsächlich innerhalb aber auch außerhalb des haematopoetischen Systems Schlüsselfunktionen in Zellproliferations- und Differenzierungsprozessen (Turner *et al.*, 2000; Yanagi *et al.*, 2001). Ding *et al.* (2000) zeigten, dass Syk-TKs im Zusammenhang mit oxidativem Stress eine Rolle spielen. Über die Funktion in Invertebraten ist bisher wenig bekannt. Das Syk-Homolog von *Hydra* wird in Zellschichten exprimiert, die den Organismus umgeben. Das weist auf eine Funktion in der Erkennung von Zellen hin (Steele *et al.*, 1999).

4.10.2 Die Charakterisierung von SmTK4 auf Nukleinsäureebene daraus abgeleitete putative Funktionen

SmTK4 verfügt über alle funktionalen Domänen, die charakteristisch für Syk-TKs sind. Die einzige Ausnahme bildet eine Linker-Region C-terminal zur 3'-gelegenen SH2-Domäne, die bei allen bisher bekannten Syk-TKs von Invertebraten fehlt. Bei Vertebraten ist diese Region von entscheidender Bedeutung für eine Bindung an ITAM-Motive, so dass eine solche Interaktion bei Invertebraten Syk-TKs inkl. SmTK4 auszuschließen ist (Knobloch *et al.*, 2002). Für Vertebraten sind Interaktionen zwischen Integrin-Rezeptoren und Syk-TKs beschrieben worden. Integrin-Rezeptoren sind die Organisation des Zytoskeletts involviert, für Syk-TKs ist eine entsprechende Funktion in B-Lymphozyten ebenfalls gezeigt worden. Integrin-Rezeptoren sind in

¹³ immunoreceptor tyrosine-based activating motif

Invertebraten bereits nachgewiesen worden. Falls auch entsprechende *Schistosoma*-Homologe existieren, könnten diese Rezeptoren mit SmTK4 interagieren. SmTK4 fehlen weiterhin einige Autophosphorylierungsstellen, so dass dieses Enzym möglicherweise anders reguliert wird, als die Syk-TKs aus Vertebraten (Knobloch *et al.*, 2002).

SmTK4 wird in allen larvalen und adulten Entwicklungsstadien exprimiert, dabei im Männchen wesentlich stärker als im maturen Weibchen. In adulten Schistosomen lassen sich Transkripte gewebespezifisch in den Ovarien, in den Testes, im Subtegument und im Parenchym nachweisen. Die geschlechtspräferentielle Expression ist dadurch zu erklären, dass das Männchen weitaus mehr Parenchym besitzt als das mature Weibchen, bei dem das Vitellarium den Großteil des Körpervolumens einnimmt. Es kann spekuliert werden, dass SmTK4 aufgrund der gewebespezifischen Expression in den verschiedenen Organen/Geweben unterschiedliche Funktionen ausübt. Möglicherweise spielt die Tyrosinkinase in der Spermatogenese und in der Oogenese eine Rolle. Es ist mehrfach beschrieben worden, dass die Organisation des Aktin- und des Tubulin-Zytoskeletts von großer Bedeutung für die Differenzierung der Keimzellen während der Oogenese und der Spermatogenese bei Vertebraten und Invertebraten ist (Theurkauf *et al.*, 1992; Watson *et al.*, 1993; Palecek & Ubbels, 1997; Rodesh *et al.*, 1997; Mansir & Justine, 1998). Die Phosphorylierung von α -Tubulin durch Syk ist bereits nachgewiesen worden (Peters *et al.*, 1996). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass ein Substrat von Syk, das Protein SH3P7, Rezeptor-Signalübertragung und Aktin-Zytoskelett verbindet (Linkerfunktion) (Larbolette *et al.*, 1999). Es wird ebenfalls vermutet, dass bei *Xenopus* die RPB1-Untereinheit der RNA-Polymerase II während Oozytenreifung das Substrat einer MAP-Kinase vom ERK-Typ ist (Bellier *et al.*, 1997). Die Versuche von Jiang *et al.* (2002) legen nahe, dass die ERK-Kinase indirekt von Syk u.a. über die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) reguliert wird. Trifft die Vermutung einer Rolle von SmTK4 bei der Gametogenese zu, stellt sich die Frage nach der Funktion im Parenchym und im Subtegument sowie in den Larvenstadien. Möglicherweise ist SmTK4 in diesen Geweben und Entwicklungsstadien im Zusammenspiel mit Integrin-Rezeptoren und mit Komponenten des Zytoskeletts in Prozesse involviert, die Zellform oder Zellteilung betreffen.

4.10.3. Erweiterte Erkenntnisse über SmTK4 durch den Einsatz von Piceatannol

Die Studien mit dem Syk-selektiven TK-Inhibitor Piceatannol (Geahlen & McLaughlin, 1989; Oliver *et al.*, 1994) brachten kaum weitere Erkenntnisse über eine mögliche Funktion von SmTK4. Die Resultate bekräftigen die Schlussfolgerungen aus den Lokalisationsstudien, dass die Tyrosinkinase keine Rolle in der Vitellarentwicklung spielt. Die Daten zeigen, dass der Inhibitor die DNA-Syntheserate weder in adulten Männchen noch in Weibchen beeinflusst. Es kann spekuliert werden, ob durch den Einsatz von Piceatannol in ausreichender Weise gezeigt worden ist, dass eine Syk-TK bei adulten Schistosomen keine Funktion für die Regulation der Zellproliferation einnimmt. Es ist jedoch möglich, dass wenig-abundante Prozesse, wie z.B. eine mögliche Steuerung der mitotischen Aktivität durch SmTK4 im Parenchym und im Subtegument, mit diesen Versuchsreihen nicht detektiert worden sind, weil sie sich erst zeitlich verzögert auswirken (vgl. folgendes Kapitel).

4.11. Der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren bei *Schistosoma*

Es stellt sich nach Betrachtung und Diskussion der in dieser Arbeit erhaltenen Daten die Frage, unter welchen Bedingungen der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren bei *Schistosoma* sinnvoll ist. Die Toxizität dieser Substanzen wurde deutlich durch die bei zunehmender Inkubationszeit z.T. stark abnehmenden Paarungsquoten demonstriert. Daraus folgt, dass Inhibitoren auf multizelluläre Organismen nicht nur dosis- sondern auch zeitabhängig wirken und dass ihre toxische Wirkung mit der Erhöhung jedes der beiden Parameter ansteigt. Das deutet darauf hin, dass viele Auswirkungen des Inhibitors zunächst einmal nicht detektierbar sind. In die gleiche Richtung geht die Überlegung, dass auch ein Src-selektiver Inhibitor wie Herbimycin A eigentlich mehr als nur DNA-Synthese, p14-Expression und Eiproduktion beeinflussen müsste, da Src-TKs in viele Prozesse involviert sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Inhibitor auch tatsächlich viele Signalwege blockiert, jedoch werden die Auswirkungen erst später deutlich, z.B. dann, wenn die Würmer sich entpaaren. Bei diesen Effekten, die erst nach längerer Behandlungszeit mit dem Inhibitor auftreten, werden wahrscheinlich wenig abundante Signalwege blockiert, deren Ausfall zumindest für eine bestimmte Zeit durch andere Signalwege kompensiert werden. Die Auswirkungen auf abundante Prozesse sind deutlich früher detektierbar. Das ist auch der Grund dafür, dass die Wirkung von Herbimycin A auf die DNA-Synthese, die p14-Expression und die Eiproduktion spezifisch erscheint und es nach zwei Tagen Behandlungszeit wahrscheinlich auch ist. Aus diesen Überlegungen folgt, dass der Einsatz von Inhibitoren bei multizellulären Organismen nur dann sinnvoll ist, wenn die Auswirkung auf abundante Prozesse untersucht werden.

4.12. Ausblicke

Um mehr über SmTK3 im Zusammenhang mit einer möglichen Funktion in der Vitellarentwicklung zu erfahren, ist zunächst einmal die enzymatische Aktivität über einen Phosphorylierungsassay nachzuweisen. Die Aktivität des Enzyms ist Bedingung für die diskutierten Zusammenhänge zwischen den Herbimycin A-Effekten und SmTK3. Der Gentransfer ist mittlerweile für Schistosomen etabliert (Wippersteg *et al.*, 2002) und erste Daten weisen darauf hin, dass auch die RNAi-Technik bei diesem Organismus anwendbar ist (Buchheiser, 2002). Daher können weitere Einblicke über die Funktion des Moleküls durch Überexpressionsstudien oder durch den *knock out* von SmTK3 erhalten werden. Ein möglicher Einfluss auf die mitotische Aktivität des Vitellariums kann dabei mit der DAPI/BrdU-Technik nachgewiesen werden. Für die Tyrosinkinasen SmTK4 und SmTK5 sind neben der Charakterisierung auf Proteinebene ebenfalls Funktionsanalysen notwendig. Für SmDRF stehen zunächst die bereits zuvor diskutierten Versuche an, welche die Interaktion mit SmTK3 absichern sollen. Anschließend sollte Wert darauf gelegt werden, die vollständige cDNA-Sequenz zu ermitteln und SmDRF auf Nukleinsäure- und Proteinebene zu charakterisieren. Die Funktionsanalysen sollten im Vergleich zu SmTK3 durchgeführt werden, um zu ermitteln, für welche Prozesse die Interaktion der beiden Moleküle von Bedeutung ist.

Durch die Etablierung des Yeast-Two-Hybrid-Systems besteht die Möglichkeit, vollständige Signalwege zu identifizieren. Von besonderem Interesse ist dabei ein vom Männchen direkt

oder indirekt stimulierter Signalweg, der die Vitellarreifung auslöst. Bestätigen sich die Hinweise auf eine Beteiligung von SmTK3 an einem solchen Signalweg, so kann dieses Molekül als Ansatzpunkt verwendet werden. Dabei steht zunächst die Identifizierung des *upstream*-Partners von SmTK3 an, wobei es sich wahrscheinlich um einen Rezeptor handelt. Da diese Interaktion wahrscheinlich über die SH2-Domäne von SmTK3 stattfindet, muss eine Variante des Two-Hybrid-Systems, das Three-Hybrid-System angewendet werden. Dabei sorgt eine zusätzlich in der Hefe exprimierte Tyrosinkinase für die zur Interaktion notwendigen Phosphorylierung der *target*-Proteine. Die Kenntnis des Rezeptors würde Rückschlüsse auf das Signal zulassen und eventuell die Frage klären, ob das vom Männchen abgegebene Signal direkt an den Vitellinzellen wirkt oder nicht. Mit diesem Wissen wäre es vielleicht schon möglich, die dringend benötigten Vakzine gegen die Schistosomiasis zu entwickeln.

5. ANHANG:**Partielle cDNA-Sequenzen der positiven Klone aus dem homologen Two-Hybrid-Screening mit SmTK3****Klon S009 (674 bp)**

- CATGGTCGA	AGATTTGATA	GACCTAAGGG	AAAACAATTG	GATTCCACGT	CGAGCTGGTC
ATGCGTACAG	AAACAAACAA	GCCACGTTTC	CTTACGAGAT	ATTCGCTTGG	AGATATTATT
TTAATCTGGA	GTCCTTGTTG	CCCCAACTCC	AAGTGAACGC	TCTGTACACAC	AACCAGATGT
GCCTGGGAGT	GCTTTTATGG	GTCACTCATC	AGCTTCAAGT	AACTCTTCAG	TGAATGGTGA
ATNTCCTTTC	GNCGGNGGTC	TGAGCTCTAG	TTCATCGAAN	AATAATGGTG	GACTTAATAC
TGGCGAAGTC	TAAAAGTTGG	ATGGAGTTGG	CGCGATTGGG	TGAAGAACTC	TGCNCNTCAA
AGTCCCTCGT	GATTTCTGTN	TTGTCTAGAT	ANCAAAAAATC	NNANNCGGAG	AAAGCCCTAT
TAGTNAAAATN	CCACGGACGT	CCACAGGCNT	GGCAGTNTGC	CACATCAAAT	CGACNCNTNT
TTGTCTANCA	AAAAATGATT	TGTCCCCATT	CCAANCAATN	TTTCCTCACC	AAGGCCTCAA
GTACCAANAN	AACCNCCTGA	CAGCTGGNAC	CAAAAAAACC	GGACAAAANT	NGANGTCCNT
NTGCCGANGT	ATGGCTGGGT	TACNAGGGGN	TNAAAACCCA	AAACTACGGG	ACNTCCNGTA
TTACTTNTGA	NTAAC				

Klon S010 (684 bp)

-- -ACCACCT	CCAGGCATTC	CTCCACCACC	ACCTATGGAG	GGTGTTCCTC	CTCCTCCTCC
TCCTCCGCCA	CCACCACCAC	CACCACCACAT	GGGAGGTATT	CCGCCACCAC	CACCGCCCAT
GTTTAAGTAT	CCCGCCACCA	CCACTGCCCA	TGGGAGGTGT	TCCGCCACCT	CCGCCGGGTT
TCCAGTCATC	TAAACCTCCG	GACGAACTTC	CTTTTGGTAT	GAAACCAAAA	AAGAAATACA
CTTTGGATGT	CCCTATGAAA	AAGGCCAATT	GGGAAAAAAT	TAAGCCCAAT	ATGCTTGATA
AAGACTCTGT	CTGGGTCCAA	CTTCATGAGG	ATGAGCTTGA	GTATGGGGAT	TTGTTGAAAA
ATCTTAGTTG	CTCAATTTAG	CACAAAGCCA	GCTAAGGCTG	ATGGTGTCTG	ATTCTACATC
CAGATGGCCG	CAGCTGCAGC	TGGAAATCTA	CAAGGTATCT	CAANTCTCGT	NAGGACGAAA
AAGCTGGAGG	TAATTTGGAC	GACAAAAAGTN	GGCTTCAAAA	TCCTGGTNNC	ATTTCTTCCT
TTGGGTTTAC	TTTNAAGGT	NCNCATTATG	AATGGAGGCT	TTCGNTNGGG	CCGTAATNCN
CTAAACCTGN	TGTGGATTGA	AAAGGGCTTT	ATTTAAACCT	TCCCCACAAA	TATTTGGTTTT
AGANAGNGCC	ACACCTTGGG	GTTTAAA			

Klon S011 (693 bp)

-- -GTATGTA	CCACAAAAAT	CGGAAGTATT	CAAAGTCAGC	GGATCAGTAG	AATTATTAGA
AGGTAAAAAA	CAGAACTATT	TATCCAACAA	AAACATGCCA	GACTCTTTAA	CAAGTGCAAA
ANTAAGTGAA	AATAATATCA	ATACACAGGA	TCACAAGGGT	TCACTTGATG	ATCAAAATAT
TGATTTGTCA	CCAACAACAA	TTGGTAATGA	AGAAATTCAT	CATCAATCAG	AACATTTAAT
ACAGCATCGA	TCAGTTGAAA	AAAGTATGGA	TGATTTATCG	GATACTTTAG	TAGATCTAAA
TAATTTCAACT	AGACAAGATG	ATATAGATGT	TGAGATACAA	CCAAGGGATT	CAACTAATAA
TTACCACAGA	AAATGGAGTA	TTGCATCAGA	TTATCAATAT	TCTCCTAGTC	AACATATAAA
GTCATTTAAAG	AAAGATGCTT	TATCTACAGA	AGATGAGTCA	TTAAAAACAT	AGATCCTCAA
GTACAAGTCG	TTGTNTGGAC	GATCACCATC	AACGGAAAAA	AAAAAGAAGG	AGCAATTCAT
ACCCAGGNCA	TTACATAAAA	GAAGTNTACA	TTATAACGNA	AAAATATTTT	GGATCCAACC
TGGTTATTGG	CCCTTCCGGT	ANTTCAGNTA	CCCAACCAAG	CCCTTCCGGA	TTTNAANAAG
GACNATNCGT	CCCAGCCANN	CANTTCNTCT	TGGGAC		

Klon S017 (629 bp)

-- -AACGGAA	AAAAAAAGAA	GAGCAATTCA	TACCAGTCAT	TCACATAAAA	AGTATACATA
TAAGAAAAATA	TTTGATCAAC	CTGTATTGCC	ATCCGTATTTC	AGTACCAACA	GCCTCCGATT
TAATAGACAT	CGTCCAGCAT	CAGTCTCTGG	TTATTTGGAT	GAATGCGCAT	TAAACAGATC
ATATGATTTA	TACCCTGTAC	CAACTTCAGC	TAGACCAAGT	ACCAGTTTTG	GACATTTTACA
TAATTTCTAAA	CGTTTTAAAAAT	CACTGGAAAAG	AGATTATTAT	ACATCTTGTC	AAAATTTAAG
TACAAAACCT	TACTCCACTG	TGAAATTGAA	TCGTCAACTA	AATCGACAAC	CTCATATTAT
TCACGCACAT	TCAGATCGTC	GTCTAAGAGA	TATGCAACAT	ACAAATTATT	TACGTCATGG

CAATCGTATG	GATAACGAAT	ATGAGCGAAT	TTATTTTCCT	CAATCATATT	CATCACATCA
TTTAAAAAATT	CCGGNAAAAA	ACATGTTTGG	AAAAGGTAGT	CTAGGATCAT	ATCAATTCTT
GAAGTGGATC	GTTTACGAGA	TTGTATCAAA	TTATTTAAAT	NCCATTAAT	ATTTAGTGTG
NTNGNGATGA	NTTTAAAACC	AAAATTTAAA	CA		

Klon S021 (458 bp)

GTCCCACTTC	AAACAATATT	CCTCACCAAG	GCTCANAACC	AAGACAACAC	TGACAGCTGG
ACGCAAAAAGA	AACGGAGAAA	ATTGAAGTCA	GTAGCGATGT	AGGGTGGGTA	CGAGGTGTCN
TNTTNAAAAAC	TACGGAACTC	CGTTATTACT	CTGAGTAACG	GCATATCAAC	TACTAATTCT
AATTTACCTC	CTCGAATGCT	AAGAAAACTG	GCTGCGGAAAG	CTGCTGGAAA	TTCACGAGTN
AATTCTACAT	CAAACGTTTT	TAACGAAAACA	AAACAGCCTG	CCAATTCGGA	AGTACAGAGC
TTCCATGCAA	AGTCTACTGA	TAATATAACA	TCCATTTCCA	AAGTCAGNNC	CATCCTGCAC
CACGTNTTTT	ATCCATTTGA	TTGAGCAAGT	CAGCTCTTCT	GATCCTTTTG	AGCCTGCATA
CTTGCAAAAA	GAAAGGTTAT	CGGTCAATGG	CGGAGATG		

Klon S023 (678 bp)

- - - AACGGAA	AAAAAAAAGAA	GAGCAATTCA	TACCAGTCAT	TCACATAAAA	AGTATACATA
TAAGAAGAAT	ATTTGATCAA	CCTGTATTGC	CATCCGTATT	CAGTACCAAC	AGCCTCCGAT
TTANTAGACA	TCGTCCAGCA	TCAGTCTCTG	GTTATTTGGA	TGAATGCGCA	TTAAACAGAT
CATATGATTT	ATACCCTGTA	CCAACTTCAG	CTAGACCAAG	TACCAGTTTT	GGACATTTAC
ATAATTCTAA	ACGTTTAAAA	TCACTGGAAA	GAGATTATTA	TACATCTTGT	CAAAATTTAA
GTACAAAACC	TTACTCCACT	GTGAAATTGA	ATCGTCAACT	AAATCGACAA	CCTCATATTA
TTCACGCACA	TTCAGATCGT	CGTCTAAGAG	ATATGCAACA	TACAAATTAT	TTACGTCATG
GGCNATCGTA	TGGATAACGA	ATATGAGCGA	ATTTATTTTT	CCTCAATGCA	TATTCATCAC
ATCATTTTTAA	AAATTTCCGG	AAAAAAAACAT	GTTTNGGAAA	AGTAGTCCTA	CATCATATCN
AATNCTTGGA	AGGTGGATCG	TTNTNCCNAG	ATTGTATTCA	AAATNATTNA	AATCCCATNA
AAATAATNAG	TGNTGGTTGN	CGAATGGATT	TAAACCCAAG	ATTTTCCACC	CAACNTTANA
NCTCTATTTT	GGGNGCGCNT	T			

Klon S026 (628 bp)

- AGAAGATGA	GTCATTA AAAA	CATAGATCTC	AAGTACAAGT	CGTTGTTGGA	CGATCACCAT
CAACGGAAAA	AAAAAGAAGA	GCAATTCATA	CCAGTCATTC	ACATAAAAAG	TATACATATN
AGAAAATATT	TGATCAACCT	GTATTGCCAT	CCGTATTCAG	TACCAACAGC	CTCCGATTTA
ATAGACATCG	TCCAGCATCA	GTCTCTGGTT	ATTTGGATGA	ATGCGCATTA	AACAGATCAT
ATGATTTATA	CCCTGTACCA	ACTTCAGCTA	GACCAAGTAC	CAGTTTTGGA	CATTTACATA
ATTCTAAACG	TTTAAAATCA	CTGGAAAGAG	ATTATTATAC	ATCTTGTCAA	AATTTAAGTA
CAAAACCTTA	CTCCACTGTG	AAATTGAATC	GTCAACTAAA	TCGACAACCT	CATATTATTC
ACGCACATTC	AGATCGTCTG	CTAAGAGATA	TGCAAACATA	CAAATTATTT	ACGTCATGGC
AATCGTATGG	ATAACGAATA	TGAGCGAATT	TATTTTTCCT	CAATCATATT	CATCACATCA
TTTAAAAAAT	TTCCGGGAAA	AAACATGGTT	TTGGAAAAGTA	GTCTAGGATC	ATATTCAATC
TTTGAAGGNG	GNTNCGGTTT	TACGAGATA			

Klon S030 (540 bp)

- - - - ATCAAC	GGAAAAA AAAA	AGAAGAGCAA	TCTCATACCA	GTCATTCACA	TAAAAAGTAT
ACATATAAGA	AAATATTTGA	TCAACCTGTA	TTGCGATCCG	TATTCAGTAC	CAACAGCCTN
NNTTTTAATA	GACATCGTCC	AGCATCAGTC	TCTGGTTATT	TGGATGAATG	CGCATTA AAC
AGATCATATG	ATTTATACCC	TGTACCAACT	TCAGCTAGAC	CAAGTACCAG	TTTTGGACAT
TTACATAAAT	CTAAACGTTT	AAAATCACTG	GAAAGAGATT	ATTATACATC	TTGTCAAAAT
TTAAGNACAA	AACCTTACTC	CACTGTGAAA	TTGAATCGTC	AACTAAATCG	ACAACCTCAT
ATTATTACAG	CACATTCAGA	TCGTCTGCTA	AGAGATATGC	AACATACAAA	TTATTGTACC
GTCATGGCCA	ATCGTATGGA	TAACGAATAT	GAGCGAATT	TATTTTTCCT	TCAATCATAN
TCATTCACAT	GCATTTTAAA	ATTNCGGNA	NAAAACCATG	GTNTTGGA AA	AGGTAGTNCT
AAAA					

Klon S037 (451 bp)

---GGAAGG	AAAAATCTTT	AAGTCGTCTT	CGAAAAGCGAA	TGACAACTGT	ATCTTATCTT
CTAGAGTGCG	GTTTCATGGTC	GAAGATTTGA	TAGACCTAAG	GGAAAACAAT	TGGATTCCNT
TTTTNAGCTG	GTCAGCGTAC	AGAAACAAAC	AAGCCACGTT	TCCTTCGAGA	TATTCGCATT
GGAGATATTA	AAAGAATCTG	GAGTCCTTGT	TGCCCAACT	CCAAGTGAAC	GCTCTGTCAC
ACAACCAGAT	GTGCCTGGGA	GTGCTTTTAT	GGGTCACTCA	TCAGCTTCAA	GCAACTCTTC
AGTGAATGGT	GAATTTCCCTT	TCGTGCGCGG	TCTGAGCTCT	AGNTCATCGA	AAAATAATGG
NTGGACTTAA	TACTGGGTGA	AGCCTAAAAG	TTGGATGGAG	NNGGCNCCGA	ATGGGTGAAG
AACTCTGTGC	NCAAAAAGCNC	CTTCGTGATT	TCTGC		

Klon S039 (671 bp)

-ATTTCAAAT	CGCAAAGATG	TCATCAGCTT	TTACGATGCC	GCTGCTCGCA	ATGATGAGAA
TAATTCTCAT	ACCAAGAGGA	GAGAAACTCG	TATATTTTAT	CTGAGGAACT	TTAACAACTG
NATGAAAAGC	GTTTTTCATCA	ATAAAAGTCT	TCGAAGCTTA	GATGTCCCTT	CCAATCGTGC
TCAAATATTA	GATCTGTGTT	GTGGTAAGGG	TGGAGACCAG	TTAAAATGGT	TACGCGCGCG
TGTTCAACAT	GTAACTTTTG	TGGATTTGTC	CAAAGAGTCT	ATTGAGGTTT	GTCGTCATCG
GTATGAACAA	CTGTGTAGAA	ATAAACGGTC	TGTTTTCACT	GCAGACTTTT	TCGTGGCGGA
CTGCTCAGAA	GCTATACTCC	CACAAGTGCT	TCCATCTGGT	GTCTTATATG	ACTTAGTCAG
TTGTCACTCT	CGCACTTCAT	TATGCTTTTTG	AGAGCATAAC	TCAGGCACGT	ACGATTTTTG
TCAAATATTA	GCTCTCTGTT	ACGGAGGAAA	ATGGNTTTTT	TCATTGCAAC	AATTCCAAAT
GCNTACGAAA	CTTTTTGCGC	AANNGTACT	TGAAGCCGTT	AACCAAAACA	TGTNCAAAAA
ACCAAGNCCT	TCAGGAAATT	TTGNATATNA	GANGGAAAAT	TNAAGTTNTG	GGNAAATTC
GGNTTTATTT	CA				

Klon S047 (636 bp)

---AGAAGA	TGAGACATTA	AAACATAGAT	CTCAAGTACA	AGTCGTTGTT	GGACGATCAC
CATCAACGGA	AAAAAAAAAGA	AGAGCAATTC	ATACCAGTCA	TTCACATAAA	AAGTATACAT
ATAAGAAAAT	ATTTGATCAA	CCTGTATTGC	CATCCGTATT	CAGTACCAAC	AGCCTCCGAT
TTAATGAGAC	TCGTCCAGCA	TCAGTCTCTG	GTTATTTGGA	TGAATGCGCA	TTAAACAGAT
CATATGATTT	ATACCTGTGA	CCAACCTCAG	CTAGACCAAG	TACCAGTTTT	GGCATTTTAC
ATAATTCTAA	ACGTTTAAAA	TCACTGGAAA	GAGATTATTA	TACATCTTGT	CAAAATTTAA
GTACAAAACC	TTACTCCACT	GTGAAATTGA	ATCGTCAACT	AAATCGACAA	CCTCATATTA
TTCACGCACA	TTCAGATCGT	CGTCTAAGAG	NATATGCAAC	ATACAAATTA	TTTACGTCAT
GGCAATCGGT	ATGGATAACG	AATATGAGGC	GAATTTTATT	TTNCCTCAAT	CNTTATTCAT
CACCATCNAT	TTTAAAAANT	TCCCGGAAAA	AAACATNGTT	TTGGGAAAAG	NTAGTTCCTA
AGATCATTAA	TCCAATTCCT	TGGAAAGNGG	GGATCNGTTT		

Klon S052 (545 bp)

---AGAAGT	TGAAAAGAAA	TTGGATTTTG	TTTTGATGCG	TAAACGTTTA	ACACTACAGG
AAGCAATGAA	AAAGCCTTTC	AAGGTGAAGC	GCAAAATTAAG	AGTCATGCTC	AGCAGCACTT
TTAAGCCTGG	CGCTACTGTT	ATGCCTGTTG	GATCAGATGC	ACAAACTACA	CCTGGTGATT
GTGCACCTGG	TTGGGAGCTG	AAAGTCGAAG	GGCAGTTATT	GGATAAACCT	GGTCAACCAA
GTAATAATGA	CCCGAAATGT	CGTAGAAAAAT	TTTCATCATT	TTTTAAATCA	C TTGTAATCG
AATTGGATCG	TGAACTTTAT	GGTCCTGATA	ATCATCTAGT	TGAGTGGCAC	AGAACAGCTA
CAACAGCTGA	AACTGATGGA	TTCCAGGTAA	AACGTAGAGG	CGATAGTAAT	GTTTCGGTGA
CAGNATTTGTT	AATGTTAGAC	CACCAACCTC	CACAATACAA	GTTAGACTCA	CGTTTTAGCA
AGAATATTGG	CCCTGCATAC	TGGTACGCGT	TTACTCAAAT	TATTCTACCN	CTGTTATGGA
AACCTATTT					

Klon S076 (656 bp)

---AACGGAA	AAAAAAAAAGAA	GAGCAATTCA	TACCAGTCAT	TCACATAAAA	AGTATACATA
TAAGAAAATA	TTTGATCAAC	CTGTATTGCC	ATCCGTATTC	AGTACCAACA	GCCTCCGATT
TATTAGACAT	CGTCCAGCAT	CAGTCTCTGG	TTATTTGGAT	GAATGCGCAT	TAAACAGATC
ATATGATTTA	TACCCTGTAC	CAACTTCAGC	TAGACCAAGT	ACCAGTTTTG	GACATTTTACA
TAATTCTAAA	CGTTTTAAAT	CACTGGAAAAG	AGATTATTTAT	ACATCTTGTC	AAAATTTAAG

TACAAAACCT	TACTCCACTG	TGAAAATTGAA	TCGTCAACTA	AATCGACAAC	CTCATATTAT
TCACGCACAT	TCAGATCGTC	CGTCTAAGGA	GATATGCAAC	ATACAAATTA	TTTACGTCAT
GGCAATCGTA	TGGATAACGA	ATATGGGCGA	ATTTTTATTTT	CCTCAATTCA	TATTCATTCA
CATTCAATTTA	AAAAATNTCC	GGGAAAAAAC	ATGTTTTGGG	AAAGNNAGTT	CTAGATTTCAT
ANTCAATNCT	TGAAAGTTGG	NATTCGGTTT	TACCAANAAT	TNGTAATTCA	AAATTNATTT
AAATCCCNTA	AAATANTTAA	GTTGNGGTTG	GGGGATGATT	TNAANACCCA	AAAATTTTAC

Klon S083 (636 bp)

--ACCAAAAA	GCGGACGTGG	GAAAGTGTA	ATTGATATGC	ACAGTCCAGG	GATCATTGTT
GGGATGCCGT	TCGTGCGATG	CATTCTAAAA	GAAAGCAGTT	GCGAAATAGA	GTGGCATGTN
TGCGAGGGTC	AGACAGTAAA	ATCCTGTCTT	GTAAGAGTTG	CTACGATCAG	TGGGGCTGAT
GAAGATATTT	TCTTTTGC	AAACTTGGTT	ATTTTCGGTCC	TTTCGAGAGC	CAGTGGGATA
GCAACCTTGG	CCAGCAGAA	CCAATTAATT	ATACAGGAA	TTTCGTGGAA	GGGGACAATA
TATATGCCTG	ATAGACGGAC	CCCGGTTTTT	GGTCTTGTTG	AAGAGTATGC	AATGATGATA
TCAGGAGTTT	CTGACATAGA	AGCATCGGTT	AGCGTTTCGCT	GCCAAAATAT	GGATGCTGAG
AGCTTAAAAA	CTGCCATAGA	TGAAGTTCGG	TCTAGAGTTT	GGTTCCTATT	CCCGTTCATG
TTGCCTGCTC	AAGGTTAGAT	GAAGCCCTGT	TTTAGCTGCC	TGGAGCTG	AGCAGACATA
TTACTTTTACT	GGGGTTTGAG	TGNCTAAGGG	AGAATTTNTTA	GATATTGCTA	CTCCAAGTGA
AAAGATTNAT	TTCCCCAGAA	AATTCCAGGN	TTATCNGG		

Klon S085 (646 bp)

---AACTACT	GCAGCGTCTG	TAGCTCAGAA	TAACTACCCG	TCGTGCGCTA	CTCCTTATAC
ACTTTATCAA	CATTTCATCTC	CAACGGCAAA	TAATAATGCC	ACAGCTGTTT	GTAATGGATC
ATCAGTACCA	GCACCGCCAG	CACTTCTCTC	GCTCCAACCT	CCTGCCAGAC	CGTCGATTTT
AAAGAGCAGT	TCTATTTCTT	CATCTAATAA	CAATAATAAT	AGTTATCTTA	GGCACAGTTT
TCATAAAAAA	TCATCTGAAA	ATAATCAGCC	AATGCCACCT	ATTGTTTCTA	GTCCACCTGT
ACAAGTTATA	ATGCTTTCTT	CAATACCAAC	ATCGTFCAGCA	TCACCTTCAT	CACCACCACC
ACCAAGAGTA	ACTCCTCTTC	AGTTAGGAAG	TATAGCTACT	GTACATGAAA	ATAATATTTAA
TGATATGAAT	AGTAATAGTA	CTGTTAATAA	TTTGAATGGT	ACTACTACTA	TGCCCTCCACC
TCCATCTGGA	CGTTCCCCAC	GACGGAAACA	AAGTAGTTCA	AATCGATATC	AGCGCGCTGG
TTCAACAAAA	CGCAGNATGT	AAATGGTATA	CCTGTTGGTC	CAATCAACTA	AAGTGATACG
NTATTNCATC	AAATATCATT	GGAAGCTTGC	CTGATCCACC	ATCTANACC	

Klon S090 (701 bp)

---AGAAGAT	GAGTCATTAA	AACATAGATC	TCAAGTACAA	GTCGTTGTTG	GACGATCACC
ATCAACGGAA	AAAAAAGAA	GAGCAATTCA	TACCAGTCAT	TCACATAAAA	AGTATACATA
TAAGAAAATA	TTTGATCAAC	CTGTATTGCC	ATCCGTATTC	AGTACCAACA	GCCTCCGATT
TAATAGACAT	CGTCCAGCAT	CAGTCTCTGG	TTATTTGGAT	GAATGCGCAT	TAAACAGATC
ATATGATTTA	TACCCTGTAC	CAACTTCAGC	TAGACCAAGT	ACCAGTTTTG	GACATTTTACA
TAATTCTAAA	CGTTTAAAAA	CACTGGAAAAG	AGATTATPAT	ACATCTTGTC	AAAATTTAAG
TACAAAACCT	TACTCCACTG	TGAAAATTGAA	TCGTCAACTA	AATCGACAAC	CTCATATTAT
TCACGCACAT	TCAGATCGTC	GTCTAAGAGA	TATGCAACAT	ACAAATTTAT	TACGTCATGG
CAATCGTATG	GATAACGAAT	ATGAGCGAAT	TTATTTTCTT	CAATCATATT	CATCACATCA
TTTAAAAATN	CGGAAAAACA	TGTTTGGAAA	GTAGTCTAGA	TCATATCAAT	CTGAAGTGGA
TCGTTNCGAA	ATGGATCAAN	TATTAATCCT	AAANTTAGGG	GTNGGGAGAT	TAANCCAATT
TAANAAATAA	AACTNTTGGA	AGCTTCTCTT	TTTTTNGNCT	TTTA	

Klon S096 (859 bp)

---TCGACGG	AACTATCTCA	TCTTATTATG	GATACTTCAT	CTTTAGAAGG	GAAGTGCCA
GAAGAGTCTG	ACAAAATCAC	AGCTTCTAAA	TTCAATGATT	ACCTTTCAAA	CCATCCAATT
GATGCCAGGA	TACGAGCATC	AGACTACATT	CATGCTTGCT	TGCCGGTTCAT	TTATGAATAT
ATTTATAGAG	TAGGAATTGT	TGATCTTGGC	AGTTTGTCTT	CTCCCCCAC	TTTAATGGCT
AGAGAAAAAG	CTGCGTGGGA	GTGCATAGTA	CCTCATGTAC	TTATCGAAGT	TTTAAGAAGC
TCAACAGACC	GACAGTTGGA	TGCTCTTCAT	GACCTGCAGT	TCTTCTGGGT	TGATAAAAAAT
ATGCCTAAAG	GGTTTTTGTT	TCGTTGTTTT	ATGAACCTTT	ATAATTGTGA	GCTTATATGT
GAAGATGCAT	TTTTATCATG	GAAAGAAGAA	GTGAATCCCA	GTTATCCTGC	TAAAGGTCAA

GCATTATTTG	AGGTCAATCG	CTGGTTAACC	TGGTTAGAAA	CAGTGGAGGA	AGAAGACGAA
GAAGACCGAC	GTAATCTGTA	TGCGAATGAA	GATCATGCAA	AAATAGTTCA	AGGAAAGTTC
AGTGGATTCTG	GGAAAAACTC	AANAAGCTTC	TAAATCTCCC	AACCATTTTA	CTGATATTGG
AGTCTCATAT	TATGGCCGCC	AGCCCCTTGC	ATTCCCAATT	TAAGCAGTTT	TGCNGTTCCCT

Klon S108 (627 bp)

---GAAAAAA	AAAGAAGAGC	AATTCATACC	AGTCATTCAC	ATAAAAAGTA	TACATATAAG
AAAATATTTG	ATCAACCTGT	ATTGCCATCC	GTATTCAGTA	CCAACAGCCT	CCGATTTAAT
AGACATCGTC	CAGCATCAGT	CTCTGGTTAT	TTGGATGAA	GCGCATTA	CAGATCATAT
GATTTATAAC	CTGTACCAAC	TTCAGCTAGA	CCAAGTACCA	GTTTTGGACA	TTTACATAAT
TCTAAACGTT	TAAAATCACT	GGAAAGAGAT	TATTATACAT	CTTGTCAAAA	TTTAAGTACA
AAACCTTACT	CCACTGTGAA	ATTGAATCGT	CAACTAAATC	GACAACCTCA	TATTATTCAC
GCACATTCAG	ATCGTCTGCT	AAGAGATATG	CAACATACAA	ATTATTTACG	TCATGGCAAT
CGTATGGATA	ACGAATATGA	GCGAATTAT	TTCTCAAGC	ATATTCATCA	CATCATTTAA
AAATTCCGGA	AAAACATGTT	TGGAAAAGTAG	TCTAGATCAT	ATCAATCTTT	GAAGTGGATC
GTTTACGAGA	TTNGTATCAA	TTATTAAATC	CANAANTATA	AGTGNGGTNG	GGATGATTA
ACCAAAATTT	AANCAAAATA	AAANTTTTTG			

Klon S114 (458 bp)

-----G	AAAAAAAAG	AAGAGCAATT	CATACCAGTC	ATTCACATAA	AAAGTATACA
TATAAGAAAA	TATTTGATCA	ACCTGTATTG	CCATCCGTAT	TCAGTACCAA	CAGCCTCCGA
TTTAATAGAC	ATCGTCCAGC	ATCAGNCTCT	GGTATTTTGG	ATGAATGCGC	ATTAAACAGA
TCGTATGATT	TATACCCTGT	ACCAACTTCA	GCTAGACCAA	GNACCAGNTT	TGGACATTTA
CATAATTCTA	AACGTTTAAA	ATCACTGGAA	AGAGATTATT	ACACATCTTA	TCAAAATTTA
AGTACAAAAC	CTTACTCCAC	TGTGAAAATTG	AATCGTCAAC	TAAATCGACA	ACCTCATATT
ATTTACGCA	CATTACAGATC	GTCGTCTAAN	AGATATGCAA	CATACAAATT	ATTTACGTCA
TGGNAATCNG	TATGGATAAC	GAAAATGAGC	GAATTTTA		

Klon S129 (745 bp)

GAGGCGGAAC	CATGTGAATT	AGCTGCAATA	TTAGTAGCAT	GTGCTGAAAA	CTTTTTGCAT
CGCGATGCGT	TTACGTCATC	CCTTACATCT	AAGGATAATC	GCAAAATGAA	ACCCACAAAA
TTGTATGTC	ATCCTCTATC	TCTCGTATGG	TCAAACTTCC	TTAGCAAAAC	TTTATGTGTG
ACACAGTTAA	CTTATTCCAA	GTCCAAACTA	GCATTTTTTAT	CAGCTGCTTT	AATTTGGAGT
CGTCATATTA	GTCTGTCTAA	CTTTGGTGAG	CCTTTACGTG	GGGGTAAACA	TCATCCCTTG
TTTTTACTCG	TTCTACAACG	GTTATCACAA	ATTATTAGTG	AAGATGGAAG	TGACACAAAT
TGTACATCTG	GAGCAGGATT	GAGTGACAGA	CGTTCCTTGC	TCATTCAATT	ATTTCAAGAG
AGTGAATTGC	AAATGAATCA	AATGGTCCCA	GAAGGGAGTC	AAACAAACAA	AGCTTTGTTG
TCTTTGCTGG	AAGAACGTAA	TTTAGATTTT	CTCGTCCCAA	AACTTACGAT	TGTCGACGGA
ACTATCTCAT	CTTATTATGG	ATACTTCATC	CTTTAGAAGG	GGAAGTGTCC	NAGAAGAAGT
CTGACAAAAA	TCACAGCTTT	CTAAAAATTT	AATGGATTAC	CCTTTCAAAC	CCATTCCCAA
TTTGGATGGC	CCNNGGGATA	ACNAAGCCAT	NCAGAACCCTA	ACANTTTCAT	TGGCCTTTGN
CTTTGGCCCC	GGNCNATTTT	TTAAT			

Klon S138 (674 bp)

GATGGTAATC	AGGTTAGTCA	GCTTGTGAGC	AGACGAAATGT	TGCCAGCTGA	TCCGCGCCTG
CATCAGGTTA	TCGGACGTGC	GGCTACCGCG	AAGCGAAAAC	GTCGTTTGGC	TGATCGTCTT
CTTACAAAAA	CGGTACGAGA	AATCATTCCG	GAGTCTGAAT	CATATATGGA	GCTTTTAGAA
GTTGAAAAGA	AATTGGATTT	TGTTTTGATG	CGTAAACGTT	TAACACTACA	GGAAGCAATG
AAAAAGCCTT	TCAAGGTGAA	GCGCAAATTA	AGAGTCATGC	TCAGCAGCAC	TTTTAAGCCT
GGCTCTACTG	TTATGCCTGT	TGGATCAGAT	GCACAAACTA	CACCTGGTGA	TTGTGCACCT
GGTTGGGAGC	TGAAAGTCGA	AGGGCAGTTA	TTGGATAAAC	CTGGTCAACC	AAGTAATAAT
GACCCGAAAT	GTCGTAGAAA	ATTTTCATCA	TTTTTTAAAT	CACTTGTAAT	CGAATTGGAT
CGTGAACCTT	ATGGTCTTGA	TAATCATCTA	GTTGAGTGGC	ACAGAACAGC	TACAACAGCT
GAAACTGATG	GATTCCAGGT	AAAACGTAGA	GGCGATAGTA	ATGTTCCGGT	TACAGTATNG
TNATGTTAGA	CCACCANCTC	CANATACAAG	TTAGACTCCG	TTANCAGAA	NTNGNCCTGC
TACTGGTNCC	GTTT				

Klon S139 (657 bp)

```

-----G   CCCATGGAAC   AGTTGGATAC   ACTGGTGCGG   ATATACAGAA   TTTGGTTAAT
CAAGCTGCTA TCGCTGCTGC   ACTACGTAAT   GATCCTTTTG   TTGAAATGCA   TCATTTATGG
GATGCTCGTG ATCGATTAAT   AATGGGACCA   GCTAAACGTC   GTCCATTGGA   TGATCAAAC
AATCGAGTGT CAGCATTTCA   TGAGGCTGGT   CATGCTTTAG   TAGCATTGCT   GACTGCGGAT
AGTATAACCAT TACACAAAGT   TACAATTATT   CCTCGAGGTG   AGGCAGGCGG   TCTTACTAGT
TTTCTACAAG AGAAAGATAT   AAGTTTTATG   ACTCGTGCAC   AATTATTAGC   TCAATTAGAT
GTATTGATGG GTGGTCGAGT   TGGTGAAGAA   TTAGTTTTTG   GTGCAGACAA   AGTTACCAAT
GGTGCAGCAG ATGATTTTCG   AAAGGCAACA   ATTTTAGCTC   AAAATATGGG   TGAAACGCTT
CGGTTTTTCA AGTAAAATTG   GACCAAGAGT   TATACCAGAT   ACTCAGGATG   AACAACTTGG
TGAANCCCCC GTGACCTAAT   CGATAAAGAA   GTTGACCANT   ACTCATGATT   CTTTAACTCG
NGTACGTACT TTACTATCTA   GTCAAGTAAA   CAANAAAACT   TCTAGCTGAA   GCNTACTACT
TTTGAA

```

Klon S141 (662 bp)

```

-AGAGAAGCA TTTTCTGTCA   ATRACTACAGC   ATTTTCTTTT   CATTTCGTGAT   GAGCCCTATA
GATTAACCTA CTTTACTCTT   CTGGAAGAAC   TGATTGGTCA   AGTTATGATT   CAGAATGATG
GTGTCGATCC TGATCCGCAT   ATGAACATTC   TGCGCCTGGA   TGTGAGAGT   ACTGTGCGAT
TATTGGTAGA TGCATAAAG   GAAGCTGACG   CTTCAACTCG   TGTGAGGAG   CTTCAAGCTA
AGTTAGATGC CGCTCTTCAA   GCTAAATTAG   AGGCAGAAGC   CAAAGTGCAA   ACATTACAAA
GTCATTTGAG TTCGGGAGAC   AGGTCTACAA   TAAAGCTTAC   TCCTGATATC   TTACCTCCAC
CTTCGTTAAG TTCAAGTATA   CCACCACCTC   CAGGCATTCC   TCCACCACCA   CCTATGGAGG
GTGTTCTCCT TCCTCCTCCT   CCTNCGGCAC   CACCACCACC   ANCACCCATG   GGGAGGTATT
CCGCCACCAC CACCGCCCAT   GGGAAGTATC   CCGCCACCAC   CACCGNCCAT   GGGAGGNGNT
CCGCCACCTN CGCCGGGTTT   NCAGNCATCT   AACCTCCNGG   ACNAACTTCC   TTTTGGNTTG
AAACCAAAAA GAAAAAACTT   TGGATGTCCC   TTNGAAAAAG   GCCANTGGGN   AAAAATAANC
CCA

```

Klon S279 (674 bp)

```

-AGTAGCATG TGCTGAAAAC   TTTTTGCATC   GCGATGCGTT   TACGTCATCC   CTTACATCTA
AGGATAATCG CAAAATGAAA   CCCACAAAAT   TGCATGTGCA   TCCTCTATCT   CTCGTATGGT
CAAACCTCCT TAGCAAAACT   TTATGTGTGA   CACAGTTAAC   TTATTCCAAG   TCCAAACTAG
CATTTTTATC AGCTGCTTTA   ATTTGGAGTC   GTCATATTAG   TCTGTCTAAC   TTTGGTGAGC
CTTTACGTGG GGGTAAACAT   CATCCCTTGT   TTTTACTCGT   TCTACAACGG   TTATCACAAA
TTATTAGTGA AGATGGAAGT   GACACAAATT   GTACATCTGG   AGCAGGATTG   AGTGACAGAC
GTTCTTTGCT CATTCAATTA   TTTCAAGAGA   GTGAATTGCA   AATGAATCAA   ATGGTCCCAG
AAGGGAGTCA AACAAACAAA   GCTTTGTTGT   CTTTGCTGGA   AGAACGTAAT   TTAGATTTTC
TCGTCCCAAG CTTACGATTG   TCGACGGAAC   TATCTCATCT   TATTATGGAT   ACTTCATCTT
TAAAAGGGAA GTGTCCAGAA   GAGTCTGACA   AAATCACAGC   TTCTAATTCA   TGATTACCTT
TCAACCATCC ATTGATGCCA   GGATNCGAGC   ATCAGACTAC   ATTCTGCTNG   NTGNCGGCN
TTTTGAATTT TTAAG

```

Klon S281 (723 bp)

```

-----GAA   AAAAAAGAA   GAGCAATTCA   TACCAGTCAT   TCACATAAAA   AGTATACATA
TAAGAAAATA TTTGATCAAC   CTGTATTGCC   ATCCGTATTC   AGTACCAACA   GCCTCCGATT
TAATAGACAT CGTCCAGCAT   CAGTCTCTGG   TTATTTGGAT   GAATGCGCAT   TAAACAGATC
ATATGATTTA TACCCTGTAC   CAACTTCAGC   TAGACCAAGT   ACCAGTTTTG   GACATTTACA
TAATTCTAAA CGTTTAAAAAT   CACTGGAAAAG   AGATTATTAT   ACATCTTGTC   AAAATTTAAG
TACAAAACCT TACTCCACTG   TGAAATTGAA   TCGTCAACTA   AATCGACAAC   CTCATATTAT
TCACGCACAT TCAGATCGTC   GTCTAAGAGA   TATGCAACAT   ACAAATTATT   TACGTCATGG
NCAATCGTAT GGATAACGAA   TATGAGCCGA   ATTTATTTTT   CCTCANTCAT   NTTCATCACA
TCATTTAAAA ATTCCGNAAA   AAACATGTTT   TGGNAAGNAG   TCTAGANCAT   ATCAATCTTT
GAAGTGGATC GTTTACGAAG   ATTGNTTCAA   ATTATTTAAA   TCCATAAATN   TTAGTGTGTT
NGANGATNT AAACCAAATT   TAAACNAAAA   TAAACNTTNT   TGGACAGCTT   CCTTTTTTTT
TTGGNCTTTT ANAAANCAAN   ATCAAAATTN   AGTTAATAAT
TGACNAANAA TTTNGTANAA   GANAAAACCT

```

Klon S283 (528 bp)

```

-----GAC  GATGTTTTTG  AGCGACTAGA  TTCAGTCAAA  TGTGATCTCG  ATGATGCTAA
CCAGATTTTC  CACATTCTTC  ATCGTACTAT  TATGGGGAGC  AAATCAGAGA  AGCATTTTCT
GTCAATACTA  CAGCATTTTC  TTTTCATTTCG  TGATGAGCCT  TATAGATTAG  CTTACTTTAC
TCTTCTGGAA  GAACTGATTG  GTCAAGTTAT  GATTCAGAA  GATGGTGTCC  ATCCTGATCC
GCATATGAAC  ATTCTGCGCC  TGGATGTTGA  GAGTACTGTC  GCATTATTGG  TAGATGCACT
AAAGGAAGCT  GACGCTTCAA  CTCGTGTTGA  GGAGCTTCAA  GCTAAGTTAG  ATGCCGCTCT
TCAGCTAAAT  TAGAGGCAGA  AGCCAAAGTG  CAACATTACA  AAAGTCATTT  GAGTTCGGGA
GACAGGTCTA  CAATAAAGCT  TACTCCTGAT  ATCTTACCTC  CACCTTCGTT  AGTTCAGTA
TACCACCACC  TNCAGGCATT  CCTNCACCCC  ACCTATGGAG  GGGGTTCCTC  CTCCT

```

Klon S288 (529 bp)

```

-----AGA  TGAGTCATTA  AAACATAGAT  CTCAAGTACA  AGTNNTTTTT  GGACGANCAC
NNTCAACGGA  AAAAAAAGA  AGAGCAATTT  NTNNCAGTCA  TTCACATAAA  AAGTATACAT
ATAAGAAAAT  ATTTGATCNA  CCTGTATTGC  CATCCGTATT  CAGTACCAAC  AGANNAAGAT
TTAATAGACA  TCGTCCAGCA  TCAGTCTCTG  GTTATTTGGA  TGAATGCGCA  TTAACANATC
ATATGATTNA  TACCCTGTAC  CAACTTCAGC  TAGNACCAAG  TACCAGATTT  TGGACATTTA
ACATAANTTC  TAAACGTTTT  AAAAAANCACT  GGATAGAAGA  TTATTATACC  TCCTTAGTNC
AAANTTTTAA  AGTNCAAATA  ACCTTACCNT  ACAACTGTGG  CAAAATGGAG  TCGTTCAACT
AAAAATCGAC  NNAACCTCAA  TATTTATTTT  ANNCCCNATT  NAAAAATCGG  CCNCATAAAN
ANATTTTTCC  NACTNTACCA  AGNTTNATTT  TACGGTAATG  GNCNACCGNT  TATGGG

```

Klon S301 (551 bp)

```

-----CATA  TACATAAGAA  AAATCATTCA  AATTATAGGA  GTAAATNTCA  AAATGATGAT
ATATATTTAT  CTTTACTAAC  TTTATATCAA  TCAAAATCATG  TAAAAATAAA  TTGTAATCA
GATTGTAATA  GAAGTAGTAA  TAAACTCTTC  AAGAATAATT  CGACCACTCC  CTCTATTACT
TGTCATACGA  ATAGGATTAG  TGGTAATAAC  AGTAGTGTC  TCAGGTCATC  TTCAAAACAA
TGCAAAAAGT  GTTATAATTA  TGTGGATTCA  TTCAACGATA  CATCTCTTAT  ACCAAATTTA
ATTGTTTCATT  TACCAATGTA  TAAATCATCT  TCTGGTTGNN  AAACAATGTT  GTCGTTTTAG
GCAGCCAGNG  TATTTCCGCT  TACACTTACC  ACTTATGGTT  GTGTATGGNT  AAGTAACCAA
AGCGTTNGGC  TACAAACTTA  NCTATATTTG  TATCATCACC  TTGGTTTTCA  TTTTCATAAT
GCTAATNGGT  TCTTCCTCTT  CTTNCTTNAT  CGCTTTAATA  NTAGTGCTGG  AAGACTTTCT
TGTTGATAGA  CCCGTTT

```

Klon S308 (619 bp)

```

-----GAA  AAAAAAGAA  GAGCAATTCA  TACCAGTCAT  TCACATAAAA  AGTATACATA
TAAGAAAATA  TTTGATCAAC  CTGTATTGCC  ATCCGTATTC  AGTACCAACA  GCCTCCGATT
TAATAGACAT  CGTCCAGCAT  CAGTCTCTGG  TTATTTGGAT  GAATGCGCAT  TAAACAGATC
ATATGATTTA  TACCCTGTAC  CAACTTCAGC  TAGACCAAGT  ACCAGTTTTG  GACATTTACA
TAATTCTAAA  CGTTTAAAAT  CACTGGAAAG  AGATTATTAT  ACATCTTGTC  AAAATTTAAG
TACAAAACCT  TACTCCACTG  TGAATTTGAA  TCGTCAACTA  AATCGACAAC  CTCATATTAT
TCACGCACAT  TCAGATCGTC  GTCTAAGAGA  TATGCAACAT  ACAAATTATT  TACGTCATGG
CAATCGTATG  GATAACGAAT  ATGAGCGAAT  TTATTTTCCT  CAATCATATT  CATCACATCA
TTTAAAAATT  CCGAAAAAAA  CATGTTTGGA  AAGTAGTCTA  GATCATATCA  ATCTTGAAGT
GGATCGNTTT  ACGAGAATGN  ATCAAATTTT  NAATCCATAA  ATTTAGNGNG  GTGGGATAAT
TNAACCCAAN  TTTAACAAAA  TAAACT

```

Klon S329 (630 bp)

```

-----ATC  TCAAGTACAA  GTCGTTGTTG  GACGATCACC  ATCAACGGAA  AAAAAAGAA
GAGCAATTCA  TACCAGTCAT  TCACATAAAA  AGTATACATA  TAAGAAAATA  TTTGATCAAC
CTGTATTGCC  ATCCGTATTC  AGTACCAACA  GCCTCCGATT  TAATAGACAT  CGTCCAGCAT
CAGTCTCTGG  TTATTTGGAT  GAATGCGCAT  TAAACAGATC  ATATGATTTA  TACCCTGTAC
CAACTTCAGC  TAGACCAAGT  ACCAGTTTTG  GACATTTACA  TAATTCTAAA  CGTTTAAAAT
CACTGGAAAG  AGATTATTAT  ACATCTTGTC  AAAATTTAAG  TACAAAACCT  TACTCCACTG
TGAAATTGAA  TCGTCAACTA  AATCGACAAC  CTCATATTAT  TCACGCACAT  TCAGATCGTC

```

GTCTAAGAGA	TATGCAACAT	ACAAAATTATT	TACGTCATGG	CAATCGTATG	GATAACGAAT
ATGAGCGAAT	TTATTTTTCCT	CATCATATTC	ATCACATCAT	TTAAAAATTNC	NGNAAAAACA
TGTTNGNAAG	TAGTCTAGAT	CATATCAATC	TTGAAAGTGG	TCGTTTACGA	AATNGTNTCA
ATTNTTAATC	CATAATNTTA	GGGGGTGGGA	NGATTAA		

Klon S340 (582 bp)

-----ATT	GGACGCTGAC	ATTCAAAAATC	ACATAACAAT	CTACCGTTCT	AGAGCTGATC
AGGACTTGGA	CGATGTTTTT	GAGCGACTAG	ATTCAGTCAA	ATGTGATCTC	GATGATGCTA
ACCAGATTTT	CCACATTCTT	CATCGTACTA	TTATGGGGAG	CAAATCAGAG	AAGCATTTTC
TGTCAATACT	ACAGCATTTT	CTTTTCATTC	GTGATGAGCC	TTATAGATTA	GCTTACTTTA
CTCTTCTGGA	AGAAGTGAAT	GGTCAAGTTA	TGATTCAGAA	TGATGGTGTG	GATCCTGATC
CGCATATGGA	CATTCTGCGC	CTGGATGTTG	AGAGTACTGT	CGCATTATTG	GTAGATGCAC
TAAAGGAAGC	TGACGCTTCA	ACTCGTGTG	AGGAGCTTCA	AGCTAAGTTA	GATGCCGCTC
TTCAAGCTAA	ATTAGAGGCA	GAAGCCAAAAG	TGCAAACATT	ACAAAGTCAT	TTGAGTTCGG
GAGACAGGTC	TACAATAAAG	CTTACTCCTG	ATATCTTACC	TCCCCNTTCG	TTAAGTTCAA
GTATACCACC	ACCTNCAGGC	ATTCTCTCAC	CACCACCTAT	GGGNGGGGG	

Klon S401 (507 bp)

-----GGA	AAAAAAAAAGA	AGAGCAATTC	ATACCAGTCA	TTCNCNTNAA	AAGTATANGG
NGGNGGAAAA	TATTTGATCA	ACCTGTATTG	CCATCCGTAT	TCAGTACCAA	CAGCCTCCGA
TTTAATAGAC	ATCGTCCAGC	ATCAGTCTCT	GGTTATTTGG	ATGAATGCGC	ATTAAACAGA
TCATATGATT	TATACCCTGT	ACCAACTTCA	GCTAGACCAA	GTACCAGTTT	TGGACATTTA
CATAATTCTA	AACGTTTTAAA	ATCACTGGAA	AGAGATTATT	ATACATCTTG	TCAAAATTTA
AGTACAAAAC	CTTACTCCAC	TGTGAAATTG	AATCGTCCAA	CTAAATCGAC	AACCTCATAT
TATTCACANGC	ACATTCAGAT	CGNCGTCTAA	GAGATATGGC	ANCATACAAA	TTATTTACGT
CATGGCAATC	GTNTGGGATA	ACGAATATGA	GCGAATTTNT	TTCTCTCAAT	CATATTTNAT
CACATNCATT	TTAAAAAATT	CCCGAAAAAA	CATG		

Klon S428 (779 bp)

----GGAGAC	AGGTCTACAA	TAAAGCTTAC	TCCTGATATC	TTACCTCCAC	CTTCGTTAAG
TTCAAGTATA	CCACCACCTC	CAGGCATTCC	TCCACCACCA	CCTATGGAGG	GTGTTCCCTCC
TCCTCCTCCT	CCTCCGCCAC	CACCACCACC	ACCACCCATG	GGAGGTATNC	CGCCACCACC
ACCGCCCATG	GGAAAGTATCC	CGCCACCACC	ACCGCCCATG	GGAGGTGTTT	CGCCACCCTCC
GCCGGGTTTC	CAGTCATCTA	AACCTCCGGA	CGAACTTCCCT	TTTGGTATGA	AACCAAAAAA
GAAATACACT	TTGGATGTCC	CTATGAAAAA	GGCCAATTGG	GAAAAAATTA	AGCCCAATAT
GCTTGATAAA	GACTCTGTCT	GGGTCCAAC	TCATGAGGAT	GAGCTTGAGT	ATGGGGATTT
GTTGAAAAAT	CTTAGTGCTC	AATTTAGCAC	AAAGCCAGCT	AANGTGATGG	TGCCTGAATC
TACATCAGAT	GGCGCANCTT	GCAGCTGGAA	ATCTAACAAAG	GNTATTCAAT	CTCGTAAGAC
NAAAAAAGCT	GANGNTATTT	TGGACGACAA	AGTGGNCTCA	AAATCTTGTC	GGATCTTNT
TTGGTTTCAC	TTTAAAAGGT	GCCCATTTTG	AATGANGCTT	TNNGTNNGGG	NGGTATTCCT
TAAACCTGGT	TTGNANNGAA	AAGGCTTTTTA	TTTAAANNTT	CCCAAATAA	NNGANTTANT
AAAGCCCAAC	NTTGGGTTTA	AAAGCCNCCT	TNCNNCCAAN	AAANCCTTTA	AATTGTTTNTT
TNT					

Klon S433 (488 bp)

----ACCTAT	GGAGGGTGTT	CCTCCTCCTC	CTCCTCCTCC	GNCACCACCA	CCACCACCAC
CCATGGGAGG	TATTTCCGCCA	CCACCACCGC	CCATGGGGAAG	TATCCCGCCA	CCACCACCGC
CCATGGGAGG	TGTTCCGCCA	CCTCCGCCGG	GTTTCCAGTC	ATCTAAACCT	CCGGGCGAAC
TTCTTTTTGG	TATGAAACCA	AAAAAGAAAT	ACACTTTGGA	TGTCCCTATG	AAAAAGGCCA
ATTGGGAAAA	AATTAAGCCC	AATATGCTTG	ATAAAGACTC	TGTCTGGGTC	CAACTTCATG
AGGATGAGCT	TGAGTATGGG	GATTTGTTGA	AAAATCTTAG	TGCTCAATTT	AGCGCAAAAG
CCAGCTAANG	TGATGGTGTC	TGATTCTACA	TCAGATGGCG	CAGCTGCAGC	TGGAAATCTA
CAAGGTATTC	AATCTCGTAA	NACGAAAAAG	CTGAGGTATT	TGGACGACGA	ANNGGCTCAA
AATCTGTCTGA	TT				

Klon S439 (704 bp)

-----GA	GGGACTAACA	TTTAGTGCGG	AACTTAATGG	GACACCAGAC	GAACGCTTCA
TGCCTTTAGT	TAAAGCCCTG	GATTGTCCTG	AAGTTGCGCG	GGCTTCGTTG	CAGTTTATTA
ATGTTCTAGT	GAACCGCAGT	TGTCTTGATG	AGAGCTCTTT	CGATATTGAC	TACAGGGTGC
ATTTACGGTG	TGAGTTTAAAT	AGTTTAGGAA	TTATTGAAAA	GCTTAACAAA	CTTGAAAATT
CATTGGACGC	TGACATTCAA	AATCACATAA	CAATCTACCG	TTCTAGAGCT	GATCAGGACT
TGGGCGATGT	TTTTGAGCGA	CTAGATTGAG	TCAAAATGTGA	TCTCGATGAT	GCTAACCAGA
TTTTCCACAT	TCTTCATCGT	ACTATTATGG	GGAGCAAATC	AGAGAAGCAT	TTTCTGTCAA
TACTACAGCA	TTTTCTTTTC	ATTCGTGATG	AGCCTTATAG	ATTAGCTTAC	TTTACTCTTC
TGGAAGAACT	GATTGGTCAA	GTTATGATTC	AGAATGATGG	TGTCGATCCT	GATCCGCATA
TGAACATTCT	GCGCCTGGAT	GTTGAGAGTA	CTGTCNCATT	ATTGGTAGAT	GCACTAAAAG
AAGCTGACGC	TTNCAACTCG	TGTTGGAGGA	GCTTCAAAGCT	AAGNTAAGA	TGCCGCTCTT
CAAGCTAAAT	TANAGGCAGA	ANGCCAAAGT	GCAAAACATTT	ACAAAGTCAT	TT

Klon S440 (672 bp)

-----ACCC	ATGGGAGGTA	TTCCGCCACC	ACCACCGCCC	ATGGGAAGTA	TCCCGCCACC
ACCACCGCCC	ATGGGAGGTG	TTCCGCCACC	TCCGCCGGGT	TTCCAGTCAT	CTAAACCTCC
GGACGAACTT	CCTTTTGGTA	TGAAACCAAA	AAAGAAATAC	ACTTTGGATG	TCCCTATGAA
AAAGGCCAAT	TGGGAAAAAA	TTAAGCCCAA	TATGCTTGAT	AAAGACTCTG	TCTGGGTCCA
ACTTCATGAG	GATGAGCTTG	AGTATGGGGA	TTTGTGAAA	AATCTTAGTG	CTCAATTTAG
CACAAAGCCA	GCTAAGGTGA	TGGTGTCTGA	TTCTACATCA	GATGGCGCAG	CTGCAGCTGG
AAATCTACAA	GGTATTCAAT	CTCGTAAGAC	GAAAAAGCTG	AGGTATTTGG	ACGACAAAGT
GGCTCAAAAT	CTGTGATTC	TTCTTGGTTC	ACTTAAAGTG	CCATATGATG	AGCTTCGTCG
GCGTATCCTA	ACTGTTGATG	AAAGCTTATT	AACTNCAAAAT	ATGTTAGAGC	AGCTGGTTAA
GCCCTCCCAA	AACCATCAGT	TATTTCAAAG	ATCAGTTCAC	TTAAAGATGA	ATATGANGNA
CTAGCGGAAN	CTGAACAATT	TGTGTGCAAG	TTAGTGATNT	NAGAAACTCN	NACCTAAACT
AATTCAATCC	TATTTAAA				

Klon S445 (742 bp)

-----AGATG	AGTCATTAAA	ACATAGATCT	CAAGTACAAG	TCGTTGTTGG	ACGATCACCA
TCAACGGAAA	AAAAAAGAAG	AGCAATTCAT	ACCAGTCATT	CACATAAAAA	GTATACATAT
AAGAAAATAT	TTGATCAACC	TGTATTGCCA	TCCGTATTCA	GTACCAACAG	CCTCCGATTT
AATAGACATC	GTCCAGCATC	AGTCTCTGGT	TATTTGGATG	AATGCGCATT	AAACAGATCA
TATGATTTAT	ACCCTGTACC	AACTTCAGCT	AGACCAAAGTA	CCAGTTTTGG	ACATTTACAT
AATTCTAAAC	GTTTAAAATC	ACTGGAAAAGA	GATTATTATA	CATCTTGTC	AAATTTAAGT
ACAAAACCTT	ACTCCACTGT	GAAATTGAAT	CGTCAACTAA	ATCGACAACC	TCATATTATT
CACGCACATT	CAGATCGTCG	TCTAAGAGAT	ATGCAACATA	CAAATTTATT	ACGTCATGGC
AATCGTATGG	ATAACGAATA	TGAGCGAATT	TATTTTCCTC	AATCATATTC	ATCACATCAT
TTAAAAATTC	CGGAAAAAAA	CATGTTTGGA	AAGTAGTCTA	GATCATATCA	ATCTTGAAGT
GGATCGTTTT	ACGAGAATTG	TATCAAATTA	TTTAAATCCC	ATAAAATANT	TAGGTGNGGT
TGNGGATNGA	TTTTAAAACC	CAAAANTTTT	TAAANCAAAA	AAATAAAACC	NTNTTTTGG
GGACCNGCNT	TTTNCNTTTT	TTTCTTT			

Klon S448 (740 bp)

----AGATGA	GTCATTAAAA	CATAGATCTC	AAGTACAAGT	CGTTGTTGGA	CGATCACCAT
CAACGGAAAA	AAAAAGAAGA	GCAATTCATA	CCAGTCATTC	ACATAAAAAAG	TATACATATA
AGAAAATATT	TGATCAACCT	GTATTGCCAT	CCGTATTCAG	TACCAACAGC	CTCCGATTTA
ATAGACATCG	TCCAGCATCA	GTCTCTGGTT	ATTTGGATGA	ATGCGCATTA	AACAGATCAT
ATGATTTATA	CCCTGTACCA	ACTTCAGCTA	GACCAAGTAC	CAGTTTTGGA	CATTTACATA
ATTCTAAACG	TTTTAAATCA	CTGGAAAAGAG	ATTATTATAC	ATCTTGTC	AATTTAAGTA
CAAAACCTTA	CTCCACTGTG	AAATTGAATC	GTCAACTAAA	TCGACAACCT	CATATTTATTC
ACGCACATTC	AGATCGTCGT	CTAAGAGATA	TGCAACATAC	AAATTTATTTA	CGTCATGGCA
ATCGTATGGA	TAACGAATAT	GAGCGAATTT	TATTTTTCCT	CAATCATATT	CATCACATCA
ATTTAAAAAT	TCCGGAAAAA	AACATGTTTG	GAAAGTAGNT	CTAGATCCAT	ATCAATNCTT
TGAAGTGGAT	CCGTTTACG	AGAATTGGTA	TTCAAAANTT	ATTTAAATCC	CATTTAAATA
TTTANCCGGT	GGTTGGNGGA	ANGAATTTNA	AAACCCAAAA	TTTTTTANAN	CACNAAATTT
AAAACCTTN	TTTNGGNACC	GGGC			

Klon 455 (662 bp)

```

-----GA  AAAAAAAAAA  AGAGCAATTC  ATACCAGTCA  TTCACATNAA  AAGTATACAT
ATAAGAAAAT  ATTTGATCAA  CCTGTATTGC  CATCCGTATT  CAGTACCAAC  AGCCTCCGAT
TTAATAGACA  TCGTCCAGCA  TCAGTCTTTG  GTTATTTGGA  TGAATGCGCA  TTAAACAGAT
CATATGATTT  ATACCCTGTA  CCAACTTCAG  CTAGACCAAG  TACCAGTTTT  GGACATTTAC
ATAATTCTAA  ACGTTTAAAA  TCACTGGAAA  GAGATTATTA  TACATCTTGT  CAAAATTTAA
GTACAAAACC  TTACTCCACT  GTGAAATTGA  ATCGTCAACT  AAATCGACAA  CCTCATATTA
TTCACGCACA  TTCAGATCGT  CGTCTAAGAG  ATATGCAACA  TACAAATTAT  TTACGTCATG
GCAATCGTAT  GGATAACGAA  TATGAGCGAA  TTTATTTTCC  TCAATCATAT  TCATCACATC
ATTTAAAAAT  TCCGGAAAAA  ACATGTTTGG  AAAGTAGTCT  AGATCATATC  AATCTTGAAG
TGGATCGTTT  ACGAGATTGN  ATCAAATTAT  TAAATCCATA  AATATTAGTG  TGTNNGANGA
TTTAAACCAA  ATTTAAACAA  AATAAAAAAN  TATGGACGNT  TTCCTTTTTT  TTTGGTCTTT
TTANAATACC

```

Klon S456 (519 bp)

```

-----GAAAA  AAAAAAGAAG  GCAATTCATA  CCAGTCATTT  CNCNTAAAAA  GTATACATAT
AAGAAAAATA  TTTGATCAAC  CCTGTATTGC  CATCCGTATT  CAGTACCAAC  AGCCTCCGAT
TTAATAGACA  TCGTCCAGCA  TCAGTCTTTG  GTTATTTGGA  TGAATGCGCA  TTAAACAGAT
CATATGATTT  ATACCCCTGT  ACCAACTTCA  GCTAGACCAA  GTACCAGTTT  TGGACATTTA
CATAATTCTA  AACGTTTAAA  ATCACTGGAA  AGAGATTATT  ATACATCTTG  TCAAAATTTA
AGTACAAAAC  CTTACTCCAC  TGTGAAATTG  AATCGTCAAC  TAAATCGACA  NCCTCATATT
ATTCACGCAC  ATTCANATCG  TCGTCTAAGA  AGATATGCAA  CATACAAATT  ATTTACGTCA
TGGCAATCGN  ATGGATACCG  ATATGAGCGA  ATTTATTTTC  CTCAANCATA  TTCATCACAT
CNTTTAAAAAT  TCCGNAAAAA  CATGTTNGNA  AGTAGTCNAA  TCTT

```

In Klammern ist jeweils die Länge des sequenzierten Bereichs angegeben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ein besonderes Merkmal des parasitären Trematoden *Schistosoma mansoni* ist die vom Männchen induzierte Entwicklung der weiblichen Reproduktionsorgane, die auf dem dauerhaften Paarungskontakt basiert. Hierbei ist das Vitellarium hervorzuheben, das im differenzierten Zustand Nährzellen produziert, die zusammen mit den Oozyten Bestandteil der Eier sind. Für die Induktion der Zellproliferation und der Synthese von Eischalenkomponenten im Vitellarium benötigen die Weibchen Signale vom Männchen. Werden die Männchen von den Weibchen getrennt, werden diese Prozesse eingestellt und als Konsequenz keine Eier mehr produziert. Die Re-Paarung mit einem Männchen hebt die Auswirkungen der Entpaarung auf.

Es wird postuliert, dass die Wachstums- und Differenzierungsprozesse im Vitellarium über Signaltransduktionskaskaden reguliert werden, die direkt oder indirekt von den Signalen des Männchens aktiviert werden. Um Hinweise darauf zu erlangen, ob eine der beiden Src-Tyrosinkinasen SmTK3 und SmTK5 oder die Syk-Tyrosinkinase SmTK4 eine zentrale Rolle in der Vitellarentwicklung einnimmt, wurden Lokalisationsstudien durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass SmTK3 gewebespezifisch u.a. im Vitellarium exprimiert wird und daher als möglicher Kandidat in Frage kommt. Die Transkriptionsorte der beiden anderen Tyrosinkinasen weisen weniger auf eine Beteiligung an der Vitellarentwicklung hin (SmTK5) bzw. schliessen sie aus (SmTK4).

Durch die Anwendung des Yeast-Two-Hybrid-Systems konnten mehrere putative Interaktionspartner von SmTK3 isoliert werden, die möglicherweise in die Steuerung von Zellteilungs- und Differenzierungsereignissen involviert sind. Dabei ist das Diaphanous-Protein SmDRF der interessanteste Kandidat. Diaphanous-Proteine verbinden das Aktin-Filamentsystem mit den Rho-GTPasen und sind dadurch wahrscheinlich essentiell für die GTPase-vermittelte Regulierung der Zytoskelett-Organisation.

Die selektive Inhibierung von Src-Tyrosinkinasen mit Herbimycin A resultierte in der Blockierung der mitotischen Aktivität im Weibchen, aber nicht im Männchen und beweist die Existenz eines weibchenspezifischen Signalweges, der die Zellproliferation im Vitellarium steuert. Herbimycin A reduziert ebenfalls die Eiproduktion, bewirkt aber eine erhöhte Expression des Eischalenproteins p14. Dieser scheinbare Widerspruch wird durch ein hypothetisches Modell erklärt.

Die Versuchsreihen mit Herbimycin A deuten darauf hin, dass Src-Tyrosinkinasen eine zentrale Rolle in der Steuerung von Zellproliferation und p14-Expression im Vitellarium einnehmen. Herbimycin A bindet *in vitro* an das SmTK3-Protein und blockiert daher vermutlich dessen enzymatische Aktivität *in vivo* bei Schistosomen. Im Zusammenhang mit den Lokalisations- und Interaktionsstudien liegen nun deutliche Hinweise auf eine zentrale Funktion von SmTK3 in der Vitellarentwicklung vor.

Die selektive Inhibierung von Syk-Tyrosinkinasen mit Piceatannol hat keine Auswirkungen auf die DNA-Synthese oder die p14-Transkription im murenen Weibchen. Damit wird die Vermutung bestätigt, dass SmTK4 keine zentrale Rolle in der Vitellarentwicklung einnimmt.

7. LITERATUR

- Abruzzi K.C., Magendantz M. & Solomon F. (2002) An alpha-Tubulin Mutant Demonstrates Distinguishable Functions Among the Spindle Assembly Checkpoint Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 161(3), 983-994.
- Abu-Amer Y., Ross F.P., Schlesinger P., Tondravi M.M. & Teitelbaum S.L. (1997) Substrate recognition by osteoclast precursors induces C-src/microtubule association. *J. Cell Biol.* 137(1), 247-258.
- Adams M.D. *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287(5461), 2185-2195.
- Afshar K., Stuart B. & Wasserman S.A. (2000) Functional analysis of the *Drosophila* diaphanous FH protein in early embryonic development. *Development* 127(9), 1887-1897.
- Ahringer J. (2000) NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet.* 16(8), 351-356.
- Akamatsu M., Aota S., Suwa A., Ueda K., Amachi T., Yamada K.M., Akiyama S.K. & Kioka N. (1999) Vinexin forms a signaling complex with Sos and modulates epidermal growth factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activities. *J. Biol. Chem.* 274(50), 35933-35937.
- Alberts A.S. (2001) Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J. Biol. Chem.* 276(4), 2824-2830.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J. D. (1995) *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage VCH Weinheim.
- Anderson B.L., Boldogh I., Evangelista M., Boone C., Greene L.A. & Pon L.A. (1998) The Src homology domain 3 (SH3) of a yeast type I myosin, Myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization. *J. Cell Biol.* 141(6), 1357-1370.
- Arning S., Gruter P., Bilbe G. & Kramer A. (1996) Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA. *RNA* 2(8), 794-810.
- Baek K.H. & Lee K.Y. (1999) Signal transduction pathway for anterior-posterior development in *Drosophila*. *J Biomed. Sci.* 6(5), 314-319.
- Barnett P., Bottger G., Klein A.T., Tabak H.F. & Distel B. (2000) The peroxisomal membrane protein Pex13p shows a novel mode of SH3 interaction. *EMBO J.* 19(23), 6382-6391.
- Basch P.F. (1988) *Schistosoma mansoni*: nucleic acid synthesis in immature females from single-sex infections, paired in vitro with intact males and male segments. *Comp. Biochem. Physiol. B* 90(2), 389-392.
- Beall M.J., McGonigle S. & Pearce E.J. (2000) Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF-beta signaling. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111(1):131-142.
- Bellier S., Dubois M.F., Nishida E., Almouzni G. & Bensaude O. (1997) Phosphorylation of the RNA polymerase II largest subunit during *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Mol. Cell Biol.* 17(3), 1434-1440.
- Belsches A.P., Haskell M.D. & Parsons S.J. (1997) Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis *Front. Biosci.* 2(d), 501-18.
- Bergquist R., Al-Sherbiny M., Barakat R. & Olds R. (2002) Blueprint for schistosomiasis vaccine development. *Acta Trop.* 82(2), 183-192.
- Bione S., Sala C., Manzini C., Arrigo G., Zuffardi O., Banfi S., Borsani G., Jonveaux P., Philippe C., Zuccotti M., Ballabio A. & Toniolo D. (1998) A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am. J. Hum. Genet.* 62(3), 533-541.
- Bishop A.L. & Hall A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348 (2), 241-255.

- Bobek L.A., Rekosh D.M. & LoVerde P.T. (1988) Small gene family encoding an eggshell (chorion) protein of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3008-3016.
- Boucheix C. & Rubinstein E. (2001) Tetraspanins. *Cell Mol. Life Sci.* 58(9), 1189-1205.
- Brachmann R.K. & Boeke J.D. (1997) Tag games in yeast: the two-hybrid system and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8(5), 561-568.
- Brown M.T. & Cooper J.A. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1287(2-3), 121-149.
- Buchheiser A. (2002) Versuche zur Herstellung und Charakterisierung transgener Schistosomen. (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplomarbeit).
- Bullock W.O., Fernandez J.M. & Short J.M. (1987) XL1-blue: A high efficiency transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-380.
- Castrillon D.H. & Wasserman S.A. (1994) Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development* 120(12), 3367-3377.
- Chang C.J. & Geahlen R.L. (1992) Protein-tyrosine kinase inhibition: mechanism-based discovery of antitumor agents. *J. Nat. Prod.* 55(11), 1529-1560.
- Chiariello M., Marinissen M.J. & Gutkind J.S. (2001) Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases. *Nat. Cell Biol.* 3(6), 580-586.
- Cimato T.R., Tang J., Xu Y., Guarnaccia C., Herschman H.R., Pongor S. & Aletta J.M. (2002) Nerve growth factor-mediated increases in protein methylation occur predominantly at type I arginine methylation sites and involve protein arginine methyltransferase 1. *J Neurosci. Res.* 67(4), 435-442.
- Clough E.R. (1981) Morphology and reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. *J. Parasitol.* 67, 535-539.
- Dai Z. & Pendergast A.M. (1995) Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.* 9(21), 2569-2582.
- Dai Z., Quackenbush R.C., Courtney K.D., Grove M., Cortez D., Reuther G.W. & Pendergast A.M. (1998) Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. *Genes Dev.* May 12(10), 1415-1424.
- Daigo Y., Suzuki K., Maruyama O., Miyoshi Y., Yasuda T., Kabuto T., Imaoka S., Fujiwara T., Takahashi E., Fujino M.A. & Nakamura Y. (1997) Isolation, mapping and mutation analysis of a human cDNA homologous to the doc-1 gene of the Chinese hamster, a candidate tumor suppressor for oral cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 20(2), 204-207.
- Davern K.M., Wright M.D., Herrmann V.R. & Mitchell G.F. (1991) Further characterisation of the *Schistosoma japonicum* protein Sj23, a target antigen of an immunodiagnostic monoclonal antibody. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48(1), 67-75.
- 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.* May 273(18), 11234-11240.
- Delaguillaumie A., Lagaudriere-Gesbert C., Popoff M.R. & Conjeaud H. (2002) Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 115(2), 433-443.
- De Mendonca R.L., Escriva H., Bouton D., Zelus D., Vanacker J.M., Bonnelye E., Cornette J., Pierce R.J. & Laudet V. (2000) Structural and functional divergence of a nuclear receptor of the RXR family from the trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Biochem.* 267(11), 3208-3219.

- Den Hollander J.E. & Erasmus, D.A. (1984) *Schistosoma mansoni*: DNA synthesis in males and females from mixed and single-sex infections. *Parasitol.* 88, 463-476.
- Den Hollander J.E. & Erasmus, D.A. (1985) *Schistosoma mansoni*: male stimulation and DNA synthesis by the female. *Parasitol.* 91, 449-457.
- Ding J., Takano T., Gao S., Han W., Noda C., Yanagi S. & Yamamura H. (2000) Syk is required for the activation of Akt survival pathway in B cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 275(40), 30873-30877.
- Dolbeare F. & Selden J.R. (1994) Immunochemical quantitation of bromodeoxyuridine: application to cell-cycle kinetics. *Methods Cell Biol.* 41, 297-316.
- Donnelly S.F., Pocklington M.J., Pallotta D. & Orr E. (1993) A proline-rich protein, verprolin, involved in cytoskeletal organization and cellular growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 10(3), 585-596.
- Duffy J.B. & Perrimon N. (1996) Recent advances in understanding signal transduction pathways in worms and flies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8(2):231-238.
- Duvaux-Miret O., Baratte B., Dissous C. & Capron A. (1991) Molecular cloning and sequencing of the alpha-tubulin gene from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49(2), 337-340.
- Erasmus D.A. (1973) A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 67(2), 165-183.
- Escriva H., Safi R., Hanni C., Langlois M.C., Saumitou-Laprade P., Stehelin D., Capron A., Pierce R. & Laudet V. (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(13), 6803-6808.
- Evangelista M., Blundell K., Longtine M.S., Chow C.J., Adames N., Pringle J.R., Peter M. & Boone C. (1997) Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276(5309), 118-122.
- Fan J., Hooker C.W., McManus D.P. & Brindley P.J. (1997) A new member of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) of proteins from schistosomes, expressed by larval and adult *Schistosoma japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1329(1), 18-25.
- Fan J. & Brindley P.J. (1998) Characterization of cDNAs encoding a new family of tetraspanins from schistosomes—the Sj25 family. *Gene* 219(1-2); 1-8.
- Fantappie M.R., Freebern W.J., Osman A., LaDuca J., Niles E.G. & LoVerde P.T. (2001) Evaluation of *Schistosoma mansoni* retinoid X receptor (SmRXR1 and SmRXR2) activity and tissue distribution. *Mol Biochem Parasitol.* 115(1), 87-99.
- Feinberg A.P. & Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1), 6-13.
- Fields S. & Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230), 245-246.
- Flick J.S. & Johnston M. (1990) Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 10(9), 4757-4769.
- Freebern W.J., Osman A., Niles E.G., Christen L. & LoVerde P.T. (1999a) Identification of a cDNA encoding a retinoid X receptor homologue from *Schistosoma mansoni*. Evidence for a role in female-specific gene expression. *Biol. Chem.* 274(8), 4577-4585.
- Freebern W.J., Niles E.G. & LoVerde P.T. (1999b) RXR-2, a member of the retinoid x receptor family in *Schistosoma mansoni*. *Gene* 233(1-2), 33-38.
- Fresno Vara J.A., Caceres M.A., Silva A. & Martin-Perez J. (2001) Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* 12(7), 2171-2183.

- Fukazawa H., Li P.M., Yamamoto C., Murakami Y., Mizuno S. & Uehara Y. (1991) Specific inhibition of cytoplasmic protein tyrosine kinases by herbimycin A in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 42(9):1661-1671.
- Fukazawa H., Uehara Y., Murakami Y., Mizuno S., Hamada M. & Takeuchi T. (1994) Labeling of v-Src and BCR-ABL tyrosine kinases with [¹⁴C]herbimycin A and its use in the elucidation of the kinase inactivation mechanism. *FEBS Lett.* 340(3), 155-158.
- Fujio Y., Yamada F., Takahashi K. & Shibata N. (1993) Responses of smooth muscle cells to platelet-derived growth factor are inhibited by herbimycin-A tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195(1), 79-83.
- Geahlen R.L. & McLaughlin J.L. (1989) Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165(1), 241-245.
- Gietz R.D. & Woods R.A. (2002) Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol. Biol.* 185, 471-486.
- Gomperts B.D. (2002) *Signal Transduction*. Academic Press.
- Gratzner H.G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218, 474-475.
- Grevelding C.G. (1995) The female-specific W1 sequence of the Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* occurs in both genders of a Liberian strain. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71(2):269-272.
- Grevelding C.G., Sommer G. & Kunz W. (1997) Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. *Parasitol.* 115, 635-640.
- Haas M., Wang H., Tian J. & Xie Z. (2002) Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 277(21), 18694-18702.
- Haider S.R., Juan G., Traganos F. & Darzynkiewicz Z. (1997) Immunoseparation and immunodetection of nucleic acids labeled with halogenated nucleotides. *Exp. Cell Res.* 234(2), 498-506.
- Hamdan F.F., Abramovitz M., Mousa A., Xie J., Durocher Y. & Ribeiro P. (2002) A novel *Schistosoma mansoni* G protein-coupled receptor is responsive to histamine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119(1), 75-86.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4), 557-580.
- Hanks S.K. & Quinn A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* 200, 38-62.
- Hanks S.K., Quinn A.M. & Hunter T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241(4861), 42-52.
- Hao D. & Rowinsky E.K. (2002) Inhibiting signal transduction: recent advances in the development of receptor tyrosine kinase and Ras inhibitors. *Cancer Invest.* 20(3), 387-404.
- Harlow E. & Lane D. (1989) *Antibodies. A Laboratory Manual*. CSH.
- Harwood A.J. (2002) Signal transduction in development: holding the key. *Dev. Cell* 2(4):384-385.
- Haseeb M.A., Eveland L.K. & Fried B. (1985) The uptake, localization and transfer of [4-¹⁴C]cholesterol in *Schistosoma mansoni* males and females maintained in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.* 82(2), 421-423.
- Hemler M.E. (2001) Specific tetraspanin functions. *J. Cell Biol.* 155(7), 1103-1107.
- Hillyer G.V. (1974) Buoyant density and thermal denaturation profiles of schistosome DNA. *J. Parasitol.* 60, 725-727.

- Hobson S.A., McNeil S.E., Lee F. & Rodland K.D. (2000) Signal transduction mechanisms linking increased extracellular calcium to proliferation in ovarian surface epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 258(1), 1-11.
- Hubbard S.R. & Till J.H. (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 373-398.
- Iltzsch M.H., Bieber D., Vijayasathy S., Webster P., Zurita M., Ding J. & Mansour T.E. (1992) Cloning and characterization of a cDNA coding for the alpha-subunit of a stimulatory G protein from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 267(20):14504-14508.
- Ishizaki T., Morishima Y., Okamoto M., Furuyashiki T., Kato T. & Narumiya S. (2001) Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat. Cell Biol.* 3(1), 8-14.
- James P., Halladay J. & Craig E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144(4), 1425-1436.
- Jass J.R. & Walsh M.D. (2001) Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J. Cell Mol. Med.* 5(3), 327-351.
- Jiang K., Zhong B., Gilvary D.L., Corliss B.C., Vivier E., Hong-Geller E., Wei S. & Djeu J.Y. (2002) Syk regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. *J. Immunol.* 168(7), 3155-3164.
- Johnson K.S, Taylor D.W. & Cordingley J.S. (1987) Possible eggshell protein gene from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22, 89-100.
- Johnston D.A., Blaxter M.L., Degraeve W.M., Foster J., Ivens A.C. & Melville S.E. (1999) Genomics and the biology of parasites. *BioEssays* 21, 131-147.
- Jow F. & Wang K.. (2000) Cloning and functional expression of rKCNQ2 K(+) channel from rat brain. *Mol. Brain Res.* 80(2), 269-278.
- Juang J.L. & Hoffmann F.M. (1999) *Drosophila* abelson interacting protein (dAbl) is a positive regulator of abelson tyrosine kinase activity. *Oncogene* 18(37), 5138-5147.
- Juhola M.K., Shah Z.H., Grivell L.A. & Jacobs H.T. (2000) The mitochondrial inner membrane AAA metalloprotease family in metazoans. *FEBS Lett.* 481(2), 91-95.
- Kampkotter A., Ridgers I., Johnston D.A., Rollinson D., Kunz W. & Grevelding C.G. (1999) *Schistosoma mansoni*: cloning and characterization of the Ras homologue. *Exp. Parasitol.* 91(3), 280-283.
- Kang C.D., Do I.R., Kim K.W., Ahn B.K., Kim S.H., Chung B.S., Jhun B.H. & Yoo M. (1999) Role of Ras/ERK-dependent pathway in the erythroid differentiation of K562 cells. *Exp. Mol. Med.* 31(2):76-82.
- Kang Q., Cao Y. & Zolkiewska A. (2000) Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem. J.* 352 (3), :883-892.
- Kapp K. (2000) *Schistosoma mansoni*: Charakterisierung von zwei Tyrosin-Kinasen und Ansätze zur Etablierung eines Gentransfer-Systems (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation).
- Kapp K., Schussler P., Kunz W. & Grevelding C.G. (2001) Identification, isolation and characterization of a Fyn-like tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 122(3), 317-327.
- Kapuscinski J. (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem.* 70(5), 220-233.
- Kapuscinski J. & Szer W. (1979) Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 6, 3519-3534.
- Kapuscinski J & Yanagi K. (1979) Selective staining by 4', 6-diamidine-2-phenylindole of nanogram quantities of DNA in the presence of RNA on gels. *Nucleic Acids Res.* 6(11), 3535-4352.
- Kato T., Watanabe N., Morishima Y., Fujita A., Ishizaki T. & Narumiya S. (2001) Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *J. Cell Sci.* 114(4), 775-784.

- Kay B.K., Williamson M.P. & Sudol M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14(2), 231-241.
- Kessler C. (1992) *Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules*. Springer Laboratory.
- Kieffer F., Elmayan T., Rubier S., Simon-Plas F., Dagher M.C. & Blein J.P. (2000) Cloning of Rac and Rho-GDI from tobacco using an heterologous two-hybrid screen. *Biochimie* 82(12), 1099-1105.
- Kim B.Y., Ahn S.C., Oh H.K., Lee H.S., Mheen T.I., Rho H.M. & Ahn J.S. (1995) Inhibition of PDGF-induced phospholipase D but not phospholipase C activation by herbimycin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212(3), 1061-1067.
- Klein C., Kramer E.M., Cardine A.M., Schraven B., Brandt R. & Trotter J. (2002) Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J. Neurosci.* 22(3), 698-707.
- Klochendler-Yeivin A., Muchardt C. & Yaniv M. (2002) SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12(1), 73-79.
- Knobloch J., Winnen R., Quack M., Kunz W. & Grevelding C.G. (2002) A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene* (in press).
- Koster B., Dargatz H., Schroder J., Hirzmann J., Haarmann C., Symmons P., Kunz W. (1988) Identification and localisation of the products of a putative eggshell precursor gene in the vitellarium of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31(2):183-198.
- Krebs A., Rothkegel M., Klar M. & Jockusch B.M. (2001) Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 114(20), 3663-3672.
- Kunz W. (2001) Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. *Parasitol. Today* 17, 227-231.
- Kunz W., Gohr L., Grevelding C., Schussler P., Sommer G., Menrath M. & Michel A. (1995) *Schistosoma mansoni*: control of female fertility by the male. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90(2), 185-189.
- Kurabayashi T., Iwasaki K., Uchiyama H., Nakamura K., Tanaka H. & Yagi O. (1997) Characteristics of *Escherichia coli* HB101 and *Pseudomonas putida* PpY101 harboring a recombinant plasmid with tandem insertion of the mercury resistance operon. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61(7), 1187-1189.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langlais P., Dong L.Q., Hu D. & Liu F. (2000) Identification of Grb10 as a direct substrate for members of the Src tyrosine kinase family. *Oncogene* 19(25), 2895-2903.
- Larbolette O., Wollscheid B., Schweikert J., Nielsen P.J. & Wienands J. (1999) SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Mol. Cell Biol.* 19(2), 1539-1546.
- Larson S.M., Di Nardo A.A. & Davidson A.R. (2000) Analysis of covariation in an SH3 domain sequence alignment: applications in tertiary contact prediction and the design of compensating hydrophobic core substitutions. *J. Mol. Biol.* 303(3), 433-446.
- Larson S.M. & Davidson A.R. (2000) The identification of conserved interactions within the SH3 domain by alignment of sequences and structures. *Protein Sci.* 9(11), 2170-2180.
- Lee K.W., Shalaby K.A., Medhat A.M., Shi H., Yang Q., Karim A.M. & LoVerde P.T. (1995) *Schistosoma mansoni*: characterization of the gene encoding Sm23, an integral membrane protein. *Exp. Parasitol.* 80(1), 155-158.
- Leonhard K., Stiegler A., Neupert W. & Langer T. (1999) Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature* 398(6725), 348-351.

- Levi G., Koteliensky V. & Thiery J.P. (1991) Muscle differentiation in *Xenopus laevis* is characterized by particular states of vinculin phosphorylation. C. R. Acad. Sci. 313(12), 537-43.
- Levitcki A. (1992) Tyrophostins: tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissectors of signal transduction. FASEB J. 6(14), 3275-3282.
- Levitcki A. (1999) Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. Pharmacol. Ther. 82(2-3), 231-239.
- Li Y., Ren J., Yu W., Li Q., Kuwahara H., Yin L., Carraway K.L. 3rd & Kufe D. (2001) The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. J. Biol. Chem. 276(38):35239-35242.
- Lin M.S., Comings D.E. & Alfi O.S. (1977) Optical Studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. Chromosoma 60, 15-25.
- Lodish H. (2001) Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akad. Vlg., Hdg. 4. Auflage.
- Loeffler I.K. & Bennett J.L. (1996) A rab-related GTP-binding protein in *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 77(1):31-40.
- Lupas A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. Trends Biochem. Sci. 21(10), 375-382.
- Lutz M.P., Esser I.B., Flossmann-Kast B.B., Vogelmann R., Luhrs H., Friess H., Buchler M.W. & Adler G. (1998) Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 243(2), 503-508.
- Lynch E.D., Lee M.K., Morrow J.E., Welcsh P.L., Leon P.E. & King M.C. (1997) Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene diaphanous. Science 278(5341), 1315-1318.
- Maekawa M., Toyama Y., Yasuda M., Yagi T. & Yuasa S. (2002) Fyn tyrosine kinase in Sertoli cells is involved in mouse spermatogenesis. Biol. Reprod. 66(1), 211-21.
- Maecker H.T., Todd S.C. & Levy S. (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. FASEB J. 11(6), 428-442.
- Mansir A. & Justine J.L. (1998) The microtubular system and posttranslationally modified tubulin during spermatogenesis in a parasitic nematode with amoeboid and aflagellate spermatozoa. Mol Reprod. Dev. 49(2), 150-167.
- Matrougui K., Eskildsen-Helmond Y.E., Fiebeler A., Henrion D., Levy B.I., Tedgui A. & Mulvany M.J. (2000) Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. Hypertension 36(4), 617-621.
- Matten W.T., Aubry M., West J. & Maness P.F. (1990) Tubulin is phosphorylated at tyrosine by pp60c-src in nerve growth cone membranes. J. Cell Biol. 111(5), 1959-1970.
- Mayer B.J. & Eck M.J. (1995) SH3 domains. Minding your p's and q's. Curr. Biol. 5(4):364-367.
- Mayer B.J. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. J. Cell Sci. 114(7), 1253-1263.
- McCluskey A., Sim A.T. & Sakoff J.A. (2002) Serine-threonine protein phosphatase inhibitors: development of potential therapeutic strategies. J Med Chem Mar 14;45(6):1151-1175.
- McLaren D. (1980) *Schistosoma mansoni*: The Parasite Surface in Relation to Host Immunity. John Wiley and Sons Ltd. Chichester.
- Mehlhorn H. & Piekarski G. (2002) Grundriß der Parasitenkunde. Spektrum Akad. Verlag. 6. Auflage.
- Menrath M. (1989) Epitopkartierung eines Eischalengens von *Schistosoma mansoni* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplomarbeit).

- Menrath M., Michel A. & Kunz W. (1995) A female-specific cDNA sequence of *Schistosoma mansoni* encoding a mucin-like protein that is expressed in the epithelial cells of the reproductive duct. *Parasitol.* 111 (4), 477-483.
- Migita K., Eguchi K., Kawabe Y., Mizokami A., Tsukada T. & Nagataki S. (1994) Prevention of anti-CD3 monoclonal antibody-induced thymic apoptosis by protein tyrosine kinase inhibitors. *J. Immunol.* 153(8):3457-3465.
- Mongioli A.M., Romano P.R., Panni S., Mendoza M., Wong W.T., Musacchio A., Cesareni G. & Di Fiore P.P. (1999) A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J.* 18(19), 5300-5309.
- Murakami Y., Fukazawa H., Mizuno S. & Uehara Y. (1998) Effect of herbimycin A on tyrosine kinase receptors and platelet derived growth factor (PDGF)-induced signal transduction. *Biol. Pharm. Bull.* 21(10), 1030-1035.
- Musgrave B.L., Phu T., Butler J.J., Makrigiannis A.P. & Hoskin D.W. (1999) Murine TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) expression induced by T cell activation is blocked by rapamycin, cyclosporin A, and inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and protein tyrosine kinases: evidence for TRAIL induction via the T cell receptor signaling pathway. *Exp. Cell Res.* 252(1), 96-103.
- Nishimura A., Morita M., Nishimura Y. & Sugino Y. (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* 18(20), 6169.
- Nobori T., Hexdall L.E. & Carson D.A. (1989) cDNA sequence of human ribosomal protein L31. *Nucleic Acids Res.* 17(17), 7105.
- Obaya A.J., Mateyak M.K. & Sedivy J.M. (1999) Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* 18(19), 2934-2941.
- Oliveira G.C. & Kemp W.M. (1995) Cloning of two actin genes from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75(1), 119-122.
- Oliver J.M., Burg D.L., Wilson B.S., McLaughlin J.L. & Geahlen R.L. (1994) Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J. Biol. Chem.* 269(47), 29697-29703.
- Osman A., Niles E.G. & LoVerde P.T. (1999) Characterization of the Ras homologue of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100(1):27-41.
- Osman A., Niles E.G. & LoVerde P.T. (2001) Identification and characterization of a Smad2 homologue from *Schistosoma mansoni*, a transforming growth factor-beta signal transducer. *J. Biol. Chem.* 276(13), 10072-10082.
- Palecek J. & Ubbels G.A. (1997) Dynamic changes in the tubulin cytoskeleton during oogenesis and early development in the anuran amphibian *Xenopus laevis* (Daudin). *Folia Histochem. Cytobiol.* 35(1), 3-18.
- Pardon R.S. & Noel F. (1994) Heterogeneity of ouabain binding sites in *Schistosoma mansoni*. First evidence for the presence of two (Na⁺ + K⁺)-ATPase isoforms in platyhelminths. *Biochem. Pharmacol.* 47(2), 331-336.
- Park C., Choi Y. & Yun Y. (1998) Son of sevenless binds to the SH3 domain of src-type tyrosine kinase. *Mol. Cells* 8(5), 518-523.
- Peters J.D., Furlong M.T., Asai D.J., Harrison M.L. & Geahlen R.L. (1996) Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates alpha-tubulin on tyrosine. *J. Biol. Chem.* 271(9), 4755-4762.
- Petersen J., Nielsen O., Egel R. & Hagan I.M. (1998) FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *J. Cell. Biol.* 141(5), 1217-1228.
- Polkowski K. & Mazurek A.P. (2000) Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol. Pharm.* 57(2):135-155.
- Popiel I. & Basch P.F. (1984) Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (*Digenea: Schistosomatidae*) following bisexual pairing of worms and worm segments. *J. Exp. Zool.* 232, 141-150.

- Popiel I., Cioli D. & Erasmus D.A. (1984) The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *Int. J. Parasitol.* 14, 183-190.
- Popiel I. (1986) Male-stimulated female maturation in *Schistosoma*: a review. *J. Chem. Ecol.* 12, 1745-1754.
- Popiel I. & Basch P.F. (1986) *Schistosoma mansoni*: cholesterol uptake by paired and unpaired worms. *Exp. Parasitol.* 61(3):343-347.
- Psichari E., Balmain A., Plows D., Zoumpourlis V. & Pintzas A. (2002) High Activity of Serum Response Factor in the Mesenchymal Transition of Epithelial Tumor Cells Is Regulated by RhoA Signaling. *J. Biol. Chem.* 277(33), 29490-29495.
- Puceat M., Roche S. & Vassort G.. (1998) Src family tyrosine kinase regulates intracellular pH in cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* 141(7), 1637-1646.
- Quack M. (1997) Identifizierung und Charakterisierung eines Rezeptor-Tyrosinkinase-Klons bei *Schistosoma mansoni* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplomarbeit).
- Ramachandran H., Skelly P.J. & Shoemaker C.B. (1996) The *Schistosoma mansoni* epidermal growth factor receptor homologue, SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83(1), 1-10.
- Resh M.D. (1994) Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76(3), 411-413.
- Rickles R.J., Botfield M.C., Zhou X.M., Henry P.A., Brugge J.S. & Zoller M.J. (1995) Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(24), 10909-10913.
- Robzyk K. & Kassir Y. (1992) A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res.* 20(14), 3790.
- Rodesch C., Pettus J. & Nagoshi R.N. (1997) The *Drosophila* ovarian tumor gene is required for the organization of actin filaments during multiple stages in oogenesis. *Dev. Biol.* 190(2), 153-164.
- Rollinson D. & Simpson A.J.G. (1987) *The Biology of Schistosomes - From Genes to Latrines*. Academic Press.
- Ross A.G., Bartley P.B., Sleigh A.C., Olds G.R., Li Y., Williams G.M. & McManus G.P. (2002) Schistosomiasis. *N. Engl. J. Med.* 346, 1212-1220.
- Roulier E.M., Panzer S. & Beckendorf S.K. (1998) The Tec29 tyrosine kinase is required during *Drosophila* embryogenesis and interacts with Src64 in ring canal development. *Mol. Cell* 1(6), 819-829.
- Rudiger M. (1998) Vinculin and alpha-catenin: shared and unique functions in adherens junctions. *Bioessays* 20(9), 733-740.
- Sada K., Takano T., Yanagi S. & Yamamura H. (2001) Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biochem. (Tokyo)* 130(2), 177-186.
- Saier M.H. Jr & Reizer J. (1990) Domain shuffling during evolution of the proteins of the bacterial phosphotransferase system. *Res. Microbiol.* 141(9), 1033-1038.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning I-III*. 2nd edition.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24, 104-8.
- Schlaepfer D.D., Jones K.C. & Hunter T. (1998) Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol. Cell Biol.* 18(5), 2571-2585.

- Schumacher C., Knudsen B.S., Ohuchi T., Di Fiore P.P., Glassman R.H. & Hanafusa H. (1995) The SH3 domain of Crk binds specifically to a conserved proline-rich motif in Eps15 and Eps15R. *J. Biol. Chem.* 270(25), 15341-15347.
- Schussler P. (1997) Identifizierung und Charakterisierung von Signaltransduktionsmolekülen bei *Schistosoma mansoni* und ihre Beteiligung an der Weibchen-Männchen-Interaktion (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation).
- Schussler P., Grevelding C.G. & Kunz W. (1997) Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction. *Parasitol.* 115 (6), 629-634.
- Schwartzberg P.L. (1998) The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* 17(11 Reviews), 1463-1468.
- Sefton B.M., Hunter T., Ball E.H. & Singer S.J. (1981) Vinculin: a cytoskeletal target of the transforming protein of *Rous sarcoma* virus. *Cell* 24(1), 165-174.
- Shoemaker C.B., Ramachandran H., Landa A., dos Reis M.G. & Stein L.D. (1992) Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53(1-2), 17-32.
- Shiotsu Y., Neckers L.M., Wortman I., An W.G., Schulte T.W., Soga S., Murakata C., Tamaoki T. & Akinaga S. (2000) Novel oxime derivatives of radicicol induce erythroid differentiation associated with preferential G(1) phase accumulation against chronic myelogenous leukemia cells through destabilization of Bcr-Abl with Hsp90 complex. *Blood* 96(6), 2284-2291.
- Short J.M., Fernandez J.M., Sorge J.A. & Huse W.D. (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16(15):7583-7600.
- Short R.B. (1951) Sex studies on *Schistosomatium douthitti* (Cort, 1914) Price, 1931 (*Trematoda: Schistosomatidae*). *American Midland Naturalist* 47, 139-145.
- Silveira A.M., Friche A.A. & Rumjanek F.D. (1986) Transfer of [¹⁴C] cholesterol and its metabolites between adult male and female worms of *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 85(4):851-857.
- Soede R.D., Wijnands Y.M., Van Kouteren-Cobzaru I. & Roos E. (1998) ZAP-70 tyrosine kinase is required for LFA-1-dependent T cell migration. *J. Cell Biol.* 142(5), 1371-1379.
- Steele R.E., Stover N.A. & Sakaguchi M. (1999) Appearance and disappearance of Syk family protein-tyrosine kinase genes during metazoan evolution. *Gene* 239(1), 91-97.
- Sudarsanam P. & Winston F. (2000) The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control *Trends Genet.* 16(8), 345-351.
- Suga H., Katoh K. & Miyata T. (2001) Sponge homologs of vertebrate protein tyrosine kinases and frequent domain shufflings in the early evolution of animals before the parazoan-eumetazoan split. *Gene* 280(1-2), 195-201.
- Superti-Furga G. & Courtneidge S.A. (1995) Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *Bioessays* 17(4), 321-330.
- Tan P.B. & Kim S.K. (1999) Signaling specificity: the RTK/RAS/MAP kinase pathway in metazoans. *Trends Genet.* 15(4), 145-149.
- Tatosyan A.G. & Mizenina O.A. (2000) Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 65(1), 49-58.
- Theurkauf W.E., Smiley S., Wong M.L. & Alberts B.M. (1992) Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* 115(4), 923-936.
- Thomas S.M. & Brugge J.S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513-609.

- Thornton J.W. & DeSalle R. (2000) Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 41-73.
- Tominaga T., Sahai E., Chardin P., McCormick F., Courtneidge S.A. & Alberts A.S. (2000) Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. *Mol. Cell* 5(1), 13-25.
- Traxler P., Furet P., Mett H., Buchdunger E., Meyer T. & Lydon N. (1997) Design and synthesis of novel tyrosine kinase inhibitors using a pharmacophore model of the ATP-binding site of the EGF-R. *J. Pharm. Belg.* 52(2):88-96.
- Turner M., Schweighoffer E., Colucci F., Di Santo J.P. & Tybulewicz V.L. (2000) Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol. Today* 21(3), 148-154.
- Uehara Y., Murakami Y., Mizuno S. & Kawai S. (1988) Inhibition of transforming activity of tyrosine kinase oncogenes by herbimycin A. *Virology* 164(1), 294-298.
- Uehara Y. & Fukazawa H. (1991) Use and selectivity of herbimycin A as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol.* 201, 370-379.
- Vaduva G., Martin N.C. & Hopper A.K. (1997) Actin-binding verprolin is a polarity development protein required for the morphogenesis and function of the yeast actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 139(7), 1821-1833.
- Veillette A., Dumont S. & Fournel M. (1993) Conserved cysteine residues are critical for the enzymatic function of the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *J. Biol. Chem.* 268(23), 17547-17553.
- Wang B.H., Lu Z.X. & Polya G.M. (1998) Inhibition of eukaryote serine/threonine-specific protein kinases by piceatannol. *Planta Med.* 64(3):195-199.
- Wasserman S. (1998) FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol.* 8(3), 111-115.
- Watson C.A., Sauman I. & Berry S.J. (1993) Actin is a major structural and functional element of the egg cortex of giant silkmoths during oogenesis. *Dev. Biol.* 155(2), 315-323.
- Weber-Nordt R.M., Mertelsmann R. & Finke J. (1998) The JAK-STAT pathway: signal transduction involved in proliferation, differentiation and transformation. *Leuk. Lymphoma* 28(5-6), 459-467.
- Wilkinson D.G. (1994) *In Situ Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.
- Wilkinson M, Duskow J & Lindsey S. (1991) RNA blots: staining procedures and optimization of conditions. *Nucleic Acids Res.* 19(3), 679.
- Winnen R. (1999) Charakterisierung von Signaltransduktionsmolekülen der Zelldifferenzierung und Ansätze zur Identifizierung einer Acetylcholinesterase bei *Schistosoma mansoni* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation).
- Wippersteg V., Kapp K., Kunz W., Jackstadt W.P., Zahner H. & Grevelding C.G. (2002) HSP70-controlled GFP expression in transiently transformed schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120(1), 141-150.
- Wright M.D., Henkle K.J. & Mitchell G.F. (1990) An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumor-associated antigen. *J. Immunol.* 144(8), 3195-3200.
- Yan R., Rychlik W., Etchison D. & Rhoads R.E. (1992) Amino acid sequence of the human protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma. *J. Biol. Chem.* 267(32), 23226-23231.
- Yanagi S., Inatome R., Takano T. & Yamamura H. (2001) Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288(3), 495-498.
- Yang E.B., Zhang K., Cheng L.Y. & Mack P. (1998) Butein, a specific protein tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245(2), 435-438.
- Zhang Y., Iratni R., Erdjument-Bromage H., Tempst P. & Reinberg D. (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89(3), 357-364.

Zhu W., Foehr M., Jaynes J.B. & Hanes S.D. (2001) *Drosophila* SAP18, a member of the Sin3/Rpd3 histone deacetylase complex, interacts with Bicoid and inhibits its activity. *Dev. Genes Evol.* 211(3), 109-117.

8. ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

Allgemeine Abkürzungen:

3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol	GBD	<i>Rho-binding domain</i>
A	Adenin	GDI	<i>GDP dissoziation inhibitor</i>
AAA-Proteine	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>	GDP	Guanidin-5'-diphosphat
Abb.	Abbildung	GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
Abi-GP	<i>Abi gene product</i>	G-Protein	GTP-bindendes Protein
AcNr.	<i>accession number</i> (NCBI, Medline)	GTP	Guanidin-5'-triphosphat
AD	<i>activation domain</i>	Gu	Guanidinium
[$\alpha^{32}\text{P}$]dATP	[^{32}P] markiertes dATP	HCl	Salzsäure
[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP	[^{32}P] markiertes dCTP	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
Amp	Ampicillin	HRE	<i>hormone response elements</i>
AP	Alkalische Phosphatase	incl.	inklusive
APS	Ammoniumperoxydisulfat	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
AS	Aminosäure(n)	ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	JAK2	<i>janus-kinase 2</i>
BD	<i>binding domain</i>	Kap.	Kapitel
BrdU	5'-Brom-2-desoxyuridin	Konz.	Konzentration
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>	KTR	Kontrolle
Bsp.	Beispiel	lacZ	β -Galaktosidase-Strukturgen
bzgl.	bezüglich	λ	Bakteriophage λ
C	Cytosin	LB-Medium	Luria-Broth-Medium
ca.	circa	LPA	<i>lysophosphatidic acid</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	LD-PCR	<i>long distance PCR</i>
CDK2	Cyclin-abhängige Kinase 2	Lsg.	Lösung
cfu	<i>colony forming unit</i>	Ma	Marker
CIID	<i>C-terminal intramolekular interaction domain</i>	MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid	max.	maximal
DEPC	Diethylpyrocarbonat	MCS	<i>multiple cloning site</i>
d.h.	das heißt	MeOH	Methanol
dH ₂ O	deionisiertes Wasser	mod.	modifiziert
DMSO	Dimethylsulfoxid	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NK	Negativkontrolle
cDNA	complementäre DNA	NS	Nukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease	ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	ORF	<i>open reading frame</i>
DRF	<i>Diaphanous-related Formin</i>	OT	Objektträger
ds DNA	doppelsträngige DNA	PAA	Polyacrylamid
DTT	Dithiothreitol	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
EcR	Ecdyson-Rezeptor	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	PEG	Polyethylenglycol
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>	pers.	persönliche
etc.	et cetera	PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
EtBr	Ethidiumbromid	PKA	Proteinkinase A
EtOH	Ethanol	PKC	Proteinkinase C
Fa.	Firma	POF	<i>premature ovarian failure</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>	Pos.	Position
FCS	<i>fetal calf serum</i>	PTK	Protein-Tyrosinkinase
FH (1, 2, 3)	<i>formin homology (1, 2, 3) region</i>	RBD	<i>Rho-binding domain</i>
G	Gruppe	RNA	Ribonukleinsäure
G	Guanin	mRNA	<i>messenger RNA</i>
		rRNA	ribosomale RNA

tRNA	<i>transfer RNA</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
RNase	Ribonuklease
ROCK	Rho-Kinase
RSV	<i>Rous sarcoma virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s.	siehe
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SD	<i>synthetic dropout</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SF1	Spleißfaktor 1
SH (1, 2, 3, 4)	<i>Src homology (1, 2, 3, 4) region</i>
SMC-Zellen	<i>smooth muscle cells</i>
s.o.	siehe oben
SRF	<i>serum response factor</i>
SSC	<i>standard saline citrate</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSPE	<i>standard saline phosphate EDTA</i>
s.u.	siehe unten
s/w	schwarz/weiss
T	Thymidin
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquatus</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TK	zytoplasmatische Proteintyrosinkinase
TK-Domäne	katalytische Domäne von Protein- Tyrosinkinasen
Tris	Tris(hydroxymethyl)amonimethan
TWEEN	Polyoxyethylenglykolsorbitolmono- oleat
u.	und
U	Uracil
UAS	<i>upstream activation sequence</i>
ü/N	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
VRP1	Verprolin 1
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D- galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.Z.	zur Zeit

Einheiten:

bp	Basenpaar(e)
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i>
d	Tag(e)
Da	Dalton
E	<i>E-value</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
kB	Kilobasen(paare)
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampère
μ Ci	Mikrocurie
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mmol	Millimol
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
Nt/nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
pH	H ⁺ -Ionenkonzentration
pmol	pikomol
rpm	<i>rotations per minute</i>
sec	Sekunde
t	Zeit
T _m	<i>temperature melting point</i>
u	„unit“ (Enzymeinheit)
V	Volt
(v/v)	<i>volume for volume</i>
W	Watt
(w/v)	<i>weight for volume</i>

Aminosäuren:

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

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eidesstatt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Düsseldorf, August 2002

VERÖFFENTLICHUNGEN, PRÄSENTATIONEN & STIPENDIEN

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Knobloch J., Grevelding C.G. & Kunz W. (2003) Treatment of adult *Schistosoma mansoni* with the tyrosine kinase inhibitor Herbimycin A demonstrates the existence of a female specific signal pathway leading to cell proliferation in the vitellarium. (in prep.)

Kapp K., **Knobloch J.**, Schussler P., Zemzoumi K., Grevelding C.G., & Kunz W. (2003) Differentiation of the gonads of both sexes in the blood-fluke *Schistosoma mansoni* coincides with the expression of an Src-like tyrosine kinase. (in prep.)

Knobloch J., Kunz W. & Grevelding C.G. (2002) Quantification of DNA synthesis in multicellular organisms by a combined DAPI and BrdU technique. Dev. Growth Differ. (in press)

Knobloch J., Winnen R., Quack M., Kunz W. & Grevelding C.G. (2002) A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. Gene 294, 87-97

Meeting abstracts im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Knobloch J., Grevelding, C.G & Kunz, W. (2002) *Schistosoma mansoni*: Male induced vitellar differentiation - Repression by tyrosine kinase inhibitors. Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology, March 20-23, Lübeck-Travemünde, Germany (Oral presentation)

Kunz W., **Knobloch J.** & Grevelding C.G. (2001) *Schistosoma mansoni*: De-repression of female development by the male. 8th International Symposium on Schistosomiasis, December 2-5, 2001, Recife, Brasil (Oral presentation)

Knobloch J., Grevelding C.G & Kunz W. (2001) *Schistosoma mansoni*: Regulation of vitelline cell proliferation in the female by the male. The British Society for Parasitology: Spring Meeting, April 17-20, Keele, Great Britain (Oral presentation)

Kunz W., **Knobloch J.**, Kapp K., & Grevelding C.G. (2001) *Schistosoma mansoni*: Regulation of vitelline cell proliferation in the female by the male. Keystone Symposia - Molecular Helminthology: An integrated approach, January 20-25, Taos, New Mexico, USA (Poster presentation)

Kunz W., **Knobloch J.**, Kapp K., Grevelding C.G. & Zemzoumi K. (2000) *Schistosoma mansoni*: Signalling molecules in the female that are stimulated by the male. Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology, Stuttgart-Hohenheim, Germany (Oral presentation)

Stipendien im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Meine Promotionsarbeit wurde für 2.5 Jahre (01/2000-06/2002) durch die Stiftung der Düsseldorf Entrepreneurs Foundation finanziert.

DANKSAGUNG

Jetzt ist sie tatsächlich (endlich) formuliert, formatiert und ausgedruckt; meine Dissertation. Das es soweit gekommen ist, habe ich auch einigen Personen zu verdanken, denen dieses letzte Kapitel hier gewidmet ist.

Zunächst einmal danke ich Herrn Prof. Dr. W. Kunz für die Möglichkeit zur Promotion, für zahlreiche Diskussionen über mehr oder weniger eindeutige Resultate und für die noch zahlreicheren erfolgreichen und erfolglosen Versuche, mein Allgemeinwissen aufzubessern. Es war übrigens bei den Sitzungen vor ihrem PC immer wieder amüsant zu verfolgen, wie kompatibel die MS-Programme Power Point und Omipage doch sein können.

Danke natürlich auch an PD Dr. Christoph Grevelding für die Unterstützung in allen Bereichen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Am wertvollsten davon waren vielleicht die Hinweise darauf, dass meine Arbeit mehr wert sein könnte, als mir das (anfangs) bewusst war. Zu erwähnen ist an dieser Stelle auch, dass ich Dir einen der schwärzesten Samstage meiner Doktorandenzeit verdanke. Die Idee die BL-Partie Köln-Frankfurt (ja, genau, Bundesliga, lang ist's her...) live im Kölner Stadion zu verfolgen erwies sich als Flop der Saison. Ich bin mir nicht mehr so sicher, aber mindestens drei Kölner Treffer musste ich in unmittelbarer Nähe von vielen Kölner Fans ertragen. Wäre ich mal lieber im Labor geblieben ...

Herrn Prof. Dr. F. Wunderlich danke ich dafür, dass er mich eigentlich fast mein komplettes Studium über „begleitet“ hat. Das fing mit der Vordiplomprüfung an, über Praktika im Hauptstudium, bis zur Diplomprüfung sowie zum jetzigen Koreferat.

Herzlichen Dank auch der Düsseldorfer Entrepreneur Foundation für die finanzielle Unterstützung für zweieinhalb Jahre. Ohne diese Organisation wäre die Arbeit wohl um einiges kürzer ausgefallen.

Dr. Volker Wippersteg danke ich für die nette Zeit als Mit-Doktorand. Hervorzuheben sind die vielen gemeinsamen Stunden des „Würmer-Kultivierens“ zu (für mich) früher Stunde, diverse lehrreiche E-Mail-Forwards und 1x BSP und zurück. Mit Wein kann ich allerdings auch nach drei Jahren Labornachbarschaft immer noch nichts anfangen. Nett übrigens auch, beim Tipp-Kick-Turnier trotz tagelanger Führung an Britta zu scheitern und mir den 1. Platz zu überlassen.

Dr. Britta Leiers danke ich für so manche Parallelitäten. Z.B. das Problem der Antikörperproduktion oder die Probleme mit dem Arbeitsamt und der Verwaltung (bei mir hat's schliesslich neun Wochen gedauert). Außerdem war es klasse jemandem im Labor zu haben, der mindestens ebenso begeistert von Meerschweinchen ist, wie ich.

Den Diplom-Biologen/innen bzw. Diplomanten Anja, Steffi & Kristian danke für amüsante neun bis zwölf Monate im Labor und außerhalb. Ich habe noch nie jemanden so elegant (lächelnd) von der Couch fallen/gleiten sehen, wie Dich, Anja. Vor allem unter dem Aspekt, dass Du eine Minute zuvor noch (sehr überzeugend) versichert hast: „Ich gehe in die Küche und koche einen Kaffee“. Auch die Szene: >Frau läuft mit Kind auf dem Arm gegen die Tür< war bemerkenswert. Im Zusammenhang mit Steffi werden mir v.a. die dramatischen 20 min in Lübeck direkt vor Christophs Vortag in Erinnerung bleiben. Wir waren drauf & dran den Notarzt zu holen. Übrigens: der größte Dank an Dich für die Bereitstellung des Fernsehers zur Fussball-WM und dafür, dass wir eine bessere Bildqualität als Rami & Co hatten. Bei Kristian ist hervorzuheben, dass er fast als einziger im Inst. f. Genetik so etwas wie Musikgeschmack bewiesen hat. MORTIFICATION ist halt 'ne klasse Band.

Danke Stefan. Für die praktische Unterstützung bei vielen Versuchen sowieso. Ebenso dafür, dass Du lange Zeit die Hauptaufmerksamkeit des genialen Post-Doc K. Z. auf Dich gelenkt hast. Das waren noch Zeiten. Zwölf Stunden und länger im Labor. Danke auch für die Kontakt nur eine neuen Sprache: Sächsisch und alles was dazu gehört. Wie spät ist es? Dreiviertel elf. Na toll, jetzt weiss ich mehr.

Thorsten danke ich für die Unterstützung in allen Bereichen, die etwas mit PC, Internet, internes Netzwerk und Drucken zu tun hatten sowie die gemeinsame Vorliebe am (digitalen) Flippern. Die 263.601.000 Punkte des "Pinball-Wizards" stehen zwar noch an der Tür sind aber in der Highscore längst, längst Geschichte.

Den Ex-Doktoranden Dr. Katja Kapp, Dr. Andreas Kampkötter und Dr. Ralf Winnen danke ich für die Unterstützung v.a. in der Anfangsphase meiner Doktorarbeit und für die Einführung in diverse Methoden.

Vielen Dank auch an Frau D. David für alles das, was mit Schnecken und Hamstern zu tun hat und an die F-Praktikanten Simone und Christoph.

Danke auch an Jeromé Vicogne und Dr. C. Dissous für eine erfolgreiche, interessante und entspannte Woche in Frankreich. Von der Laborausstattung bin ich immer noch beeindruckt.

Die Zeit als „Untergebener“ von Dr. K. Zemzoumi war äußerst lehrreich. Schade, dass sich ein ehemaliger Bezirksliga-Spieler (Frankreich) nicht in einer deutschen Hobby Mannschaft durchsetzen konnte.

An dieser Stelle lohnt es sich auch einmal, einen Blick auf die Zeit von vor zehn Jahren und davor zu werfen. Dort fällt mir eine Person auf, die mit den Grundstein dafür gelegt hat, dass ich diese 170 Seiten hier schreiben und die letzten 3½ mehr als acht Stunden am Tag für ein Halbtagsgehalt arbeiten musste. Ohne den ausgezeichneten Unterricht von Frau K. Gerlich im Rahmen des Biologie-Leistungskurses hätte ich dieses Fach wohl kaum studiert (möglicherweise würde statt dessen Herr M. Langner - Mathe-LK - hier den Dank abkassieren oder ich wäre Profi-Fussballer geworden, wer weiss ...). Deshalb, danke dafür, dass Sie mitgeholfen haben, dass ich es in meiner "Evolution" schon mal bis hierhin gebracht habe.

Aus dem privaten Bereich danke an aller erster Stelle Nicole für aktive die Unterstützung, Rücksichtnahme und die Toleranz gegenüber Wochenend- und Nachtarbeit während dieser 3.5 Jahre. Danke auch den Katzen Mandaro & Monika, den Meerschweinchen Pauline, Frieda, Stanley, Emely & Karlchen und den Kaninchen Bumbel (Puck), Scampi & (*i.m.*) Fee für die jeweilige Toleranz, sich mit mir den Wohnort und z.T. auch das Essen zu teilen.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern und meiner Oma, die mir vieles (wie z.B. das Studium) erst ermöglicht haben.

Als letztes möchte ich auch meinen Freunden für die oftmals notwendige Ablenkung von dieser Arbeit danken. Dieter K. z.B. dafür, dass er trotz des Tequila-Meetings (das sich komischerweise auf WEIZEN-Bier ausgewirkt hat) immer noch versucht mich wieder "auf den rechten Weg" zu bringen. Mal so nebenbei: Wie schon bei der Diplomarbeit gilt auch für dieses "Werk" immer noch das *where is justice, where is punishment* Prinzip (Urlaub, 1994). Was mir in diesem Zusammenhang auch immer wieder einfällt sind die Zitate "grammatikalische Juwelen" und "halten wir fest, wir sind besser, besser als der Rest" (eine "unbeliebte" Musikband, 2002). Henning K. z.B. dafür, dass er noch immer an mich glaubt. Mittlerweile bin ich ja schon "Prof. Bio". Und (weniger ...) dafür, dass er o.g. Tequila-Meeting organisiert hat. Michael, Lars und natürlich auch Nicole z.B. für die nach wie vor interessanten Ausflüge in eine Welt ohne Molekularbiologie, dafür aber mit Magiekunde als bedeutsamste Wissenschaft. Ganz Gelb-Blau Ratingen für das genialste Fussball-Kollektiv, das ich kenne.

Die wirklich letzten Worte dieser Arbeit richten sich jedoch an MICROSOFT. Immer wenn man denkt, man hätte gerade ein Kapitel fertig geschrieben, eine Abbildung eingebunden oder gar die komplette Arbeit zum finalen Ausdruck fertiggestellt, fällt Euren Programmen immer wieder etwas ein, was dazu führt, dass man von vorne anfangen kann. Schutzverletzungen, Dateikorruptionen und Fehler des Spool-Managers sind nicht lustig! Amüsant, aber ebenfalls unbrauchbar ist die Nachricht: „Dieser Vorgang dauert länger als erwartet, soll er dennoch fortgesetzt werden?“ Egal ob man „ja“ oder „nein“ anklickt, nach dem Zufallsprinzip tritt entweder eine Dateikorruption auf oder der PC stürzt ab. Das alles kann schon mal dafür sorgen, dass man gegen einen Stuhl tritt und aus Verletzungsgründen abends nicht am Training teilnehmen kann (wofür man dann ja sowieso keine Zeit mehr gehabt hätte) ...