

**Identifizierung und Charakterisierung  
differentiell exprimierter Gene in Hämocyten  
*Schistosoma mansoni*-resistenter und -suszeptibler  
Zwischenwirtschnecken *Biomphalaria glabrata***

DISSERTATION

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt von  
**Oliver Schneider**  
aus Reutlingen

2003

Tag der mündlichen Prüfung:

22.10.2003

Dekan:

Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Schulz-Key

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. N. Blin

# **Arduum res gestas scribere - Mühselig ist's, Geschichte zu schreiben**

...und ohne Hilfe und Unterstützung nicht möglich.

Den allergrößten Anteil am Gelingen der vorliegenden Arbeit hatte - neben mir - zweifellos **Dr. Ulrike Zelck**, die mir dieses spannende Thema vorgeschlagen und dadurch mein Interesse an der "Schneckengenetik" geweckt hat. Es gelang ihr während all der Jahre, mich auch nach größeren Rückschlägen immer wieder neu dafür zu begeistern. Darüber hinaus danke ich ihr für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie für die Freiheiten, die mir beim Forschen eingeräumt wurden. Bewundernswert auch ihre schier endlose Geduld, während der Zeit, in der all dies niedergeschrieben wurde. Hätte sie mich schon im Vorfeld der Arbeit über die Gefahr aufgeklärt, dass sich das Tempo der von mir untersuchten Organismen auch auf das Schreiben übertragen kann, ....

Des weiteren möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Jürgen Knobloch** für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Die Erstellung der Gutachten haben Herr **Prof. Dr. Hartwig Schulz-Key** und Herr **Prof. Dr. Nikolaus Blin** übernommen, vielen Dank dafür.

Ein großer Dank geht an **Ulrike Müller**, die mich nicht nur mit den vielen Tierchen, die zur Durchführung der Versuche nötig waren, "versorgt" hat, sondern auch tatkräftig am Experimentieren beteiligt war und mir stets und immer mehr eine gute Gesprächspartnerin gewesen ist. **Walter Deschle**, ohne den im Labor "nichts gehen" würde, danke ich für die sehr unterhaltsamen Gespräche in den Kaffee- und Mensapausen, die erfreulicherweise noch in unserem gemeinsamen Dialekt stattfinden konnten.

Ein ganz herzliches Dankeschön an **Simone Mosbacher**, mit der das gemeinsame Forschen sehr erfolgreich war und obendrein großen Spaß gemacht hat. Daneben sei allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Zelck und Bialek gedankt. **Birgit von Janowsky**, **Anna Cascante Cirera**, **Antje Feucht** und **Nicole Binder** haben stets für eine sehr nette und angenehme Atmosphäre sowohl im als auch außerhalb des Labors gesorgt.

Für die Möglichkeit der Mitbenutzung diverser Laborgeräte, und vor allem für die Hilfe bei der Einführung in deren Handling gebührt den Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Genetik der Universität Tübingen ein großes Dankeschön. Auch der Abteilung Parasitologie der Universität Hohenheim danke ich für die Bereitstellung einiger Laborgeräte und insbesondere **Carolin Reck** für die gewohnt sehr gute Zusammenarbeit bei unseren gemeinsamen Projekten.

Ein stets großes Interesse am Fortschreiten meiner Arbeit zeigte **Dr. Norbert "Enno" Weber**, dem darüber bei unseren Besprechungen, die wetterbedingt gelegentlich auch im Biergarten stattfinden mussten, berichtet werden konnte. Thanks a lot!

Großer Dank gebührt selbstverständlich auch allen meinen Freunden, die mir sehr oft und vor allem im richtigen Augenblick einen willkommenen Ausgleich geschaffen haben.

Und zuletzt ein ganz besonders herzliches und liebes Dankeschön an **Anna**.



## **Publikation, die im Rahmen dieser Arbeit veröffentlicht wurde**

**Schneider O**, Zelck UE (2001): Differential display analysis of hemocytes from schistosome-resistant and schistosome-susceptible intermediate hosts  
Parasitol Res 87(6): 489-491

## **Vorträge**

**Schneider O**, Zelck UE: Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in Schistosomen-resistenten und -suszeptiblen *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda)  
19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Stuttgart-Hohenheim 2000

**Zelck UE**, Schneider O, Mosbacher S: Differential gene expression in hemocytes of *Biomphalaria glabrata*, resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni*  
76<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Parasitologists (ASP), Albuquerque 2001

**Zelck UE**, Mosbacher S, Schneider O: Defense mechanisms in schistosome-resistant and -susceptible intermediate host snails  
7<sup>th</sup> International Symposium on Schistosomiasis, Heidelberg 2001

Schneider O, Mosbacher S, Bayne CJ, **Zelck UE**: *Schistosoma mansoni*: Modulation of gene expression in hemocytes of schistosome-resistant and -susceptible intermediate host snails  
20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Lübeck-Travemünde 2002

**Zelck UE**, Janje, B, Schneider O: Differentially expressed cDNAs of *Schistosoma mansoni* intermediate host hemocytes during phagocytosis and encapsulation  
10<sup>th</sup> International Congress of Parasitology (ICOPA), Vancouver 2002

## **Poster**

**Schneider O**, Mosbacher S, Zelck UE: Altered gene expression in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* upon infection with *Schistosoma mansoni*  
Deutsche Gesellschaft für Parasitologie: "Immunmodulation by Parasites", Berlin 2001



<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Schistosomen.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Lebenszyklus von <i>Schistosoma mansoni</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Krankheitsbild und Diagnose einer Schistosomiasis.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Epidemiologie .....</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Bekämpfung der Parasitose.....</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Immunbiologie des Zwischenwirtes.....</b>	<b>8</b>
1.6.1 Humorale Faktoren.....	8
1.6.2 Die Rolle der Hämocyten.....	9
<b>1.7 Reaktive Sauerstoffmetabolite und antioxidative Enzyme.....</b>	<b>11</b>
<b>1.8 Unterschiedliche Abwehrmechanismen bei Biomphalarien .....</b>	<b>12</b>
<b>1.9 Wirt-Parasit-Beziehungen .....</b>	<b>15</b>
<b>1.10 Genexpressionsanalysen mittels Differential Display und SSCP.....</b>	<b>16</b>
<b>1.11 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 MATERIAL .....</b>	<b>20</b>
2.1.1 Enzyme .....	20
2.1.2 Nukleotide .....	20
2.1.3 Radioisotope.....	20
2.1.4 Oligonukleotide.....	20
2.1.5 Molekulargewichtsmarker .....	22
2.1.6 Antikörper.....	22
2.1.7 Kits.....	22
2.1.8 Versuchstiere/Tiermodell .....	23
2.1.9 Bakterienstämme.....	23
2.1.10 Chemikalien .....	24
2.1.11 Puffer und Lösungen.....	25
2.1.12 Bakterienmedien.....	28
2.1.13 Geräte .....	29
2.1.14 Verbrauchsmaterialien .....	30
2.1.15 Software.....	30
<b>2.2 METHODEN .....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Parasitenzyklus und Infektion der Schnecken .....	31
2.2.2 Isolierung der Hämocyten .....	31
2.2.3 RNA-Extraktion aus den Hämocyten.....	32

<b>2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....</b>	<b>33</b>
2.2.4.1 Photometrische Bestimmung.....	33
2.2.4.2 Konzentrationsvergleich im Gel.....	33
<b>2.2.5 Differential Display .....</b>	<b>34</b>
2.2.5.1 DNA-Verdau .....	36
2.2.5.2 Reverse Transkription .....	36
2.2.5.3 Differential Display-PCR.....	37
2.2.5.4 Auftrennung der cDNA durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
2.2.5.5 Marker-labeling.....	39
2.2.5.6 Autoradiografie und Verwendung eines Imaging Screens.....	41
2.2.5.7 Isolierung von DNA aus DD-Gelen .....	41
<b>2.2.6 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).....</b>	<b>42</b>
2.2.6.1 Reamplifikation der DNA-Fragmente aus dem DD-Gel.....	42
2.2.6.2 Auftrennung im SSCP-Gel.....	43
2.2.6.3 Isolierung von DNA aus SSCP-Gelen .....	44
2.2.6.4 Reamplifikation der isolierten DNA-Fragmente aus dem SSCP-Gel.....	45
<b>2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.8 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....</b>	<b>46</b>
<b>2.2.9 Aufreinigung von Nukleinsäuren.....</b>	<b>47</b>
<b>2.2.10 Klonierung von Nukleinsäuren .....</b>	<b>47</b>
<b>2.2.11 Plasmidpräparation .....</b>	<b>49</b>
<b>2.2.12 Isolierung der klonierten DNA aus dem Plasmid.....</b>	<b>49</b>
<b>2.2.13 Anlegen von Dauerkulturen .....</b>	<b>50</b>
<b>2.2.14 Cycle-sequencing .....</b>	<b>51</b>
<b>2.2.15 Reinigung der markierten Proben und Sequenzierung.....</b>	<b>51</b>
<b>2.2.16 Auswertung der DNA-Sequenzen und Homologiesuche .....</b>	<b>52</b>
<b>2.2.17 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) .....</b>	<b>52</b>
2.2.17.1 cDNA-Synthese.....	52
2.2.17.2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	54
<b>2.2.18 cDNA-Genbibliotheken.....</b>	<b>55</b>
2.2.18.1 Herstellung einer cDNA-Genbank .....	55
2.2.18.2 Titerbestimmung der Phagenbank.....	56
2.2.18.3 Ausplattieren der Phagenbank.....	56
<b>2.2.19 Plaque-lifting.....</b>	<b>57</b>
<b>2.2.20 Dot-blot.....</b>	<b>57</b>
<b>2.2.21 Hybridisierung.....</b>	<b>58</b>
2.2.21.1 Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin .....	58
2.2.21.2 Durchführung der Hybridisierung.....	59
2.2.21.3 Detektion .....	60
2.2.21.4 Entfernen einer DNA-Sonde von der Nylonmembran/Stripping.....	60
<b>2.2.22 OneStep RT-PCR.....</b>	<b>61</b>

<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>63</b>
<b>3.1 Isolierung von Hämocyten aus <i>Biomphalaria glabrata</i></b> .....	<b>63</b>
<b>3.2 DNA-Verdau</b> .....	<b>63</b>
<b>3.3 Differential Display Analyse</b> .....	<b>64</b>
<b>3.4 Vergleich der Genexpression in Hämocyten aus resistenten und suszeptiblen <i>Biomphalaria glabrata</i> (<math>R_{ni}</math> vs. <math>S_{ni}</math>)</b> .....	<b>66</b>
3.4.1 Differential Display und SSCP-Analyse .....	66
3.4.2 Sequenzanalysen .....	72
3.4.3 Verlängerung der cDNA mit Hilfe der RACE-PCR .....	77
<b>3.5 Vergleich der Genexpression in Hämocyten infizierter suszeptibler <i>Biomphalaria glabrata</i> (<math>S_{ni}</math> vs. <math>S_{inf}</math>)</b> .....	<b>82</b>
3.5.1 Differential Display- und SSCP-Gele .....	83
3.5.2 Sequenzanalysen .....	88
<b>3.6 Vergleich der Genexpression in Hämocyten infizierter resistenter <i>Biomphalaria glabrata</i> (<math>R_{ni}</math> vs. <math>R_{inf}</math>)</b> .....	<b>90</b>
3.6.1 Differential Display- und SSCP-Gele .....	91
3.6.2 Sequenzanalysen .....	95
3.6.3 Verlängerung der cDNA mit Hilfe der RACE-PCR .....	97
<b>3.7 Screening einer Hämocyten cDNA-Genbank</b> .....	<b>98</b>
<b>3.9 Nachweis der Expression antioxidativer Enzyme mit der OneStep RT-PCR</b> .....	<b>100</b>
3.9.1 Superoxid-Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) .....	100
3.9.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	105
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>110</b>
<b>4.1 Methodik</b> .....	<b>110</b>
<b>4.2 Genexpression in Hämocyten nichtinfizierter Biomphalarien (<math>R_{ni}</math> vs. <math>S_{ni}</math>)</b> .....	<b>116</b>
<b>4.3 Genexpression in Hämocyten infizierter Biomphalarien (<math>S_{inf}</math> und <math>R_{inf}</math>)</b> .....	<b>117</b>
4.3.1 Suszeptible <i>Biomphalaria glabrata</i> ( $S_{ni}$ vs. $S_{inf}$ ).....	117
4.3.2 Resistente <i>Biomphalaria glabrata</i> ( $R_{ni}$ vs. $R_{inf}$ ).....	118
4.3.3 Unterschiede und Gemeinsamkeiten .....	119
<b>4.4 Homologiesuche</b> .....	<b>121</b>
<b>4.5 Homologien</b> .....	<b>122</b>
4.5.1 Cluster 1: Stoffwechselmetabolite .....	123
4.5.2 Cluster 2: Abwehrrelevante Gene .....	124
4.5.3 Cluster 3: Zellteilung und Signaltransduktion .....	128
<b>4.6 Ausblick</b> .....	<b>132</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>134</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>136</b>
<b>7. ANHANG</b> .....	<b>154</b>

## Abkürzungen

$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]dATP	mit <sup>33</sup> P markiertes dATP
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]dCTP	mit <sup>32</sup> P markiertes dCTP
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASW	Artificial Spring Water
bp	Basenpaare
CAT	Catalase
cDNA	copy DNA (komplementäre DNA)
Ci	Curie
CoA	Coenzym A
CSPD	Chemilumineszenz-Substrat: Phenylphosphat, Dinatriumsalz
d	Tag
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
DD	Differential Display
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DD-RT-PCR	Differential Display-Reverse Transkription-PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ESP	Exkretorische-Sekretorische Produkte

EST	Expressed Sequence Tag
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
°C	Grad Celsius
GSP	Gene Specific Primer
h	Stunde
Hb	Hybridisierung
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	doppelt destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	Bakteriophage Lambda
LD-PCR	Long-Distance-PCR
M	molar
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ng	Nanogramm
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid

OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pfu	plaque forming unit
p.i.	post infectionem (nach Infektion)
pmol	pikomolar
R	resistenter Schneckenstamm (13-16-R1)
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffmetabolite)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
S	suszeptibler Schneckenstamm (M-line)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	Sodium chloride/Sodium citrate-buffer (NaCl/NaCitrat-Puffer)
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
$t_{1/2}$	Halbwertszeit von Radioisotopen
$T_m$	Schmelztemperatur von DNA-Fragmenten
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermostabile Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-hydroxyethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
üN	über Nacht
ÜS	Überstand
UPM	Universal Primer Mix

UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	versus
VT	Volumentteile
v/v	Volumen pro Volumenteil
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumenteil
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

### Ein- und Dreibuchstabencode von 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	Aspargin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin



## 1. EINLEITUNG

### **1.1 Schistosomen**

Die zum Stamm der Plathelminthen (Trematoda, Digenea) gehörenden Schistosomatidae parasitieren in Vögeln und Säugern. Sie sind in weiten Teilen Afrikas, im Mittleren Osten, in Südamerika, sowie in Südostasien verbreitet. Erstmals beschrieben wurden die Würmer von dem Sigmaringer Arzt Theodor Bilharz im Jahre 1851. Die drei bedeutendsten humanpathogenen Arten sind *Schistosoma mansoni* (SAMBON 1907), *Schistosoma haematobium* (BILHARZ 1852) und *Schistosoma japonicum* (KATSURADA 1904), die Erreger der Bilharziose beim Menschen.

Zur Aufrechterhaltung ihres Lebenszyklus benötigen die Schistosomen neben ihrem Endwirt einen Mollusken als Zwischenwirt, in dem die asexuelle Vermehrung des Parasiten stattfindet. *Schistosoma mansoni*, dem Erreger der Darmbilharziose, dienen dazu verschiedene Arten der Gattung *Biomphalaria* (Pulmonata, Planorbidae). Der Erreger der Urogenitalbilharziose, *Schistosoma haematobium*, entwickelt sich in Planorbiden der Gattung *Bulinus* und *Schistosoma japonicum*, der ebenfalls den Darm seines Endwirtes befällt, in verschiedenen *Oncomelania*-Arten (Prosobranchia).

### **1.2 Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni***

Die adulten Würmer der Schistosomen sind getrenntgeschlechtlich und stark sexualdimorph. Die Seitenränder des 10 bis 15 mm langen Männchens sind ventralwärts eingerollt und bilden so eine Art Bauchfalte, den Canalis gynaecophorus. In diesem trägt es das etwas längere aber wesentlich dünnere Weibchen, weshalb die Schistosomen auch als Pärchenegel bezeichnet werden. Der bevorzugte Sitz der Parasiten sind die Blutgefäße. Dort sind sie vor allem im Pfortaderbereich, in den Mesenterial- und Darmvenen zu finden, wo sie sich rein hämophag ernähren (Zusmann et al. 1970). Im Darm der Trematoden konnte ein hämoglobinabbauendes Protein nachgewiesen werden (Chappell & Dresden 1986, Brindley et al. 2001, Silva et al. 2002).

Das Weibchen von *Schistosoma mansoni* legt ca. 200 bis 300 Eier pro Tag in den Venen des Dickdarmes ab. Dazu verlässt es die Bauchfalte des Männchens und dringt weit in das Kapillarnetz vor. Die abgelegten Eier ulzerieren aktiv durch die Darmwand in das Lumen des Darmes und gelangen schließlich mit den Fäzes nach außen. Durch den Blutstrom wird

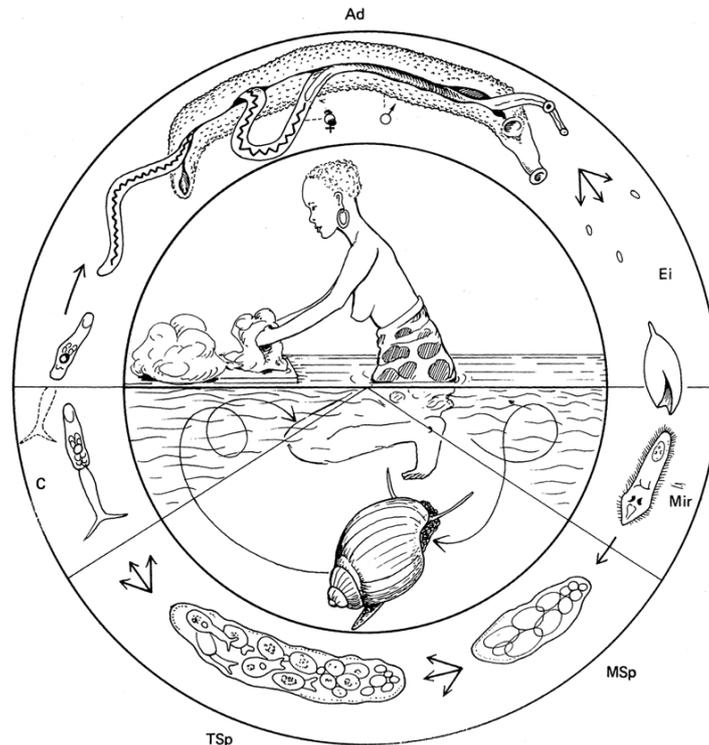
jedoch ein großer Anteil der abgelegten Eier in andere Organe abgeschwemmt, vor allem in die Leber. Dort kommt es durch die Immunabwehr des Wirtes zur Bildung von Granulomen, welche zu schweren Komplikationen führen können.

Gelangen die Eier ins Wasser, schlüpft eine bewimperte Larve, das Miracidium, aus der Eikapsel. Das Schlüpfen wird durch die Stimuli Licht, Temperatur und Osmolarität ausgelöst. Das Miracidium ist nach dem Verlassen des Eies für etwa acht bis zwölf Stunden infektiös. Während dieser Zeit muss es der Larve gelingen, in einen geeigneten Zwischenwirt einzudringen, wobei diesbezüglich eine sehr hohe Spezifität besteht (Basch 1976). Für den Parasiten *Schistosoma mansoni* sind dies Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria*. Die Penetration der Schnecke durch die Schistosomen erfolgt zum einen mechanisch und zum anderen durch sekretorische Enzyme, die in den Penetrationsdrüsen der Larven synthetisiert werden.

Aus dem Miracidium bildet sich am Ort der Penetration eine Muttersporocyste, aus deren Keimzellen sich nach ca. zwei Wochen die Tochtorsporocysten entwickeln. Diese wandern zur Mitteldarmdrüse der Schnecke und produzieren dort nach weiteren zwei Wochen die für den Menschen infektiösen Larven, die Cercarien.

Stimuliert durch Licht und Temperatur verlassen die Cercarien ihren Zwischenwirt aktiv nach außen. Die Cercarien sind nach Verlassen des Zwischenwirtes bis zu 24 Stunden infektiös. Mit Hilfe von Chemorezeptoren finden die Larven ihren Endwirt und können an jeder beliebigen Stelle dessen Haut durchdringen. Dabei wird das Stratum Corneum mit verschiedenen Enzymen lysiert. Die Cercarien werfen ihren charakteristischen Gabelschwanz ab und dringen in den Endwirt ein. Dieser Vorgang geschieht sehr rasch, innerhalb von nur 5 bis 30 Minuten (Haas et al. 1995, 2002).

Das Stadium der in den Wirt eingedrungenen Larve wird Schistosomulum genannt. Dieses wandert zu einer Vene und penetriert die Gefäßwand. Durch die Kapillaren gelangt der Parasit über den Lungenkreislauf und das Herz in die Leber des Endwirtes (Wilson & Coulson 1986). Dort erfolgt sowohl die Entwicklung zum Adultwurm als auch die Geschlechterfindung. Die Trematoden wandern zu den Mesenterialvenen, und vier bis sechs Wochen nachdem die Cercarien in den Endwirt eingedrungen sind, werden wiederum die ersten Eier ausgeschieden.



**Abbildung 1:** Darstellung des Lebenszyklus der Schistosomen am Beispiel von *Schistosoma haematobium*. Ad = Adultform; Mir = Miracidium; MSp = Muttersporocyste; TSp = Tochtersporocyste; C = Cercarie (nach Dönges 1988)

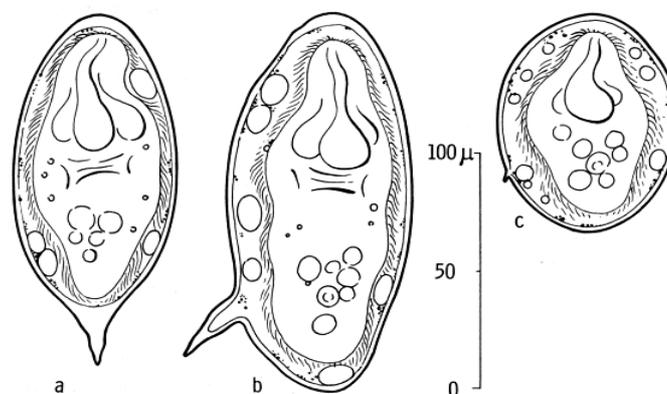
### 1.3 Krankheitsbild und Diagnose einer Schistosomiasis

Die adulten Würmer selbst können nicht als Verursacher für die auftretenden Krankheitssymptome einer Schistosomen-Infektion angesehen werden. Diese werden vielmehr durch die abgelegten Eier der Parasiten und die Immunreaktionen des Wirtes gegen diese hervorgerufen.

Als allergische Reaktion auf die eingedrungenen Cercarien kann bereits wenige Stunden nach der Infektion eine Hautdermatitis, auch Cercariendermatitis genannt, auftreten. Mit dem Beginn der Eiablage tritt die akute Phase der Krankheit ein. Es kommt oft zu Fieber, das auch als Katayama-Fieber bezeichnet wird. Dieses wird durch die hohe Antigenexposition, also durch die abgelegten Eier der Parasiten, und die daraufhin gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe ausgelöst. Ein weiblicher Wurm legt täglich mehrere hundert Eier in den Venen des Endwirtes ab. Die abgelegten Eier führen zu Entzündungen der Mucosa, zur Hyperplasie und zu Ulzerationen. In der chronischen Phase kommt es als Reaktion auf die sekretierten Eiantigene zu Granulombildungen. Die Folgen davon sind Gefäßverstopfungen, was zu einem

Pfortaderstau und somit zu Leber- und Milzvergrößerung (Hepatosplenomegalie) führen kann. Häufig kommt es dabei zur Gewebeschädigung und zur Fibrose dieser Organe. Durch den venösen Blutkreislauf können die Eier in andere Organe, wie die Lunge oder das Gehirn (cerebrale Schistosomiasis) abgeschwemmt werden und dort zu Komplikationen führen (Warren 1973). Außerdem kann es zur Bildung von Karzinomen im Darm kommen (Matsuda et al. 1999, Sheweita et al. 2002). Bei der durch *Schistosoma haematobium* verursachten Blasenbilharziose konnte in Endemiegebieten das Auftreten von Blasenkrebs beobachtet werden (Mostafa et al. 1999).

Für die Diagnose einer Schistosomen-Infektion stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Die einfachste Methode ist der direkte Nachweis der Eier im Stuhl (*S. mansoni*, *S. japonicum*) oder im Urin (*S. haematobium*) der Infizierten. Die Eier der Schistosomen besitzen einen charakteristischen Stachel (siehe Abb. 2) und können somit für die Diagnostik herangezogen werden. Ein weiterer morphologischer Nachweis kann mit dem Miracidien-Schlüpf-Versuch (Dönges 1967) erbracht werden.



**Abbildung 2:** Eier von *Schistosoma haematobium* (a) und *Schistosoma mansoni* (b), mit einem charakteristischen Stachel, der bei *Schistosoma japonicum* (c) kaum erkennbar ist (nach Dönges 1988).

Zu den immundiagnostischen Methoden zählt zum einen die Cercarien-Hüllen-Reaktion (CHR) nach Vogel und Minning (s. Dönges 1966). Bei diesem Nachweisverfahren werden Cercarien in Patientenserum inkubiert. Sind gegen Schistosomen gerichtete Antikörper im Serum vorhanden, bildet sich eine Präzipitationshülle um den Kopf der Cercarien. Des

weiteren steht die Durchführung eines ELISA-Testverfahrens (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) zur Verfügung.

Molekularbiologisch kann die Diagnose durch den Nachweis eines Schistosomen-spezifischen DNA-Fragmentes mittels einer PCR erbracht werden (Hanelt et al. 1997, Pontes et al. 2002).

## 1.4 Epidemiologie

Nach der Malaria ist die Schistosomiasis die am häufigsten auftretende humanpathogene Parasitose der Tropen und Subtropen. Angaben der Weltgesundheitsorganisation zufolge leben ca. 600 Millionen Menschen weltweit in Endemiegebieten (WHO 1996). Etwa ein Zehntel der schätzungsweise 200 Mio. Infizierten zeigen schwere Krankheitssymptome und ca. 20000 Menschen sterben jährlich an den Folgen der Infektion.

Die Schistosomiasis ist in Endemiegebieten vor allem eine Infektionskrankheit der ländlichen Bevölkerung. Durch die Beschäftigung in der Landwirtschaft und im Fischfang ist dieser Personenkreis besonders exponiert. In Asien sind davon meist Personen in einem Alter von über 20 Jahren betroffen (Ross et al. 1998), während in Afrika vor allem Kinder und Jugendliche die epidemiologisch wichtigste Gruppe darstellen (Fulford et al. 1996). Dieser Umstand spiegelt die sozio-ökonomischen und ökologischen Unterschiede in den verschiedenen Regionen der Welt wieder (Huang & Manderson 1992).

Für *Schistosoma japonicum* ist das tierische Parasitenreservoir von großer Bedeutung. Domestizierte Tiere wie Rinder, Wasserbüffel, Ziegen, Schafe und Schweine zählen dazu. Durch den Einsatz von Praziquantel wird allerdings versucht, dieses Reservoir einzudämmen (De Bont & Vercruyse 1997). Dagegen stellen für *Schistosoma mansoni* lediglich einige Nager ein tierisches Parasitenreservoir dar, welches jedoch unbedeutend für die Epidemiologie der Schistosomiasis ist, während für *Schistosoma haematobium* ein solches praktisch gar nicht existiert. Um ihren Entwicklungszyklus aufrecht zu erhalten, sind diese beiden Trematodenarten auf den Menschen und die geeignete Zwischenwirtschnecke angewiesen.

## 1.5 Bekämpfung der Parasitose

Die Bekämpfung der Schistosomiasis hat zum Ziel, die Parasitenlast der infizierten Personen zu senken, so dass deren individuelle Belastung reduziert bzw. minimiert wird. Dazu ist sowohl die chemotherapeutische Behandlung der Infizierten nötig, als auch die Aufklärungsarbeit an der Bevölkerung über die Parasitose bzw. den Übertragungsweg der Schistosomen unumgänglich. Gleichzeitig wird dabei versucht, durch den Einsatz verschiedener Molluskizide die Schneckenpopulation einzudämmen. Des Weiteren können durch den Bau sanitärer Anlagen und Kläranlagen, sowie von Brunnen und Waschhäusern die exponierten Menschen von Infektionsherden ferngehalten und dadurch eine Kontamination verhindert werden. Durch den Bau von Staudämmen und Bewässerungsanlagen wurden allerdings auch neue Schneckenbiotope geschaffen, wodurch es in den letzten Jahrzehnten wiederholt zum Ausbruch der Schistosomiasis gekommen ist (Picquet et al. 1996, Scrimgeour et al. 2001). Es wird befürchtet, dass es durch den Bau des Drei-Schluchten-Staudamms auch in China wieder dazu kommen kann (Ross et al. 2001).

Das Mittel der Wahl zur Bekämpfung einer Schistosomen-Infektion ist Praziquantel. Die Vorteile dieses Medikamentes liegen in der hohen Wirksamkeit, der einfachen Verabreichung und den moderaten Nebenwirkungen, außerdem ist es relativ kostengünstig (Cioli 1998). Praziquantel wirkt direkt auf das Tegument der Adultwürmer und zerstört dieses (Modha et al. 1990, Xiao & Shen 1995). Trotz der hohen Wirksamkeit bei der medikamentösen Behandlung der infizierten Menschen mit Praziquantel, ist die Entwicklung einer Vakzine nach wie vor dringend notwendig, weil das Medikament keinen Schutz vor einer Neuinfektion bietet. Mittlerweile sind in einigen Ländern, wie im Senegal (Guisse et al. 1997) und in Ägypten (Ismail et al. 1999), die ersten Resistenzbildungen bzw. Toleranzen der Schistosomen gegenüber Praziquantel entstanden.

Eine Alternative dazu scheint das aus dem chinesischen Beifuß *Artemisia annua* gewonnene Artemisinin und dessen Derivate zu sein (Utzinger et al. 2000). Diese häufig bei der Behandlung von Malaria-Infektionen verwendeten Substanzen besitzen auch eine antischistosomale Wirkung und es könnte deshalb ein weiteres geeignetes Präparat zur Chemotherapie sein (Araujo et al. 1999, Xiao et al. 2000). Darüber hinaus zeigte sich, dass die Wirksamkeit des Präparates in Kombination mit Praziquantel sogar noch verstärkt wird (Utzinger et al. 2001, De Clercq 2002).

Zur Bekämpfung der Zwischenwirte ist der Einsatz von Niclosamid, einem synthetischen Molluskizid, weit verbreitet und sehr effektiv. Es bietet allerdings keinen Schutz vor einer Rekolonisierung und muss deshalb in zeitlich regelmäßigen Abständen erneut angewandt werden. Obwohl es nicht toxisch für den Menschen ist, führt es zu Nebeneffekten wie Amphibien- und Fischsterben, sowie der Zerstörung der Begleitflora (Andrews et al. 1983). Alternative Möglichkeiten zu den bisher eingesetzten Molluskiziden sind durch eine Reihe pflanzlicher Substanzen, wie Saponine aus *Phytolacca dodencandra* und Isoflavonoide aus *Millettia ningii* gegeben (Kloos & McCullough 1987). Die Verwendung einer Substanz aus dem Latex von *Euphorbia splendens* zeigte in einer Feldstudie in Brasilien eine hohe Wirksamkeit bei der Bekämpfung verschiedener Zwischenwirtschnecken. Es scheint außerdem keine negativen Begleiterscheinungen auf andere Organismen zu haben (Schall et al. 1998 und 2001).

Eine weitere Möglichkeit zur biologischen Bekämpfung der Biomphalarien und damit der Parasitose stellt der Einsatz von Konkurrenzarten, sogenannten Kompetitoren dar. Dabei werden verschiedene Schneckenarten, welche in Konkurrenz zu den Zwischenwirtschnecken der Schistosomen stehen und diese verdrängen sollen, in Endemiegebieten ausgesetzt. Eine solche Maßnahme wurde erstmals 1958 in Puerto Rico ergriffen. Dort wurde die Schneckenart *Marisa cornuarietis* ausgesetzt, welche im Laufe vieler Jahre in einigen Gebieten die Zwischenwirtschnecke *Biomphalaria glabrata* vollständig verdrängte (Jobin et al. 1977, Giboda et al. 1997). Ein ähnlicher Erfolg konnte auch in Tansania erbracht werden, wo 24 Monate nach dem Aussetzen von *Marisa cornuarietis* einige pathologisch bedeutende Schneckenarten eliminiert werden konnten. Bei diesem Experiment zeigte sich außerdem, dass keine Nebeneffekte für die Begleitfauna bzw. -flora entstanden sind (Nguma et al. 1982). Nachteilig beim Einsatz von Kompetitoren erwies sich allerdings, dass einige Konkurrenzarten wie *Tarebia granifera*, *Melanoides tuberculata* oder *Biomphalaria straminea* das Potential besitzen, andere Arten zu verdrängen, selbst aber als Zwischenwirt für Parasiten dienen können (Sturrock 1986, Giboda et al. 1991).

## 1.6 Immunbiologie des Zwischenwirtes

Das Abwehrsystem von Mollusken unterscheidet sich ganz wesentlich vom Immunsystem des Menschen bzw. der höheren Vertebraten. Mollusken besitzen keine Lymphozyten und Antikörper, und verfügen zudem über kein immunologisches Gedächtnis (van der Knaap & Loker 1990). Dennoch gelingt es ihnen, sich vor eingedrungenen Fremdkörpern wie Parasiten oder Bakterien zu schützen, indem sie diese erkennen und abwehren. Mollusken verfügen über ein Abwehrsystem, welches sich aus humoralen und zellulären Komponenten, die in enger Beziehung und Wechselwirkungen zueinander stehen, zusammensetzt.

### 1.6.1 Humorale Faktoren

Neben zellulären Bestandteilen beinhaltet das Abwehrsystem der Mollusken eine große Anzahl verschiedener Enzyme, Proteine und Moleküle, die vor Infektionen mit Parasiten oder Bakterien schützen. Bei diesen humoralen Faktoren handelt es sich vor allem um lysosomale Enzyme und um Proteine mit antibakterieller Wirkung (Mitta et al. 1999). Sie werden von den Hämocyten synthetisiert und zirkulieren in der Hämolymphe der Mollusken. Bei der Abwehr von *Schistosoma mansoni*-Sporocysten konnte eine erhöhte Aktivität einiger Enzyme, wie Lysozym, Aminopeptidase und Phosphatase festgestellt werden (Granath & Yoshino 1983, Cheng & Dougherty 1989). Neben dem  $\alpha_2$ -Makroglobulin, welches die Cysteinproteinase von Schistosomenlarven inhibiert (Bender et al. 1992, Fryer et al. 1996, Bender & Bayne 1996) konnte außerdem eine Miracidien immobilisierende Substanz im Serum von *Biomphalaria glabrata* nachgewiesen werden (Lie et al. 1980, Sminia & van der Knaap 1986). Den Nachweis, dass auch Cytokin-ähnliche Moleküle eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen in Mollusken haben können, erbrachten Connors und Mitarbeiter (1998), indem sie zeigten, dass rekombinantes Interleukin1 Sporocysten in suszeptiblen Biomphalarien abtötet. Interleukin1 erhöht die Phagocytoserate und die Superoxid-Produktion in Hämocyten und sorgt so dafür, dass der Cercarienausstoß bei suszeptiblen Biomphalarien abnimmt (Connors et al. 1995).

Als ein sehr wichtiger Bestandteil der humoralen Komponenten bei einer Immunreaktion werden die von den Hämocyten gebildeten Lektine angesehen. Lektine sind Proteine oder Glykoproteine, die mit mehreren Kohlenhydrat-Bindungsstellen ausgestattet sind (Yeaton 1981a und 1981b). Sie kommen zum einen frei in der Hämolymphe, aber auch als Oberflächenmoleküle in der Hämocytenmembran vor, wo sie als Rezeptoren fungieren (van

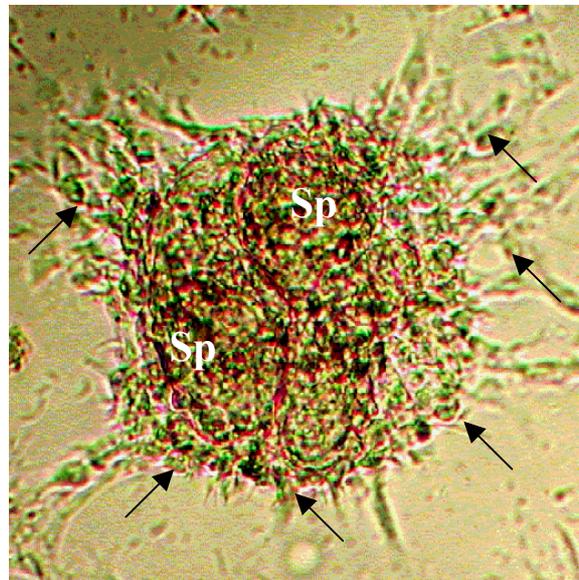
der Knaap 1983). Ihre wichtigste Funktion üben Lektine in der Fremderkennung und der Opsonierung aus, sind also zuständig für den Kontakt zwischen Hämocyten und Fremdkörper. Durch Agglutination können diese immobilisiert und der Phagozytose durch die Abwehrzellen zugeführt werden (Fryer et al. 1989, Zelck & Becker 1992). Lektine in der Hämolymphe von *Biomphalaria glabrata* binden an die Oberfläche von Fremdkörpern und vermitteln so eine Interaktion zwischen diesen und den Hämocyten (Hertel et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Glykopeptide auf der Sporocystenoberfläche von *Schistosoma mansoni* Lektinen als Bindungsstelle dienen (Johnston & Yoshino 1996), und dass über Kohlenhydrat bindende Rezeptoren auf der Hämocytenoberfläche schließlich der Kontakt zwischen Fremdkörper und Abwehrzellen zustande kommt (Johnston & Yoshino 2001).

### 1.6.2 Die Rolle der Hämocyten

Den wichtigsten Bestandteil der zellulären Faktoren im Abwehrsystem der Mollusken stellen die Hämocyten dar. Es handelt sich dabei um Abwehrzellen mit hohem phagozytotischen Potential, die frei zwischen der Hämolymphe und dem Bindegewebe der Schnecke zirkulieren. Sie werden dabei von chemotaktischen Reizen geleitet. Gebildet werden die Hämocyten im Amöbocyte-Producing-Organ (APO), welches sich in der Herzregion der Schnecke befindet (Lie et al. 1975, Rashed et al. 1996). Bei Infektionen mit Parasiten oder bei Verwundungen ist eine Erhöhung der Hämocyten-Produktion zu beobachten (van der Knaap et al. 1987), was bestätigt, dass ihnen bei Abwehrreaktionen und beim Wundverschluss eine sehr wichtige Rolle zukommt.

Mit elektronenmikroskopischen Methoden wurden die Abwehrzellen von *Biomphalaria glabrata* charakterisiert (Matricon-Gondran & Letocart 1999). Es konnten drei verschiedene Zelltypen beschrieben werden, die sich in ihrer Größe und der Anzahl der enthaltenen Glykogenspeicher, Organellen und Granula unterscheiden. Dabei konnten Übereinstimmungen mit den Hämocyten von *Lymnaea stagnalis*, die von van der Knaap und Loker (1990) untersucht und als Granulocyten, Hyalinocyten und runde Zellen charakterisiert wurden, festgestellt werden.

Fremdkörper, die zu groß für die Phagozytose sind, werden von den Hämocyten eingekapselt. Dabei lagern sich die Abwehrzellen an diese an und bilden innerhalb weniger Stunden eine mehrschichtige Hülle, so dass ein dichtes Zellaggregat entsteht (Abb. 3).



**Abbildung 3:** Sporocysten (Sp) von *Schistosoma mansoni* werden von Hämocyten (Pfeile) der Zwischenwirtschnecke *Biomphalaria glabrata* eingekapselt (nach Zelck).

Die in den Lysosomen der Hämocyten gespeicherten Enzyme werden bei einem direkten Kontakt in den Spalt zwischen Hämocyten und eingekapseltem Fremdkörper sezerniert und dieser dadurch abgetötet. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Lysozyme, Peroxidasen, Phosphatasen, Aminopeptidasen und Phospholipase C (Granath & Yoshino 1983, Yoshino 1988, Adema et al. 1994). Aufgrund des Vorkommens dieser Enzyme und ihrer Fähigkeit zur Phagozytose weisen die Hämocyten der Mollusken eine große Ähnlichkeit zu den Makrophagen der Vertebraten auf (McKerrow et al. 1985, Adema et al. 1991). Darüber hinaus sind sie zur Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROS), wie Superoxid ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder von Stickoxiden (NO) befähigt (Dikkeboom et al. 1988a, Shozawa et al. 1989, Hahn et al. 2000), welche am Abtöten von eingedrungenen Fremdkörpern beteiligt sind (Adema et al. 1994, Hahn et al. 2001a und 2001b).

## 1.7 Reaktive Sauerstoffmetabolite und antioxidative Enzyme

Im oxidativen Abwehrmechanismus von Invertebraten stimulieren eingedrungene Fremdkörper und Parasiten die Hämocyten zur Synthese von Reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS). Die Produktion dieser ROS konnte sowohl in *Biomphalaria glabrata* als auch in einigen anderen Molluskenarten nachgewiesen werden (Dikkeboom et al. 1988b, Adema et al. 1994). Dabei fällt dem Superoxid ( $O_2^-$ ) und dem daraus gebildeten Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) die wichtigste Rolle zu. In mehreren Studien konnte deren toxische Wirkung auf die Sporozysten der Schistosomen dokumentiert und gezeigt werden, dass  $H_2O_2$  das cytotoxisch größte Potential besitzt (Dikkeboom 1988a, Adema et al 1994, Hahn et al. 2001a). Adema und Mitarbeiter konnten zeigen, dass es sich bei diesem Abwehrmechanismus um einen NADPH-Oxidase abhängigen Vorgang handelt, der mit dem Respiratory Burst in Phagocyten von Säugern vergleichbar ist. (Adema et al. 1993). Dafür spricht auch, dass es durch eine Blockade der NADPH-Oxidase zu einer zeitlich verzögerten und signifikanten Abnahme des Killings der eingekapselten Sporocysten kommt (van der Knaap & Loker 1990, Hahn et al. 2001a).

Das hochreaktive Superoxid ( $O_2^-$ ) ist in den Phagosomen (saurer pH-Wert) sehr instabil und wird spontan zu Wasserstoffperoxid reduziert. Im Cytosol dagegen, bei neutralem pH-Wert, wird diese Reaktion von dem Enzym Superoxid-Dismutase katalysiert. Weil das dabei entstandene  $H_2O_2$  mit dem Superoxid zu dem hochreaktiven Hydroxylradikal  $HO\cdot$  reagieren kann, muss das Wasserstoffperoxid aufgrund dieser cytotoxischen Eigenschaften in nachfolgenden Reaktionen wieder abgebaut werden. Dies geschieht durch die Umwandlung in  $H_2O$ , was durch verschiedene Enzyme, wie die Catalase (CAT), die Glutathion-Peroxidase (GPX) oder durch die Thioredoxin Peroxidase (TRX) katalysiert wird. Im Phagosom dagegen wird Wasserstoffperoxid unter Beteiligung des Enzyms Myeloperoxidase (MPO) in Hypochlorsäure (HOCl) und weiter zu Chlor umgewandelt.

Um sich der Abwehr der Biomphalarien entziehen zu können, besitzen Schistosomen zur Detoxifizierung dieser reaktiven Sauerstoffmetabolite (ROS) eine Reihe antioxidativer Enzyme. Dazu zählen die cytosolische Cu-Zn Superoxid-Dismutase (CT-SOD), die Signalpeptid-Superoxid-Dismutase (SP-SOD), die Glutathione Peroxidase (GPX) oder die Glutathione-Transferase (GST), die in verschiedenen Entwicklungsstadien des Parasiten nachgewiesen werden konnten. Das Enzym Catalase, welches das zellschädigende Wasserstoffperoxid in  $H_2O$  und molekularen Sauerstoff umwandelt, konnte bei den

Schistosomen allerdings nicht nachgewiesen werden (Simurda et al. 1988, Nare et al. 1990, Mei & LoVerde 1997, Zelck & von Janowsky 2003).

### **1.8 Unterschiedliche Abwehrmechanismen bei Biomphalarien**

Von der Zwischenwirtschnecke *Biomphalaria glabrata* existieren zwei Phänotypen, der Resistente und der Suszeptible. Im ersteren werden eingedrungene Parasiten von den Hämocyten eingekapselt und abgetötet, während in empfänglichen Schnecken eine Abwehrreaktion ausbleibt. Der größere Anteil der Schneckenpopulation ist dem resistenten Phänotyp zuzuordnen, und es sind schätzungsweise lediglich 1 bis 3% der Tiere mit Schistosomen infiziert (Zelck, pers. Mitteilung). Diese sehr niedere Infektionsrate reicht allerdings aus, um den Lebenszyklus der Schistosomen aufrecht zu erhalten. Die Empfänglichkeit für bzw. die Resistenz gegenüber dem Parasiten ist genetisch determiniert, wobei die Resistenz dominant vererbt wird (Richards 1975, Webster 2001). Neben diesen beiden Merkmalen besteht die Möglichkeit der Inkompatibilität, das heißt, dass sich ein eingedrungener Parasit in einem solchen Schnecken-Phänotyp aufgrund ungeeigneter physiologischer Voraussetzungen nicht weiterentwickeln kann.

Der Vorgang der Fremderkennung eines eingedrungenen Parasiten findet sowohl bei den resistenten als auch bei den empfänglichen Biomphalarien statt. Dafür spricht unter anderem die Abnahme der Anzahl der zirkulierenden Hämocyten in der Hämolymphe in beiden Phänotypen nach einer *Schistosoma mansoni*-Infektion (Coustau & Yoshino 1994, Bezerra et al. 1997). Bei der Untersuchung der Aktivität verschiedener Glykosidasen im Plasma von *Biomphalaria glabrata* wurde bei den suszeptiblen Schnecken neben einer geringeren Konzentration an Plasmaproteinen auch eine deutlich geringere Enzymaktivität gegenüber dem resistenten Phänotyp festgestellt. Diese Unterschiede bleiben auch nach einer Schistosomen-Infektion bestehen, wobei die Aktivität der Glykosidasen in beiden Schneckenstämmen signifikant ansteigt. Einige Tage nach der Infektion fällt die Aktivitätsrate wieder auf das Ausgangslevel zurück, woraus geschlossen wurde, dass einige dieser Glykosidasen in den Prozess der Fremderkennung involviert sein könnten (Zelck 1999).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Hämocyten suszeptibler Biomphalarien das Potential besitzen, Hefezellen und Latexbeads zu phagocytieren (Fryer & Bayne 1989 und 1996). Die Anlagerung an die künstlichen Partikel erfolgt bei den resistenten Schnecken allerdings in ein höherem Maße als bei den suszeptiblen (Uchikawa & Loker 1992). Zelck und Becker konnten in ihren *in vitro*-Assays eine unterschiedliche Phagocytose-Rate in den Abwehrzellen von R- und S-Schnecken aufzeigen. In Abhängigkeit von Calcium, Lektinen und verschiedenen Plasmafaktoren konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Hämocyten resistenter als auch die suszeptibler Zwischenwirtschnecken, in naiver und infizierter Form, Fremdkörper erkennen und phagocytieren. Dabei fällt auf, dass die Phagocytose bei den resistenten Biomphalarien um ein mehrfaches schneller abläuft als im suszeptiblen Schnecken-Phänotyp (Zelck & Becker 1992).

Eine Einkapselung von Schistosomen lässt sich bei den empfänglichen Schnecken nur *in vitro* herbeiführen. Das Abtöten des eingekapselten Fremdkörpers erfolgt dabei allerdings nicht (Hahn et al. 2001a). Es konnte aber dokumentiert werden, dass Plasmafaktoren aus resistenten Biomphalarien die Hämocyten von suszeptiblen Schnecken sowohl zur Einkapselung als auch zum Killing von Schistosomen-Sporocysten induzieren (Bayne et al. 1980).

Hahn und Mitarbeiter konnten zeigen, dass innerhalb von 48 Stunden über 80% der Sporocysten von den Hämocyten der resistenten Biomphalarien abgetötet werden. Im Gegensatz dazu liegt die Mortalitätsrate bei den Sporocysten durch die Hämocyten der suszeptiblen Schnecken lediglich bei 10%. Die Inhibierung der NADPH-Oxidase führt zu einer signifikanten Abnahme des Sporocysten-Killings. Derselbe Effekt wird erzielt, wenn die Konzentration des Wasserstoffperoxids ( $H_2O_2$ ) durch die Zugabe von Catalase reduziert wird. Dies lässt den Schluss zu, dass reaktive Sauerstoffmetabolite, insbesondere  $H_2O_2$  eine entscheidende Rolle beim Abtöten der Parasiten spielen (Hahn et al. 2001a).

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Phänotypen liegt in einer höheren Anzahl an Hämocyten in der Hämolymphe resistenter Biomphalarien. Dies führt allerdings nicht zu einer erhöhten Mortalitätsrate, da bei einer Einkapselung immer nur die innerste Hämocytenschicht an der Synthese lysosomaler Enzyme, und somit am Killing beteiligt ist. Ein wesentlicher Vorteil könnte aber dennoch daraus resultieren, da eine höhere Hämocytendichte zum einen eine schnellere Reaktion auf einen eingedrungenen Fremdkörper zulässt, und außerdem eine größere Anzahl von Sporocysten abgewehrt werden kann (Dikkeboom 1988a). Da Hämocyten resistenter Biomphalarien allerdings mehr reaktive

Sauerstoffmetabolite bilden als die empfänglicher Zwischenwirtschnecken, könnte daraus eine höhere Abtötungsrate resultieren (Connors & Yoshino 1990).

Werden Amoebocyte-Producing-Organs (APOs) aus resistenten *Biomphalaria* in suszeptible Schnecken transplantiert, führt das in diesen zu einer verminderten Empfänglichkeit bzw. zu einem erhöhten Killing der Schistosomen-Sporocysten. Dieser Effekt ist in erster Linie auf die von den Hämocyten vermittelte Resistenz zurückzuführen (Sullivan et al. 1995). In weiteren Transplantationsversuchen zeigte sich, dass die übertragene Resistenz auf empfängliche Schnecken auch auf verschiedene Plasmafaktoren des APO zurückzuführen ist (Vasquez & Sullivan 2001).

Weitere Unterschiede zwischen resistenten und suszeptiblen *Biomphalaria glabrata* bestehen bspw. in der Anzahl und Affinität bestimmter Oberflächenrezeptoren auf den Hämocyten (Davids & Yoshino 1998) oder auch hinsichtlich verschiedener spezifischer Antigen-Bindungsstellen auf der Sporocystenoberfläche der Schistosomen (Agner & Granath 1995). Coustau & Yoshino (1994) konnten nach einer Exposition mit Miracidien von *Schistosoma mansoni* an der Hämocytenoberfläche von empfänglichen *Biomphalaria* ein 66-kDa Polypeptid nachweisen, welches bei den resistenten nur sehr schwach bzw. nicht exprimiert wurde.

Die beiden Phänotypen von *Biomphalaria glabrata* lassen sich aber auch von exkretorisch-sekretorischen Proteinen (ESP) der Trematoden in unterschiedlicher Art und Weise beeinflussen. Dabei kann meist eine größere Wirkung dieser Produkte auf die Hämocytenfunktion der suszeptiblen Schnecken beobachtet werden, was letztendlich zu einer ausbleibenden Immunreaktion führt (Connors & Yoshino 1990, Lodes & Yoshino 1990, Davids & Yoshino 1995).

## 1.9 Wirt-Parasit-Beziehungen

Eine erfolgreiche Abwehr von *Schistosoma mansoni* findet lediglich im resistenten Phänotyp der Biomphalarien statt. Trotz des intakten und gut funktionierenden Abwehrsystems gelingt es den Schistosomen jedoch, sich in den empfänglichen Schnecken weiterzuentwickeln. Ermöglicht wird dies vermutlich dadurch, dass der Parasit vom Immunsystem der Schnecken nicht erkannt wird, oder es ihm gelingt, die Abwehrreaktion des Wirtes direkt zu beeinflussen und diese zu unterdrücken. Dazu stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung.

Bei der Molekularen Mimikry werden vom Parasiten Moleküle synthetisiert und an der Schistosomen-Oberfläche präsentiert, die denen des Zwischenwirtes gleichen. Dadurch kann dieser nicht mehr als "fremd" identifiziert werden und so die Abwehr umgehen (Yoshino & Cheng 1978, Yoshino & Bayne 1983, Yoshino 1983).

Eine weitere Möglichkeit, sich der Immunabwehr des Wirtes zu entziehen stellt die Molekulare Maskierung dar. Durch eine passive oder aktive Anlagerung wirtseigener Antigene an das Tegument der Schistosomen können diese vom Abwehrsystem der Biomphalarien nicht mehr als Fremdkörper erkannt werden (McLaren 1984, Bayne et al. 1985, 1986, Bayne & Yoshino 1989).

Lie stellte 1982 die Theorie der Interferenz auf, wonach eine aktive Unterdrückung der Abwehrreaktion des Wirtes durch die eingedrungenen Trematoden stattfindet. Durch die Synthese von bestimmten Molekülen durch den Parasiten kann die Funktion der Hämocyten direkt beeinflusst werden. So können diese Faktoren die Oberflächenrezeptoren verändern oder blockieren (Loker et al. 1992) oder Einfluss auf die Beweglichkeit der Hämocyten nehmen (Lodes & Yoshino 1990, Hertel et al. 2000). Außerdem bewirken exkretorisch-sekretorische Proteine (ESP) eine Abnahme der Phagocytoserate der Hämocyten der Biomphalarien (Connors & Yoshino 1990). Von Serrano und Mitarbeitern (2002) konnte eine immunsuppressive Wirkung des Steroids Hydrocortison auf die Abwehrzellen der Zwischenwirtschnecken nachgewiesen werden. Diese zeigt sich durch eine verringerte Anzahl an Hämocyten und durch eine erhöhte Anzahl an intakten Sporocysten. Des weiteren zählt hierzu, dass die von den Hämocyten synthetisierten reaktiven Sauerstoffmetaboliten Superoxid und Wasserstoffperoxid mittels antioxidativer Enzyme unschädlich gemacht werden können und dadurch ein Abtöten der Parasiten verhindert werden kann (Connors et al. 1991, Zelck & von Janowsky 2003).

## 1.10 Genexpressionsanalysen mittels Differential Display und SSCP

Aufgrund der sehr geringen Anzahl an Hämocyten, die aus der Hämolymphe der Biomphalarien isoliert werden kann, muss zur Durchführung der Untersuchung der differentiellen Genexpression in diesen Zellen eine Methode gewählt werden, die mit wenig Ausgangsmaterial auskommt.

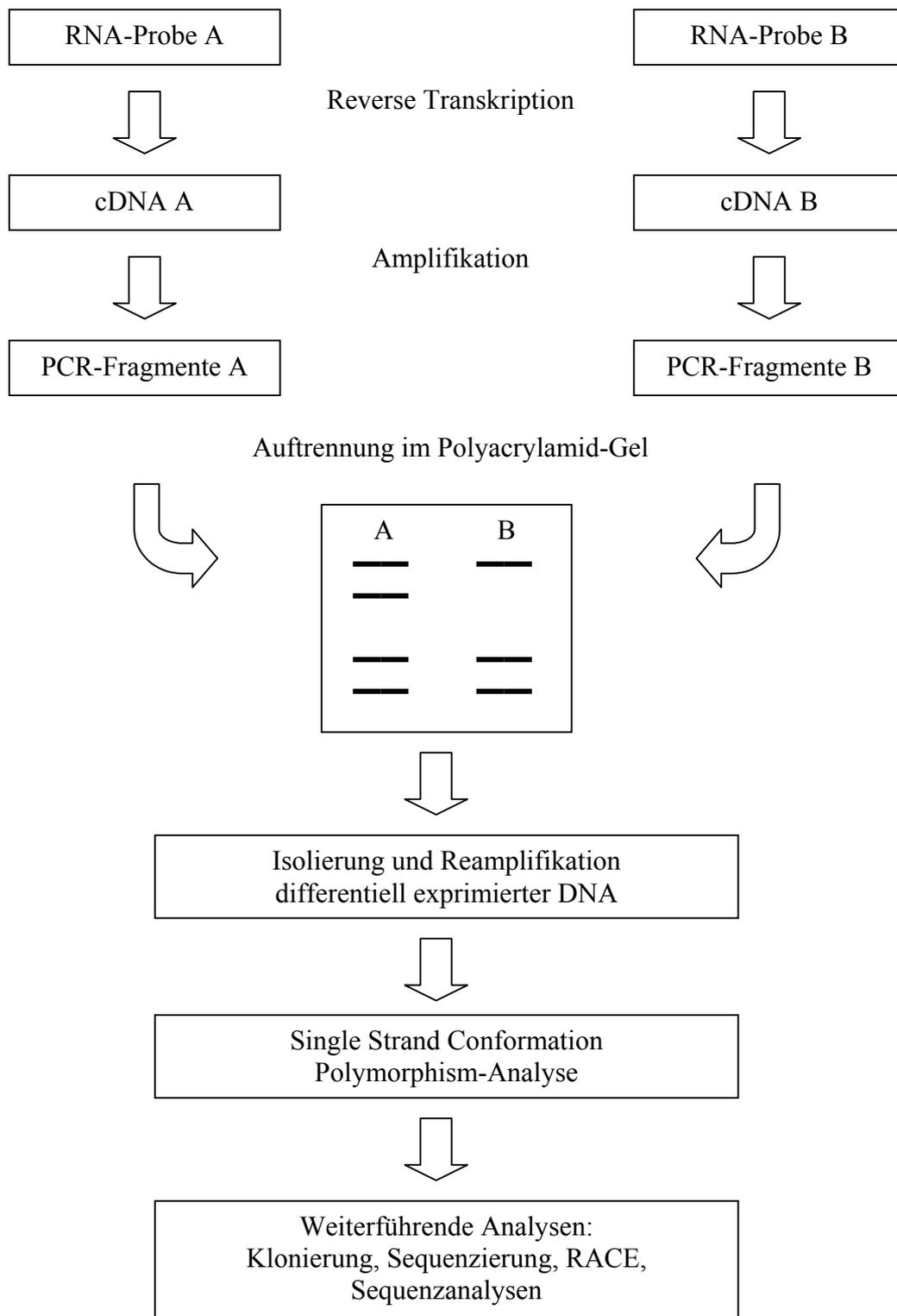
Die von Liang und Pardee (1992) entwickelte Methode des Differential Display stellt ein wichtiges Werkzeug zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen dar. Die Methode kann mit sehr wenig Ausgangsmaterial durchgeführt werden und ist äußerst sensitiv. Außerdem können mehrere Proben gleichzeitig miteinander verglichen und sowohl hoch- und herunterregulierte Gene identifiziert werden. Nachteilig ist allerdings, dass damit viele Falschpositive erzeugt werden und radioaktiv gearbeitet werden muss.

Die Differential Display-Technologie besteht aus einer Reversen Transkription mit drei verschiedenen oligo(dT)-Ankerprimern, wodurch die mRNA der zu untersuchenden Zellen in drei verschiedene Subpopulationen aufgetrennt wird. Während der anschließenden PCR mit den entsprechenden Ankerprimern und einem 13-mer Zufallsprimer werden die cDNAs vervielfältigt und radioaktiv markiert. Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgt in einem Polyacrylamid-Gel. Auftretende Unterschiede im Bandenmuster deuten auf eine differentielle Genexpression hin. Diese DNA-Fragmente werden isoliert und weiter analysiert.

Zur Kontrolle von Falschpositiven kann ein Northern-Blot durchgeführt werden, mit dem jedoch Fragmente gleicher Größe nicht voneinander getrennt werden können, was wiederum zu falschpositiven Signalen führen kann. Außerdem wird dazu sehr viel RNA benötigt.

Eine Alternative stellt die Single Strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP) dar (Mathieu-Daude et al. 1996a). Bei dieser Methode macht man sich die Einzelstrang-Konformation von Nukleinsäuren zunutze. Mit Hilfe der SSCP werden DNA-Fragmente gleicher Größe aber unterschiedlicher Sequenz voneinander getrennt. DNA-Banden, die im DD-Gel übereinander liegen, können so aufgetrennt und die Falschpositiven des Differential Display detektiert werden. Transkripte, die sich dabei als differentiell exprimiert bestätigen werden isoliert, kloniert und sequenziert und anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen.

Die Abfolge der Methoden ist in der Abbildung 4 schematisch dargestellt und wird im Methodenteil ausführlich beschrieben.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Methode des Differential Display (DD) kombiniert mit der SSCP- und den weiterführenden Analysen

## 1.11 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe molekularbiologischer Methoden genetische Unterschiede zwischen den beiden Schnecken-Phänotypen und Veränderungen, die nach einer Parasiteninfektion auftreten dargestellt werden:

### 1. Erstellung der Expressionsprofile von Hämocyten resistenter und susceptibler *Biomphalaria glabrata*

Der Vergleich der Genexpression der Hämocyten von resistenten und susceptiblen Biomphalarien sollte durchgeführt werden, um Unterschiede im Genom der beiden Phänotypen darzustellen. Mit diesem Vergleich sollte nachgewiesen werden, ob es genetische Marker gibt, die mit der Resistenz bzw. der Suszeptibilität der Biomphalarien gegenüber dem Parasiten *Schistosoma mansoni* korrelieren.

### 2. Erstellung der Expressionsprofile von Hämocyten resistenter und susceptibler *Biomphalaria glabrata* während einer Infektion mit *Schistosoma mansoni*

Mit dem Vergleich der Hämocyten-Genexpression zwischen naiven und infizierten Biomphalarien sollte untersucht werden, welche Gene nach und während des Verlaufs einer Schistosomeninfektion hoch- bzw. herunterreguliert werden. Dabei sollten auch Unterschiede und/oder Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Schnecken-Phänotypen aufgezeigt werden.

### 3. Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter DNA-Transkripte

Sämtliche differentiell exprimierte DNA-Transkripte sollten mit Hilfe von Sequenzanalysen identifiziert und charakterisiert werden. Es sollten Genabschnitte und deren Produkte beschrieben werden, die möglicherweise mit der Resistenz bzw. der Suszeptibilität von *Biomphalaria glabrata* in Verbindung stehen, und die eine Rolle während einer Infektion spielen.

### 4. Nachweis der Expression H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generierender SOD und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abbauender CAT

Des Weiteren sollte der Nachweis erbracht werden, ob antioxidative Enzyme, die bei der Abwehr von Fremdkörpern und Parasiten eine wichtige Rolle spielen, in den Hämocyten infizierter Biomphalarien exprimiert werden. Da mit der Methode des Differential Display nicht gezielt nach bestimmten Genen gesucht werden kann, sollte eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt werden. Anhand von Sequenzen der Superoxid-

---

Dismutase (SOD) sowie der Catalase (CAT) verschiedener Organismen sollten Oligonukleotide generiert werden, mit denen es möglich ist, Genabschnitte dieser Enzyme in den Hämocyten der Schnecken zu amplifizieren. Es sollte dabei ein Vergleich der Genexpression in den beiden Phänotypen durchgeführt und untersucht werden, ob Veränderungen der Expression der antioxidativen Enzyme während einer Parasiteninfektion auftreten.

## 2.1 MATERIAL

### 2.1.1 Enzyme

DNaseI	GenHunter, Nashville, USA
DNaseI	Gibco BRL, Eggenstein
Klenow enzyme	Roche, Mannheim
MMLV Reverse Transcriptase	GenHunter, Nashville, USA
Superscript™ II RNaseH- Reverse Transcriptase	Gibco BRL, Eggenstein
SfiI	NEB, Beverly, USA
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden

### 2.1.2 Nukleotide

Desoxynucleosid-Triphosphat Set	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP	Roche, Mannheim
Hexanucleotide Mix (10 x)	Roche, Mannheim

### 2.1.3 Radioisotope

$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]dATP ( $t_{1/2}$ = 25.4 d)	ICN Pharmaceuticals, Eschwege
$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]dCTP ( $t_{1/2}$ = 14.3 d)	ICN Pharmaceuticals, Eschwege

### 2.1.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
M13 forward	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
Bg1 (Aktin)	ATG ACA TGG AGA AGA TCT GGC

Bg2 (Aktin)	TCC ATA CCA AGG AAA GAT GGC
PK1	TGA CCA GAC ATC CAC TTC GTA ACT GTG ACC
PK3	CTA TTT CAT CGA AAG TGT GGG CTC ATA GGC
SOD1	GC(GT) GG(AT) (GC)C(GT) CAT TT(CT) AAT CC
SOD2	CC(AG) CA(AT) GC(AT) A(AC)A CGA (GC)(GC)A CCA GCA TT
SOD8f	TGC CAA GGT CAT CTT CCT TT
SODf	GGA ATC ACG GGA ACA ATC AC
SOD-RACE1	CTG TGC CAT CAT CCC CTG CTA TTA TAT TTC C
CAT1f	GDC GKT TTG CHG TSA ART TYT ACA C
CAT1r	CGR CCM TGM AGC ATY TTR TC
RACE-110.1	AAC TCC AGG ATC TCT GCT TCT GTC TGT TCA
RACE-121.7	TGT GCG ACA TTC TCA GTC ATC TCT GAA CTC
RACE-15.20	AGA GAA GCA AAC GGA GCT CCA CTA AGT CTG

Die oben aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Fa. Roth, Karlsruhe bezogen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
H-T <sub>11</sub> G	AAG CTT TTT TTT TTT G
H-T <sub>11</sub> A	AAG CTT TTT TTT TTT A
H-T <sub>11</sub> C	AAG CTT TTT TTT TTT C
H-AP1	AAG CTT GAT TGC C
H-AP2	AAG CTT CGA CTG T
H-AP3	AAG CTT TGG TCA G
H-AP4	AAG CTT CTC AAC G
H-AP5	AAG CTT AGT AGG C
H-AP6	AAG CTT GCA CCA T
H-AP7	AAG CTT AAC GAG G
H-AP8	AAG CTT TTA CCG C
H-AP22	AAG CTT TTG ATC C
H-AP23	AAG CTT GGC TAT G
H-AP41	AAG CTT ACG GGG T
H-AP42	AAG CTT TGC ACC G
H-AP43	AAG CTT GAA GCG G

H-AP44	AAG CTT CTC CGG A
H-AP47	AAG CTT ATG CCC G
H-AP48	AAG CTT GCG GTG A
H-AP73	AAG CTT AGT TAT C
H-AP74	AAG CTT CAA GTT T
H-AP75	AAG CTT TTA TTC G
H-AP77	AAG CTT TGA ATT C
H-AP78	AAG CTT AAA TCG A
H-AP79	AAG CTT GTC TAA A
H-AP80	AAG CTT CTA TTT C

Die angegebenen Oligonukleotide stammen aus den RNAimage Kits der Fa. GenHunter

### 2.1.5 Molekulargewichtsmarker

DNA molecular weight marker VI	Roche, Mannheim
DNA molecular weight marker VIII	Roche, Mannheim
DNA molecular weight marker 100 bp ladder	Gibco BRL, Eggenstein
DNA molecular weight marker VI (DIG-labeled)	Roche, Mannheim

### 2.1.6 Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	Roche, Mannheim
-----------------------------------	-----------------

### 2.1.7 Kits

Abi Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA
Advantage2 PCR Kit	Clontech, Heidelberg
Gigapack Gold III	Stratagene, La Jolla, USA
Message Clean Kit	GenHunter, Nashville, USA
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNAimage Kit I	GenHunter, Nashville, USA
RNAimage Kit III	GenHunter, Nashville, USA
RNAimage Kit VI	GenHunter, Nashville, USA
RNAimage Kit X	GenHunter, Nashville, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SMART cDNA Library Construction Kit	Clontech, Heidelberg
SMART RACE cDNA Amplification Kit	Clontech, Heidelberg
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Groningen, Holland

### 2.1.8 Versuchstiere/Tiermodell

#### *Biomphalaria glabrata*

resistenter Stamm:	13-16-R1	Department of Zoology, Oregon
suszeptibler Stamm:	M-line	State University, Corvallis, USA

#### *Schistosoma mansoni* (Puerto Rican Strain PR-1)

weibliche Mäuse (CRL:CD-1 (ICR) BR)	Charles River, Sulzfeld
-------------------------------------	-------------------------

### 2.1.9 Bakterienstämme

#### a) TOPO-Cloning:

*Escherichia coli*: *F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG*

#### b) SMART-Cloning:

*Escherichia coli*: *XL1-Blue: endA1 gyrA96 hsdR17 lac<sup>-</sup> recA1 relA1 supE44 thi-1 (F' lacI<sup>q</sup> ZΔM15 proAB Tn10)*

*Escherichia coli*: *BM25.8: supE44 thi Δ(lac-proAB) (F' traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>q</sup> ZΔM15) λimm434 (kan<sup>R</sup>) P1 (cam<sup>R</sup>) hsdR (r<sub>k12</sub>-m<sub>k12</sub>)*

### 2.1.10 Chemikalien

Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Agarose (NEEO Ultra Qualität)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, USA
Chloramphenicol	Roche, Mannheim
DEPC (Diehtylpyrocarbonat)	Sigma, St. Louis, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Gibco BRL, Eggenstein
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Formamid (deionisiert)	Sigma, St. Louis, USA
Gelatine	Sigma, St. Louis, USA
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycogen	Sigma, St. Louis, USA
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	BBL, Cockeyville, USA
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, St. Louis, USA
Maltose	Serva, Heidelberg
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma, St. Louis, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma, St. Louis, USA

tRNA (E. coli MR 600)	Roche, Mannheim
Trypticase peptone	BBL, Cockeyville, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt
X-Gal	Peqlab, Erlangen
Xylencyanol	Sigma, St. Louis, USA

Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p.A. von verschiedenen Firmen bezogen

### 2.1.11 Puffer und Lösungen

DNase-Puffer (10 x)	GenHunter, Nashville, USA
DNase-Puffer (10 x)	Gibco BRL, Eggenstein
First strand buffer (5 x)	Gibco BRL, Eggenstein
Ligase-Puffer (10 x)	Promega, Mannheim
NEBuffer (10 x)	NEB, Beverly, USA
PCR-Puffer (10 x)	Qiagen, Hilden
RT-Puffer (5 x)	GenHunter, Nashville, USA
Acrylamid/bis-Acrylamid-Lösung (19:1; 30%)	Sigma, St. Louis, USA
Blocking solution (10 x)	Roche, Mannheim
CSPD (100 x)	Roche, Mannheim
DIG Easy Hyb	Roche, Mannheim
MDE-Gellösung	FMC Bioproducts, Dänemark

#### ASW (pH 7.2):

FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0.46 µM
CaCl <sub>2</sub>	331 µM
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	101 µM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	312 µM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14.2 µM

PBS (isotonisch; 110 mosm; pH 7.2-7.4):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.67 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.65 mM
NaCl	45 mM

50 x TAE (pH 8.0):

Tris Base	2 M
EDTA	50 mM
Essigsäure	57.1 ml

10 x TBE (pH 8.0):

Tris Base	0.9 M
Borsäure	0.9 M
EDTA	20 mM

10 x Gelauftragungspuffer (Agarose-Gel):

Bromphenolblau	1% (w/v)
Glycerin	50% (v/v)

Gelauftragungspuffer (DD-Gel):

Formamid	95% (v/v)
EDTA	10 mM
Bromphenolblau	0.09% (w/v)
Xylencyanol	0.09% (w/v)

Gelauftragungspuffer (SSCP-Gel):

Formamid	95% (v/v)
NaOH	10 mM
Bromphenolblau	0.09% (w/v)
Xylencyanol	0.09% (w/v)

TE-Puffer (pH 8.0):

Tris Base	10 mM
EDTA	1 mM

20 x SSC (pH 7.0):

NaCl	3 M
NaCitrat	0.3 M

Lambda dilution buffer (pH 7.5):

NaCl	100 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	10 mM
Tris Base	35 mM
Gelatine	0.01% (w/v)

Waschpuffer H1:

2 x SSC; 0.1% SDS

Waschpuffer H2:

0.5 x SSC; 0.1% SDS

Waschpuffer H3:

0.1 x SSC; 0.1% SDS

Puffer 1/Waschpuffer (pH 7.5):

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0.3% (v/v)

Puffer 2/Maleinsäure-Puffer (pH 7.5):

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM

Puffer 3/Detektionspuffer (pH 9.5):

Tris Base	100 mM
NaCl	100 mM

Stripping-Lösung:

NaOH	0.2 M
SDS	0.1% (v/v)

**2.1.12 Bakterienmedien**

Alle hier beschriebenen Medien wurden für 20 min bei 120°C und 1 bar autoklaviert

## a) TOPO-Cloning

LB-Medium (pH 7.0):

Trypticase peptone	10 g/l
Yeast extract	5 g/l
NaCl	10 g/l

LB-Agar (pH 7.0):

LB-Medium (s.o.) und 15 g/l Agar-Agar

SOC-Medium (pH 7.0):

2% Trypticase peptone, 0.5% Yeast extract; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM Glucose

## b) SMART-Cloning

LB-Medium (pH 7.0):

Trypticase peptone	10 g/l
Yeast extract	5 g/l
NaCl	5 g/l

LB-Agar (pH 7.0):

LB-Medium (s.o.) und 15 g/l Agar-Agar

LB/MgSO<sub>4</sub>-Medium (pH 7.0):

LB-Medium (s.o.) und 10 mM MgSO<sub>4</sub>

LB/MgSO<sub>4</sub>-Agar (pH 7.0):

LB/MgSO<sub>4</sub>-Medium (s.o.) und 15 g/l Agar-Agar

LB/MgSO<sub>4</sub>/Maltose-Medium:

LB/MgSO<sub>4</sub>-Medium (s.o.) und 0.2% Maltose

Top-Agar:

LB/MgSO<sub>4</sub>-Medium (s.o.) und 0.7% Agarose

**2.1.13 Geräte**

ABI 373A DNA-Sequencer	Perkin Elmer, Foster City, USA
Bioanalyzer 2100	Agilent Techn., Palo Alto, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Geltrockner Modell 583	Bio-Rad, Hercules, USA
Hybaid Mini Oven MK II	MWG Biotech, Ebersberg
Imaging Screen-K	Bio-Rad, Hercules, USA
Molecular Imager FX System	Bio-Rad, Hercules, USA
Power supply: LKB-ECPS 3000/150	Pharmacia, Freiburg
S2-sequencing Gelelektrophoresekammer	Life Technologies, Paisley, UK
Thermocycler: Hybaid Omnigene	MWG Biotech, Ebersberg
Thermocycler: Primus	MWG Biotech, Ebersberg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, USA
UV Transilluminator (312nm)	Bachofer, Reutlingen
Videosystem: Herolab EASY 429K	Herolab, Wiesloch

### 2.1.14 Verbrauchsmaterialien

BioMax MR-1	Kodak, Rochester, USA
Centri-sep spin columns	Princeton sep., Adelphia, USA
Chroma-spin-400	Clontech, Heidelberg
Einmalküvetten (UVetten)	Eppendorf, Hamburg
Faltenfilter	Machery-Nagel, Düren
Filterpapier	Whatman, Clifton, USA
Hybond <sup>TM</sup> -N (Nylonmembran)	Amersham, Braunschweig
Petri-Schalen (Ø 9/13 cm)	Greiner, Nürtingen
Röntgenentwickler GBX	Kodak, Rochester, USA
Röntgenfixierlösung GBX	Kodak, Rochester, USA

### 2.1.15 Software

Adobe Photoshop D1-2.5  
Power Point  
Quantity One  
Sequence Navigator  
Word 2000

## 2.2 METHODEN

### **2.2.1 Parasitenzyklus und Infektion der Schnecken**

Zur Aufrechterhaltung des Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni* und zur Durchführung der Arbeit mussten weiße Mäuse, die als Endwirte dienten, mit dem Parasiten infiziert werden. Dazu wurden die ca. vier Wochen alten Tiere für drei Stunden in ein Becherglas gesetzt, und dabei pedal mit 200 Cercarien infiziert. Diese Zeit war für die infektiösen Larven ausreichend, die Haut der Mäuse an den Füßen zu penetrieren.

Sechs bis acht Wochen nach der Infektion wurde Mäusekot gesammelt und in 0.9% NaCl suspendiert. Nach mehreren Waschschritten (zwei bis drei, je nach Verschmutzungsgrad) in physiologischer Kochsalzlösung wurde das Sediment mit den darin enthaltenen Schistosomeneiern in einen sogenannten Schlüpfkolben überführt. Dieser wurde mit Artificial Spring Water (ASW) befüllt, bis auf einen Seitenarm vollständig abgedunkelt und so ca. zwei Stunden einer starken Lichtquelle ausgesetzt. Ausgelöst durch die Veränderung der Osmolarität und den optischen Reiz konnten die Miracidien zum Schlüpfen aus den Eihüllen stimuliert werden. Diese wurden mit einer silikonisierten Pasteurpipette aus dem Seitenarm des Kolbens abgenommen.

Bei einer Einzelinfektion wurden jeweils 10 Miracidien gemeinsam mit einer Schnecke in ein kleines Becherglas überführt. Nach zwei Stunden waren alle Miracidien in den Zwischenwirt eingedrungen (Zeitpunkt Null) und die Schnecken wurden in ein größeres Aquarienbecken überführt. Sechs, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden nach der Infektion wurden die Schnecken zur Isolierung der Hämocyten entnommen und getötet.

### **2.2.2 Isolierung der Hämocyten**

Nachdem das Schneckengehäuse mit 70%-igem Ethanol sehr gründlich von allen oberflächlichen Verunreinigungen gesäubert wurde, konnte mit einer Präpariernadel eine Herzpunktion durchgeführt werden. Dabei wurde durch das Gehäuse hindurch direkt in das vorher lokalisierte Herz gestochen und zusätzlich eine kleine Öffnung im Gehäuse geschaffen. Die auslaufende Hämolymphe wurde sofort mit einer Pipette abgesaugt. Da die Hämocyten sehr schnell an Oberflächen aus Glas (Objektträger) adhären, wurde die

Hämolymphe auf ein Stück Parafilm überführt, worauf schwerere Verunreinigungen wie z. B. kleine Schalentile absinken konnten. Nach einigen Minuten wurde die Hämolymphe in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gekühlt. Für jede Probe wurden ca. 1.5 ml Hämolymphe, die aus 10 bis 12 Schnecken gewonnen wurde, gepoolt. Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und 4°C wurden die Hämocyten pelletiert. Das Hämocytenpellet wurde zweimal in PBS (2.1.11) gewaschen und unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden die Hämocyten in 350 µl Lysispuffer (RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit, Qiagen) aufgenommen.

### **2.2.3 RNA-Extraktion aus den Hämocyten**

Um einer Hydrolyse der RNA durch RNasen vorzubeugen, wurden für sämtliche Arbeiten mit RNA sterile Reaktionsgefäße und mit DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Zur Herstellung von H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> wurde doppelt destilliertes Wasser mit 0.1% DEPC versetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend musste der Ansatz für 20 min bei 120°C autoklaviert werden.

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus den isolierten Hämocyten wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. In Gegenwart hoher Konzentrationen an chaotropen Salzen wird dabei die RNA an eine Silikagel-Membran gebunden. Nach mehreren Waschschritten mit ethanolhaltigen Puffern wird die RNA durch das Herabsetzen der Salzkonzentration wieder von der Membran eluiert.

Der Aufschluss der Hämocyten erfolgte durch die Zugabe von 350 µl eines Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffers (RLT-Puffer, 1% β-Mercaptoethanol), außerdem durch mechanische Scherkräfte, die durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Probenmaterials und durch einminütiges vortexen erzeugt wurden. Die Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers des Kits. Die einzige Abweichung bestand in der Verlängerung der Inkubationszeit auf 5 min nach der Zugabe des RW1-Puffers. Die an die Membran der Säule gebundene RNA wurde in zwei Schritten durch die Zugabe von je 32 µl Elutionspuffer (EB-Puffer aus dem Kit) eluiert.

## 2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die meisten Reaktionen beim Arbeiten mit Nukleinsäuren ist es sehr wichtig, deren genaue Konzentration zu kennen. Die richtig eingebrachte Menge an Nukleinsäure in eine Reaktion ist oft ausschlaggebend für deren Erfolg.

Die Konzentrationsbestimmung kann zum einen durch die photometrische Messung der Optischen Dichte (OD) oder durch einen semi-quantitativen Vergleich mit einem bekannten Standard geschehen.

### 2.2.4.1 Photometrische Bestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann durch die Messung ihrer Optischen Dichte bestimmt werden. Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht bei einer Wellenlänge zwischen 250 und 270 nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Ein Absorptionswert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml an doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml bei der Messung von RNA oder einzelsträngiger DNA bzw. 30 - 35 µg/ml bei Oligonukleotiden (Sambrook et al. 1989). Der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  ist dabei ein Maß für die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren. Er sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Quotienten, die außerhalb dieses Bereiches liegen, deuten auf Verunreinigungen durch Proteine hin.

Die RNA-Konzentrationen der isolierten Hämocyten-Proben wurden mit einem Spektralphotometer (Eppendorf) bestimmt. Dazu wurde jede Probe in einem Volumen von 60 µl mindestens dreimal in Einmalküvetten (Eppendorf) gemessen und der Mittelwert daraus errechnet.

### 2.2.4.2 Konzentrationsvergleich im Gel

Zur Bestimmung sehr geringer Nukleinsäurekonzentrationen wurde ein semi-quantitativer Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration im Agarosegel durchgeführt. Dazu wurde ein 1%-iges Agarosegel in eine Petri-Schale (Ø 9 cm, Greiner) gegossen und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.5 µg/ml) versetzt. Jeweils 1 µl der zu bestimmenden DNA-Probe wurde auf die Agarosegel aufgebracht. Als Referenzprobe diente eine Nukleinsäure mit Konzentrationen von 5, 10, 20, 50, 75 und 100 ng/µl DNA, von der

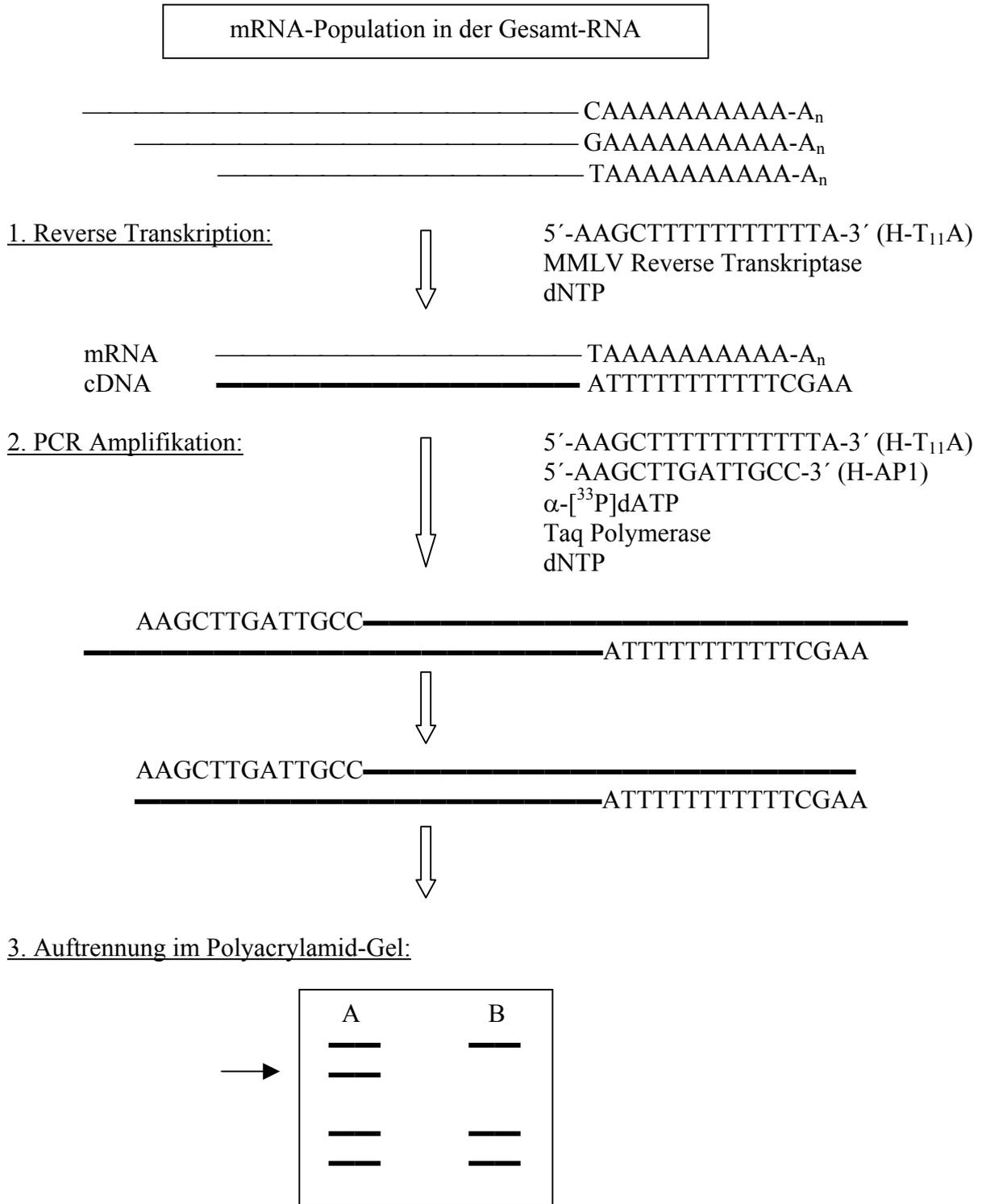
ebenfalls je 1 µl auf die Agarose aufgetropft wurde. Unter UV-Licht konnte dann der DNA-Gehalt der Proben durch den Vergleich mit den Fluoreszenzstärken des Standards abgeschätzt werden.

### **2.2.5 Differential Display**

Die von Liang und Pardee (1992) entwickelte Technik des Differential Display (DD) dient zur Identifizierung und Untersuchung differentiell exprimierter Gene. Mit dieser Methode kann die Expression von Transkripten unter verschiedenen physiologischen Bedingungen, in Zellen verschiedener Entwicklungsstadien oder in unterschiedlichen Zelltypen untersucht werden.

Einer Reversen Transkription der mRNA mit drei verschiedenen oligo(dT)-Primern (2.1.4) folgt eine Amplifikation mittels einer PCR-Reaktion. Anschließend werden die DNA-Fragmente während einer Gelelektrophorese im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Prinzip der Methode ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

Die DD-RT-PCR wurde mit den RNAimage Kits von GenHunter nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Methode des Differential Display. Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase und oligo(dT)-Primern, die an den poly(A)-Schwanz der mRNA binden, wird diese in cDNA umgeschrieben. Bei einer anschließenden Polymerasekettenreaktion (PCR) wird die cDNA amplifiziert und durch den Einbau eines Radionuklids markiert. In einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel werden die DNA-Fragmente anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Differenziell exprimierte Transkripte werden aus dem Gel isoliert und stehen für Nachfolgereaktionen zur Verfügung.

### 2.2.5.1 DNA-Verdau

Bei der Extraktion von RNA kann nicht ausgeschlossen werden, dass eventuell geringe Mengen von genomischer DNA, die bei den Nachfolgereaktionen stören könnten, mitisoliert werden. Um diese DNA aus den Proben zu entfernen, wurde deshalb vor der Reversen Transkription ein DNA-Verdau durchgeführt. Verwendet wurde dafür der Message Clean Kit (GenHunter) bzw. das Enzym DNaseI Amplification Grade (Gibco BRL).

Von jeder Probe wurden 600 ng Gesamt-RNA mit einer Unit des Enzyms DNaseI und dem entsprechenden Reaktionspuffer versetzt. Das Endvolumen der Reaktion war dabei abhängig vom jeweiligen RNA-Gehalt der Proben. Der Ansatz wurde für 15 min bei *RT* inkubiert. Zur Inaktivierung der DNaseI erfolgte die Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 2mM und eine weitere Inkubation für 15 min bei 65°C. Der Reaktionsansatz wurde für mindestens 1 min auf Eis gestellt und musste anschließend sofort in die Reverse Transkription eingesetzt werden, um den Abbau der RNA zu verhindern.

### 2.2.5.2 Reverse Transkription

Beinahe allen mRNAs eukaryontischer Zellen wird beim Prozessieren an deren 3'-Ende eine Kette von ca. 50 - 200 Adenylsäureresten angehängt. Diese Polyadenylierung macht man sich bei der Isolierung von mRNA zunutze, indem man mit Hilfe eines oligo(dT)-Trägermaterials die mRNA von tRNA und ribosomaler RNA trennt. Durch die Verwendung von oligo(dT)-Primern ist zudem gewährleistet, die Gesamtheit der mRNA-Moleküle, d.h. die Gesamtheit der aktiven Gene zum Zeitpunkt der Isolierung der Hämocyten zu erfassen und zu transkribieren.

Die Reverse Transkription der mRNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers des Kits (GenHunter) durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial wurden von jeder Probe exakt 200 ng Gesamt-RNA, die der Reversen Transkriptase als Matrize dient, in die Reaktion eingebracht. Für die cDNA-Erststrangsynthese wurde je einer der drei verschiedenen oligo(dT)-Ankerprimer (H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>C und H-T<sub>11</sub>G) verwendet.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
dNTP (250 $\mu\text{M}$ )	1.6	20 $\mu\text{M}$	GenHunter
RT-Puffer (5 x)	4.0	1 x	GenHunter
H-T <sub>11</sub> N-Primer (2 $\mu\text{M}$ )	2.0	0.2 $\mu\text{M}$	GenHunter
RNA	x	200 ng	
MMLV-RT (100 U/ $\mu\text{l}$ )	1.0	100 U	GenHunter
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	ad 20.0		

N = A, C, G

x = variable Menge, abhängig von der RNA-Konzentration (maximal 11.4  $\mu\text{l}$ )

Zur Denaturierung wurde der Ansatz für 5 min auf 65°C erhitzt. Zehn Minuten nachdem der Reaktionsansatz bei 37°C inkubiert wurde erfolgte die Zugabe des Enzyms MMLV-Reverse Transkriptase. Anschließend wurde für weitere 50 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 75°C.

### 2.2.5.3 Differential Display-PCR

Durch eine PCR-Reaktion wurden die drei Subpopulationen der cDNA amplifiziert und durch den gleichzeitigen Einbau von  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]dATP radioaktiv markiert. Als Oligonukleotide für diese Reaktion dienten zum einen derselbe oligo(dT)-Primer, der bei der Reversen Transkription verwendet wurde, und zum anderen einer der 13-mer Zufallsprimer aus den RNImage Kits (2.1.4).

Der PCR-Ansatz wurde wie folgt zusammenpipettiert:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
dNTP (25 $\mu\text{M}$ )	1.6	2 $\mu\text{M}$	GenHunter
PCR-Puffer (10 x)	2.0	1 x	Qiagen
H-T <sub>11</sub> N-Primer (2 $\mu\text{M}$ )	2.0	0.2 $\mu\text{M}$	GenHunter
H-AP-Primer (2 $\mu\text{M}$ )	2.0	0.2 $\mu\text{M}$	GenHunter
Taq (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0.2	1 U	Qiagen
$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]dATP	0.25	2.5 $\mu\text{Ci}$	ICN
cDNA	2.0	20 ng	
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 20.0		

N = A, C, G

Das Cycling-Programm bestand aus 40 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 30 sec, einem 2-minütigen Primer-Annealing bei 40°C und einer Synthesephase für 30 sec bei 72°C. Abschließend wurde die Reaktion für 5 min bei 72°C inkubiert.

#### 2.2.5.4 Auftrennung der cDNA durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Unterschiede in der Genexpression der zu vergleichenden Proben darzustellen, wurden die amplifizierten DNA-Fragmente nach der DD-PCR auf ein denaturierendes 6%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und während einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

Zusammensetzung der Acrylamid-Gellösung:

Komponenten	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Acrylamid	28.5 g	19:1	Sigma
bis-Acrylamid	1.5 g		Sigma
oder:			
Fertiglösung (30%)	100 ml	6%; 19:1	Sigma
Harnstoff	250 g	8 M	Roth
10 x TBE	50 ml	1 x	
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 500 ml		

Der Ansatz musste leicht erwärmt werden damit sich der Harnstoff lösen konnte. Anschließend wurde die Acrylamidlösung filtriert (Faltenfilter, Machery-Nagel) und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

75 ml der Gel-Lösung wurden mit 56 µl TEMED und 310 µl frisch angesetzttem APS (10%) gemischt und mit Hilfe einer 20 ml Glaspipette sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Anschließend wurde eine Schablone mit 36 Taschen in das Gel eingesetzt. Nach einer Stunde war das Gel auspolymerisiert und die Schablone konnte wieder entnommen werden. Um sämtliche Gelreste aus den Taschen zu entfernen, wurden diese gründlich mit 1 x TBE-Puffer (2.1.11) ausgespült. Die Glasplatten wurden in die S2-sequencing Gelelektrophorese-Apparatur (Life Technologies) eingespannt und deren Kammern mit dem Laufpuffer (1 x TBE) befüllt. Anschließend erfolgte ein Gelvorlauf für 30 min bei einer konstanten Leistung von 50 Watt.

Jeweils 3.5 µl einer Probe aus der DD-PCR wurden mit 2 µl DD-Gelauftragspuffer (2.1.11) versetzt, für 3 min bei 80°C inkubiert und sofort auf Eis transferiert. Die Geltaschen wurden mit jeweils 5 µl der denaturierten Proben beladen und der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von ca. 1700 V und einer konstanten Leistung von 60 W für ungefähr 4 Stunden. Zur Bestimmung der Größe der Fragmente wurde ein markierter DNA-Längenstandard (s. 2.2.5.5) ebenfalls mit auf das Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurden die Glasplatten voneinander getrennt und das Gel auf ein Filterpapier (Whatman) aufgezogen. Das Gel wurde mit einer dünnen Folie bedeckt und in einem Geltrockner (Bio-Rad) für 2 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

#### 2.2.5.5 Marker-labeling

Um die Größe der im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten DNA-Fragmente aus der Differential-Display-PCR bestimmen zu können, musste ein DNA-Längenstandard mit einem Radioisotop markiert werden. Dafür wurde eine 100 bp-Leiter (100 - 2000 bp, Gibco BRL) verwendet und nach der Methode des Random Primed Labelings markiert (Feinberg & Vogelstein 1984). Ein Gemisch aus Hexanukleotiden, in dem alle möglichen Basenkombinationen enthalten sind, bindet dabei als Primer an die zu markierende DNA. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms erfolgt anschließend die Synthese des komplementären Gegenstrangs, wobei ein radioaktiv markiertes Nukleotid (hier:  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]dCTP) in diesen miteingebaut wird.

Die Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
Hexanukleotide-Mix (10 x)	2.0	1 x	Roche
dATP (0.5 mM)	1.0	25 $\mu\text{M}$	Roche
dGTP (0.5 mM)	1.0	25 $\mu\text{M}$	Roche
dTTP (0.5 mM)	1.0	25 $\mu\text{M}$	Roche
100 bp-ladder	0.5	500 ng	Roche
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 15.0		

Um den DNA-Marker zu denaturieren, wurde der Reaktionsansatz für 5 min auf 94°C erhitzt. Anschließend wurde folgendes hinzupipettiert:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
Klenow enzyme (2 U/ $\mu\text{l}$ )	2.0	4 U	Roche
$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]dCTP	1.5	15 $\mu\text{Ci}$	ICN
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 20.0		

Es erfolgte eine weitere Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Zur Fällung der DNA wurde dem Reaktionsansatz folgendes zugegeben:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Hersteller
tRNA (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	2.0	Roche
NaAc (3 M)	2.5	
EtOH (100%)	70.0	Merck

Nach einer Inkubationszeit von mindestens einer Stunde bei -70°C wurde der Ansatz 30 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Alkohol wurde vollständig abgenommen und das Pellet mit 50  $\mu\text{l}$  EtOH (85%) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 130000 U/min und dem vollständigen Abziehen des Ethanol konnte das DNA-Pellet in 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> gelöst werden.

### 2.2.5.6 Autoradiografie und Verwendung eines Imaging Screens

Zur Visualisierung der aufgetrennten und radioaktiv markierten DNA wurde ein Röntgenfilm (BioMax MR-1, Kodak) auf das getrocknete Gel aufgelegt. Die Exposition erfolgte bei *RT* für eine Dauer von 48 bis 72 Stunden. Die Lage des Films auf dem Gel wurde durch mehrerer Perforationen markiert, um eine spätere Zuordnung des Bandenmusters zu ermöglichen.

Durch das Auflegen eines Imaging Screen-K (Bio-Rad) wurde eine wesentlich schnellere Auswertung des Bandenmusters ermöglicht. Nach einer Expositionszeit von 60 bis 90 Minuten kann dieser mit Hilfe des Molecular Imager FX Systems (Bio-Rad) eingelesen und das Bandenmuster des DD-Gels am Computer analysiert werden.

### 2.2.5.7 Isolierung von DNA aus DD-Gelen

Nach der Entwicklung des Röntgenfilms wurden die Bandenmuster des DD-Gels auf Expressionsunterschiede hin untersucht. Differentiell auftretende Banden wurden aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert.

Dazu wurde der Röntgenfilm auf dem Gel fixiert und die zu isolierenden Banden auf diesem markiert. Die DNA-Fragmente wurden mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in 120  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$  aufgenommen. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei *RT* wurde das Gelstück für 15 min gekocht und anschließend 2 min bei 13000 U/min zentrifugiert.

Dem Überstand wurde folgendes hinzupipettiert:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Hersteller
Glycogen (10 mg/ml)	5.0	Sigma
NaAc (3 M)	10.0	
EtOH (100%)	450.0	Merck

Der Ansatz wurde für mindestens 30 min bei  $-80^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 200  $\mu\text{l}$  kaltem EtOH (85%) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 13000 U/min wurde der ÜS vollständig abgenommen und das Pellet in 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$  gelöst. Der Ansatz musste dazu für 20 min bei  $32^\circ\text{C}$  inkubiert werden.

## 2.2.6 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Zur Verifizierung der differentiellen Genexpression der aus dem Differential Display-Gel isolierten DNA-Banden wurde eine SSCP-Analyse, die auf der Einzelstrang-Konformation von Nukleinsäuren basiert, durchgeführt. Zum einen können sehr schwach exprimierte DNA-Fragmente, die im DD-Gel nicht sichtbar gemacht werden konnten, durch eine erneute Amplifikation im SSCP-Gel dargestellt werden. Des Weiteren kann nicht gewährleistet werden, dass eine Bande aus dem DD-Gel lediglich durch ein DNA-Transkript repräsentiert wird. DNA-Fragmente gleicher Größe aber unterschiedlicher Sequenz können im DD-Gel übereinander liegen. Durch deren unterschiedliche Einzelstrang-Konformation und dem damit einhergehenden Laufverhalten im Gel ermöglicht die Methode des SSCP die Auftrennung von DNA-Fragmenten gleicher Größe.

### 2.2.6.1 Reamplifikation der DNA-Fragmente aus dem DD-Gel

Zur Durchführung der SSCP-Analyse mussten die aus dem DD-Gel isolierten DNA-Banden während einer PCR-Reaktion erneut amplifiziert und radioaktiv markiert werden. Es war darauf zu achten, dass dabei dieselbe Primerkombination wie bei der DD-PCR wiederverwendet wird.

Pipettierschema des Reaktionsansatzes:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
dNTP (250 $\mu\text{M}$ )	3.2	20 $\mu\text{M}$	GenHunter
10 x PCR-Puffer (10 x)	4.0	1 x	Qiagen
H-T <sub>11</sub> N-Primer (2 $\mu\text{M}$ )	4.0	0.2 $\mu\text{M}$	GenHunter
H-AP-Primer (2 $\mu\text{M}$ )	4.0	0.2 $\mu\text{M}$	GenHunter
Taq (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0.4	2 U	Qiagen
$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]dATP	0.25	2.5 $\mu\text{Ci}$	ICN
DNA	4.0		
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 40.0		

N = A, C, G

Während der Anfangsphase einer PCR werden DNA-Abschnitte höherer Konzentration stärker amplifiziert als DNA-Fragmente, die in geringerer Menge in einer Probe vorliegen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die beiden am intensivsten auftretenden Banden im SSCP-Gel die Einzelstränge des zu untersuchenden DNA-Fragmentes darstellen. Die Effizienz der Amplifikation dieser Produkte geht allerdings in den späteren Zyklen der Reaktion schneller zurück als die der PCR-Produkte mit niedriger Konzentration. Das bedeutet, dass wenn die Reaktion ihr Plateau erreicht, die ursprünglichen Konzentrationsunterschiede ausgeglichen und sämtliche in dem Reaktionsansatz befindlichen DNA-Fragmente gleichermaßen stark amplifiziert werden. Dieser Effekt beruht auf einer zunehmenden Rehybridisierung von DNA-Fragmenten während der späteren Phase der PCR und wird als Cot-Effekt (Suzuki & Giovannoni 1996, Mathieu-Daude et al. 1996b) bezeichnet. Um diesen zu vermeiden, mussten die Reaktionsbedingungen geändert und die Anzahl der Zyklen der PCR auf 25 reduziert werden.

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

94°C-30 sec; 40°C-30 sec; 72°C-1 min: 25 Zyklen  
72°C-5 min

#### 2.2.6.2 Auftrennung im SSCP-Gel

Die aus dem Differential Display-Gel isolierten und reamplifizierten DNA-Fragmente wurden in einem SSCP-Gel erneut aufgetrennt.

Zusammensetzung der Lösung für ein SSCP-Gel:

Komponenten	Menge	Endkonzentration	Hersteller
MDE-gel solution (2 x)	18.75 ml	0.5 x	FMC Bioproducts
10 x TBE	4.5 ml	0.6 x	
APS (10%)	300 µl	0.04%	Serva
TEMED	30 µl	0.04%	Roth
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 75 ml		

Das Gel wurde wie schon unter 2.2.5.4 beschrieben gegossen und war nach 2 Stunden auspolymerisiert. Von jeder reamplifizierten Probe wurde 1  $\mu$ l mit 4.5  $\mu$ l des SSCP-Gelauftragspuffers (2.1.11) gemischt. Nach einer 3-minütigen Inkubation bei 94°C wurde die Probe sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurden je 5  $\mu$ l einer Probe auf das SSCP-Gel aufgetragen. Dabei war darauf zu achten, dass neben jeder differentiell aufgetretenen und reamplifizierten Bande aus dem DD-Gel auch der entsprechende "negative" Bereich der Vergleichsprobe aufgetragen wurde.

Der Gellauf wurde bei *RT* durchgeführt und als Laufpuffer wurde 0.6 x TBE-Puffer verwendet. Bei einer konstanten Leistung von 6 W und einer angelegten Spannung von ca. 750 V dauerte die elektrophoretische Auftrennung zwischen 12 und 14 Stunden. Nachdem das Gel getrocknet war erfolgte auch hier wie unter 2.2.5.6 beschrieben eine Autoradiografie.

### 2.2.6.3 Isolierung von DNA aus SSCP-Gelen

Nach der Entwicklung und Auswertung des Röntgenfilms konnten die weiter zu untersuchenden DNA-Banden aus dem SSCP-Gel ausgeschnitten werden. Zusammengehörende DNA-Einzelstränge im SSCP-Gel erkennt man daran, dass sie dieselbe Bandenintensität haben (s. 2.2.6.1). Dabei waren vor allem die DNA-Fragmente der Proben, die ein unterschiedliches Bandenmuster nach der SSCP-Analyse zeigten, von Interesse. Proben, bei denen das Muster der Banden nach dieser Auftrennung identisch war, besitzen zwar dieselben DNA-Sequenzen, deuten aber durch das Ergebnis aus dem DD-Gel auf eine unterschiedliche Genexpression hin. Auch diese Banden wurden aus dem Gel isoliert und die quantitativen Unterschiede der Proben analysiert. Die Isolierung erfolgte auf dieselbe Weise wie unter 2.2.5.7 beschrieben.

### 2.2.6.4 Reamplifikation der isolierten DNA-Fragmente aus dem SSCP-Gel

Nach der Fällung der aus dem SSCP-Gel isolierten DNA erfolgte eine erneute Reamplifikation mittels PCR unter Verwendung derselben Primerkombination wie in den vorangegangenen Reaktionen.

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
dNTP (250 $\mu\text{M}$ )	3.2	20 $\mu\text{M}$	GenHunter
10 x PCR-Puffer (10 x)	4.0	1 x	Qiagen
H-T <sub>11</sub> N-Primer (2 $\mu\text{M}$ )	4.0	0.2 $\mu\text{M}$	GenHunter
H-AP-Primer (2 $\mu\text{M}$ )	4.0	0.2 $\mu\text{M}$	GenHunter
Taq (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0.4	2 U	Qiagen
DNA	4.0		
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 40.0		

N = A, C, G

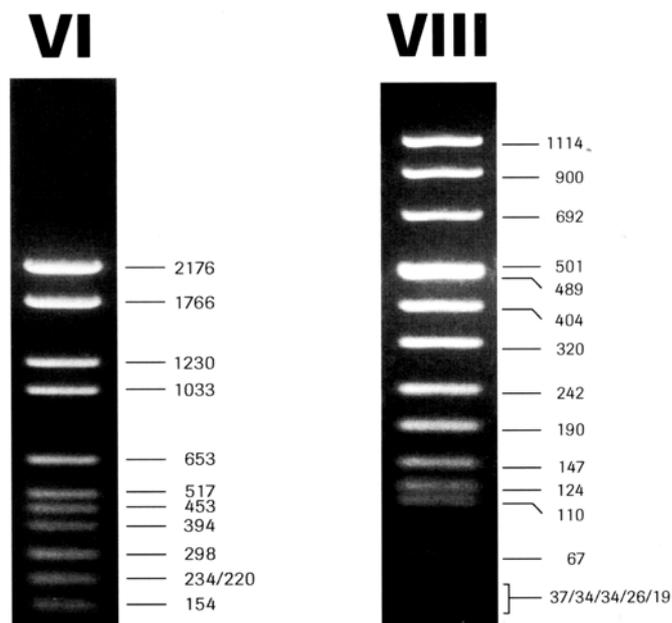
Die PCR-Bedingungen waren dabei folgende:

94°C-30 sec; 40°C-2 min; 72°C-30 sec: 25 Zyklen

72°C-5 min

### **2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von amplifizierten DNA-Fragmenten erfolgte in 1.2 bis 1.8%-igen Agarosegelen. Zur Herstellung eines 1%-igen Gels wurden 500 mg Agarose mit 50 ml 1 x TAE-Puffer (2.1.11) erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurden 2.5  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (1% in H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>, Endkonzentration 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugegeben. Der Ansatz wurde nach Abkühlen auf ca. 60°C in eine horizontale Gelkammer (Stratagene) gegossen und nach dem Auspolymerisieren mit dem Elektrophorese-Puffer (1 x TAE, s. 2.1.11) überschichtet. Ein Zehntel des Volumens jeder Probe wurde mit 7  $\mu\text{l}$  Agarose-Gelauftragspuffer (2.1.11) gemischt. Um die Größe der DNA-Banden zu bestimmen, wurden 0.7  $\mu\text{l}$  der Molekulargewichtsmarker VI bzw. VIII (Roche, Fragmentgrößen s. Abb. 6) mit auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 70 bis 90 V für ca. 30 min. Die aufgetrennten DNA-Banden konnten anschließend unter UV-Licht (312 nm) analysiert und dokumentiert werden.



**Abbildung 6:** Bandenmuster der Molekulargewichtsmarker VI und VIII dargestellt in einem 2%-igen Agarosegel. Die Zahlen geben die Größe der einzelnen DNA-Fragmente in Basenpaaren an (nach Roche).

### 2.2.8 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Es wird dabei eine Zentrifugationssäule mit einer Silikagel-Membran verwendet, die in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen eine große Affinität zu Nukleinsäuren besitzt, und diese bindet (s. 2.2.3).

Der unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnittene Agaroseblock mit der zu isolierenden DNA-Bande wurde mit QG-Puffer (im Kit enthalten) versetzt und für 10 min bei 50°C im Thermomixer (Eppendorf) aufgeschmolzen. Sollte DNA mit einer Größe < 500 bp aus dem Gel isoliert werden, wurde dem Ansatz pro 100 mg Agarose ein VT Isopropanol zugegeben. Die Probe wurde anschließend auf eine Säule aufgetragen und für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert, wodurch die DNA an die Membran gebunden wurde. Durch mehrere Waschschriffe wurden Verunreinigungen, wie Reste von Agarose oder Ethidiumbromid aus dem Ansatz entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 30 - 50 µl EB-Puffer (im Kit enthalten) nach einer Inkubationszeit von 2 min durch Zentrifugation für 1 min bei 10000 x g von der Membran eluiert.

### 2.2.9 Aufreinigung von Nukleinsäuren

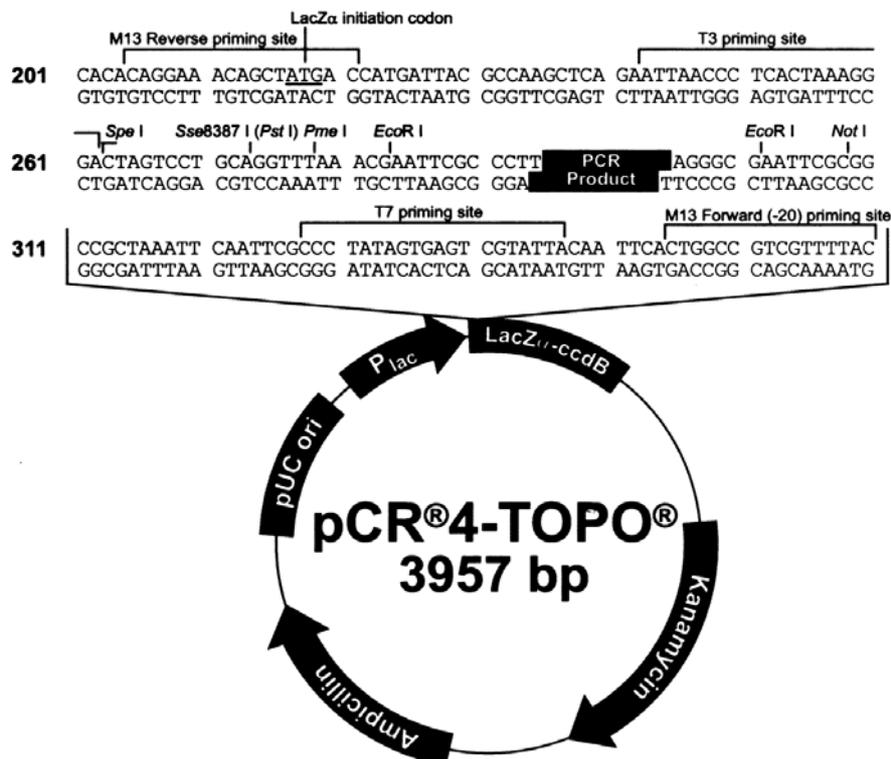
Das Prinzip der Reinigung beruht, wie unter 2.2.8 schon beschrieben, auf der Bindung der DNA an eine Silikagel-Membran in einer Zentrifugationssäule. Auf diese Weise werden PCR-Produkte von Primern, Nukleotiden, Polymerasen oder Salzen, die bei nachfolgenden enzymatischen Reaktionen stören können, getrennt und gereinigt.

Die Reinigung von PCR-Produkten wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Das zu reinigende PCR-Produkt wurde mit dem fünffachen Volumen an PB-Puffer (im Kit enthalten) gemischt und durch Zentrifugation an die Membran einer QIAquick spin Säule gebunden. Nach dem Waschschrift in 750  $\mu$ l PE-Puffer (im Kit enthalten) wurde die Säule ein weiteres Mal zentrifugiert, um die Ethanol-Reste des Puffers vollständig zu entfernen. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte durch die Zugabe von 30 - 50  $\mu$ l EB-Puffer (im Kit enthalten) und einer 2-minütigen Inkubation.

### 2.2.10 Klonierung von Nukleinsäuren

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurde der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Der pCR4-TOPO-Plasmidvektor (s. Abb. 7), der in linearisierter Form vorliegt, wurde durch einen 3'-Thymidin-Überhang speziell für das Klonieren von PCR-Produkten entwickelt. Die Taq-Polymerase besitzt die Eigenschaft durch eine Terminale-Transferase-Aktivität ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende von PCR-Produkten anzuhängen. Über eine kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I wird das PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Das Plasmid enthält die Sequenzen zweier Resistenzgene (Ampicillin und Kanamycin), sowie ein Letalgen (*ccdB*), in dessen Sequenzbereich die Klonierungsstelle liegt. Wird ein PCR-Produkt erfolgreich in den Vektor ligiert, wird die Expression dieses Gens unterbrochen. Dies hat zur Folge, dass nur positiv Rekombinante nach der Transformation der Bakterien wachsen können. Ein Blue-White-Screening mit IPTG und X-Gal entfällt deshalb.



**Abbildung 7:** Darstellung des pCR4-TOPO-Vektors mit den Resistenzgenen für Ampicillin und Kanamycin. Die Klonierungstelle liegt innerhalb des Leserasters für das Letalgen *ccdB* und wird von den Bindungsstellen der Oligonukleotide T3 und T7, bzw. M13 reverse und M13 forward flankiert. Außerdem sind die Schnittstellen einiger Restriktionsenzyme angegeben (nach Invitrogen)

Sämtliche aus den SSCP-Gelen isolierten DNA-Fragmente sowie die Produkte aus der 5'-RACE-PCR wurden vor ihrer Sequenzierung kloniert. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in einer Konzentration von 50 - 100 ng in die Ligation eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie angegeben zusammen und wurde für exakt 5 min bei *RT* inkubiert, bevor er anschließend in die Transformation eingesetzt wurde.

Komponenten	$\mu$ l	Endkonzentration	Hersteller
PCR-Produkt	0.5 - 4.0	50 - 100 ng	
TOPO-Vector	1.0		Invitrogen
Salt-solution	1.0		Invitrogen
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 6.0		

Zwei  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes wurden zu den chemokompetenten *E. coli*-Bakterien (2.1.9) gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Durch eine Hitzeschockbehandlung bei  $42^\circ\text{C}$  wurde die Bakterienwand für den Vektor durchlässig gemacht. Nach der Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium (2.1.12) wurden die Bakterien für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden diese auf LB-Agarplatten (50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin, 2.1.12a) ausplattiert und bei  $37^\circ\text{C}$  üN inkubiert.

### 2.2.11 Plasmidpräparation

Zum Animpfen von 3 ml LB-Medium (50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin, 2.1.12a) wurde unter sterilen Bedingungen eine einzelne Bakterienkolonie (Klon) von einer frisch ausgestrichenen Agarplatte gepickt. Der Ansatz wurde bei  $37^\circ\text{C}$  und 250 rpm über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend für 10 min bei 4500 U/min pelletiert und der ÜS verworfen. Die weitere Prozedur der DNA-Isolierung wurde nach den Protokoll-Angaben des Kit-Herstellers durchgeführt. Eluiert wurde in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  EB-Puffer (im Kit enthalten).

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Das Prinzip der Isolierung basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien und dem Ausfällen von genomischer DNA, Proteinen und Zelltrümmern durch die im Kit enthaltenen Lysis- und Neutralisierungspuffer. Nach dem Binden der DNA an eine Silikagel-Membran und dem Entfernen von Verunreinigungen konnte die Plasmid-DNA wieder von der Membran eluiert werden.

### 2.2.12 Isolierung der klonierten DNA aus dem Plasmid

Die Isolierung des klonierten DNA-Fragments kann durch einen Restriktionsverdau mit Endonukleasen erfolgen. Die Schnittstellen der Enzyme im Klonierungsvektor zeigt die Abbildung 7. Da allerdings keine Kenntnis der Sequenz des klonierten DNA-Abschnitts vorliegt, besteht die Gefahr, dass bei der Reaktion auch dieser Bereich verdaut wird.

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung besteht in der Amplifikation der klonierten DNA mittels einer PCR. Die Klonierungsstelle des pCR4-TOPO-Vektors wird von den Bindungsstellen der Primer T3 und T7, bzw. M13 reverse und M13 forward flankiert.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
dNTP (10 mM)	0.4	0.1 mM	Roche
PCR-Puffer (10 x)	4.0	1 x	Qiagen
T7/M13 forward (20 $\mu\text{M}$ )	0.8	0.4 $\mu\text{M}$	Invitrogen
T3/M13 reverse (20 $\mu\text{M}$ )	0.8	0.4 $\mu\text{M}$	Invitrogen
Taq (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0.4	2 U	Qiagen
Plasmid-DNA	1.0		
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 40.0		

Die DNA wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen amplifiziert:

94°C-1 min; 55°C-1 min; 72°C-1 min: 25 Zyklen  
72°C-10 min

Das Ergebnis der Amplifikation der Plasmid-DNA wurde anschließend auf einem 1.5%-igen Agarosegel dargestellt. Das zu sequenzierende DNA-Fragment wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Agarosegel isoliert und gereinigt (s. 2.2.8). Bevor die Probe in die Cycle-sequencing-Reaktion eingesetzt werden konnte musste deren Reinheit überprüft und die Konzentration bestimmt werden. Dies geschah durch den erneuten Auftrag eines Aliquots des isolierten DNA-Fragments auf ein Agarosegel. Der DNA-Gehalt der Probe wurde wie unter 2.2.4 beschrieben bestimmt.

### 2.2.13 Anlegen von Dauerkulturen

Mit einer sterilen Impföse wurde eine Bakterienkolonie von der Agarplatte gepickt und damit 3 ml LB-Medium (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin, 2.1.12a) angeimpft. Der Ansatz wurde bei 37°C und 250 rpm üN inkubiert.

Die Übernacht-Kultur wurde für 10 min bei 4500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 2 ml LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden 150  $\mu\text{l}$  steriles Glycerin zu 850  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension pipettiert und für mindestens 1 min gevortext. Die Bakterien wurden dann bei -70°C gelagert.

### 2.2.14 Cycle-sequencing

Die Sequenzier-Reaktion wurde mit dem Abi Prism Dye Terminator Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine modifizierte Form der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977). Das zu sequenzierende DNA-Fragment wird während einer PCR-Reaktion amplifiziert und dabei durch den Einbau von Didesoxynucleosid-Triphosphaten (ddNTP), die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe tragen, markiert. Als Starter für die Synthese-Reaktion dienen jeweils die Primer, deren Sequenzen die Klonierungsstelle des Vektors flankieren. DNA-Fragmente mit einer Größe von über 400 bp wurde von beiden Seiten sequenziert. In die Cycle-sequencing-Reaktion sollte eine DNA-Menge von 100 - 150 ng eingesetzt werden.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
Big Dye Terminator Mix	4.0		Perkin Elmer
DNA	x	100 - 150 ng	
Primer (2 $\mu\text{M}$ )	3.0	0.3 $\mu\text{M}$	s. 2.1.4
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 20.0		

x = variables Volumen, abhängig von der DNA-Konzentration

Reaktionsbedingungen:

96°C-30 sec; 50°C-15 sec; 60°C-4 min: 25 Zyklen

### 2.2.15 Reinigung der markierten Proben und Sequenzierung

Nach dem Cycle-sequencing wurde der Reaktionsansatz mit Centri-sep spin columns (Princeton sep.) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Dabei wurden Reste von Puffer, Primer und der markierten Nukleotide, die bei der Sequenzierung zu einem starken Hintergrund führen, entfernt. Die Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge vollständig eingengt und anschließend auf ein 6%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die automatische Sequenzierung wurde mit dem ABI 373A DNA-Sequencer (Perkin Elmer) über Nacht durchgeführt.

### **2.2.16 Auswertung der DNA-Sequenzen und Homologiesuche**

DNA-Fragmente mit einer Länge von über 400 bp wurden von beiden Seiten sequenziert. Das Aneinanderfügen der Basenabfolgen zu einer vollständigen Sequenz erfolgte mit Hilfe einer speziellen Software, dem Sequence Navigator (Perkin Elmer). Die Suche nach Homologien zu bereits bekannten Gensequenzen wurde mit Hilfe von BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al. 1990) durch einen Abgleich gegen die verschiedenen Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) vorgenommen. Die Translation der Nukleinsäure- in Aminosäuresequenzen und die Suche nach ORFs erfolgte unter Verwendung unterschiedlicher Software auf den Homepages verschiedener Institute und Organisationen (siehe Anhang). Der AS-Vergleich wurde mit dem FASTA-Programm in den Datenbanken des European Bioinformatics Institutes durchgeführt (Pearson & Lipman 1988).

### **2.2.17 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)**

Die Methode der RACE (Frohman 1993) ermöglicht die Amplifikation von unbekanntem Sequenzen am 3'- oder 5'-Ende von cDNAs. Dadurch lässt sich die gesamte Länge eines unbekanntem Gens identifizieren. Sie kommt mit einer sehr geringen Menge an RNA als Ausgangsmaterial aus und setzt sich aus einer cDNA-Synthese der mRNA und einer anschließenden PCR-Reaktion zusammen. Die aus dem Differential Display-Gel isolierten DNA-Fragmente wurde alle über einen oligo(dT)-Primer isoliert und amplifiziert, d.h., sie repräsentieren jeweils das 3'-Ende der jeweiligen mRNA. Um die volle Länge dieser Fragmente zu erhalten, musste deshalb eine 5'-RACE durchgeführt, die RNA also in 5'-Richtung verlängert werden.

Für die Durchführung der 5'-RACE-PCR wurde der SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) verwendet und nach den Protokollangaben des Herstellers vorgegangen.

#### 2.2.17.1 cDNA-Synthese

Die MMLV-Reverse Transkriptase hat die Eigenschaft, über eine Terminale-Transferase-Aktivität einen Cytosin-Rest (meist 3 bis 5) an das 3'-Ende der neu synthetisierten cDNA anzuhängen, sobald sie das 5'-Ende der mRNA erreicht hat. An diesen (dC)-Überhang kann nun ein Oligonukleotid mit einem entsprechenden Guanin-Abschnitt binden, und dient somit

wiederum der RT als ein verlängertes Template. Die RT synthetisiert über das Ende der mRNA hinaus eine vollständige cDNA, an deren Ende sich zusätzlich die bekannte Sequenz des Oligonukleotids befindet.

Als Ausgangsmaterial und Matrize für die Reverse Transkriptase diente die aus den Abwehrzellen des entsprechenden Schneckenstamms isolierte Gesamt-RNA, die wie unter 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben aus dem Probenmaterial isoliert wurde. Zur Herstellung einer 5'-RACE cDNA kann eine Menge zwischen 50 ng und 1 µg Gesamt-RNA in die Reaktion eingebracht werden.

Komponenten	µl	Endkonzentration
Gesamt-RNA	3.0	50 ng - 1 µg
CDS Primer (10 µM)	1.0	1 µM
SMART II oligo (10 µM)	1.0	1 µM
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	ad 5.0	

Die RNA und die Primer wurden für 2 min bei 70°C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Es wurde dann folgendes hinzupipettiert:

Komponenten	µl	Endkonzentration	Hersteller
dNTP (10 mM)	1.0	1 mM	Roche
First Strand Buffer (5x)	2.0	1 x	Gibco BRL
DTT (20 mM)	1.0	2 mM	Gibco BRL
MMLV-RT Superscript (200 U/µl)	1.0	200 U	Gibco BRL
Gesamt	10.0		

Die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde für 90 min bei der für dieses Enzym optimalen Temperatur von 42°C durchgeführt. Anschließend erfolgte die Verdünnung des Ansatzes durch Zugabe eines Tricin-EDTA-Puffers (im Kit enthalten). Es wurden

- a) 20 µl zugegeben, wenn das Ausgangsmaterial < 200 ng Gesamt-RNA, bzw.
- b) 100 µl, wenn das Ausgangsmaterial > 200 ng Gesamt-RNA war.

Um die Reaktion zu stoppen, erfolgte abschließend eine Inkubation für 7 min bei 72°C.

### 2.2.17.2 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Mit Hilfe eines Genspezifischen Primers (GSP) und desselben Oligonukleotides (im UPM enthalten), mit welchem schon das 3'-Ende der cDNA verlängert wurde (s. 2.2.17.1), konnte das zu verlängernde DNA-Fragment nun während einer PCR-Reaktion amplifiziert werden.

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
dNTP (10 mM)	1.0	0.2 mM	Roche
Advantage 2 PCR Puffer (10 x)	5.0	1 x	Clontech
UPM (10 x)	5.0	1 x	Clontech
GSP (10 $\mu\text{M}$ )	1.0	0.2 $\mu\text{M}$	s. 2.1.4
Advantage Polymerase Mix (50 x)	1.0	1 x	Clontech
5'-RACE ready cDNA	2.5		
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 50.0		

Wenn die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des eingesetzten GSP-Primers über 70°C liegt kann die Amplifikation der cDNA mit einer Touchdown-PCR durchgeführt werden, wodurch es zu einer spezifischeren und sensitiveren Synthese des gewünschten Produktes kommt.

Die Reaktionsbedingungen einer solchen PCR sehen wie folgt aus:

94°C-30 sec; 72°C-3 min: 5 Zyklen

94°C-30 sec; 70°C-30 sec; 72°C-3 min: 5 Zyklen

94°C-30 sec; 68°C-30 sec; 72°C-3 min: 25 Zyklen

Liegt die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des eingesetzten GSP-Primers unter 70°C wird eine PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

94°C-30 sec; 68°C-30 sec; 72°C-3 min: 25 Zyklen

Die Produkte der 5'-RACE-PCR wurden auf 1.5%-igen Agarosegelen dargestellt. Anschließend wie oben beschrieben aus diesen gereinigt, kloniert und sequenziert.

## 2.2.18 cDNA-Genbibliotheken

Eine weitere Möglichkeit zur Verlängerung der Sequenzen der differentiell exprimierten Transkripte besteht im Screening einer Genbibliothek. Mit spezifischen DNA-Sonden ist es möglich, die entsprechenden Klone in der Genbank nachzuweisen und diese zu isolieren und zu sequenzieren. Für die Herstellung einer cDNA-Genbank aus den Hämocyten von *Biomphalaria glabrata* bzw. *Lymnaea stagnalis* wurde der SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech) verwendet. Die nachfolgend beschriebenen Reaktion wurden mit geringen Modifikationen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.18.1 Herstellung einer cDNA-Genbank

Als Ausgangsmaterial für die Erststrangsynthese diente Gesamt-RNA aus den Abwehrzellen von *Biomphalaria glabrata*, die wie oben beschrieben isoliert und extrahiert wurde. Es wurden jeweils 100 ng Gesamt-RNA aus Hämocyten resistenter und suszeptibler Schnecken eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach demselben Prinzip wie unter 2.2.17.1 dargestellt und wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Einzige Ausnahme war die Reduzierung der Synthesezeit auf 60 min. Es wurde die MMLV Superscript Reverse Transkriptase von Gibco BRL verwendet.

Die neusynthetisierte cDNA wurde anschließend mit Hilfe einer Long-Distance (LD)-PCR amplifiziert. Bei dieser Reaktion war auf das Verhältnis von eingesetzter RNA bei der Erststrangsynthese zur Anzahl der Zyklen bei der PCR zu achten. Bei einer Gesamt-RNA-Menge von 200 ng wurden 24 Reaktionszyklen durchgeführt und das Ergebnis der LD-PCR anschließend auf einem 1.5%-igen Agarosegel dargestellt. Nachdem die amplifizierte cDNA mit Proteinase K behandelt wurde, erfolgte anschließend ein Restriktionsverdau mit dem Enzym SfiI, damit die DNA in den vorverdauten  $\lambda$ -Klonierungsvektor (TriplEx2-Phagenvektor) ligiert werden konnte. Eine Größenfraktionierung und die Abtrennung kurzer cDNA-Stücke aus dem SfiI-Verdau erfolgte durch die Verwendung von Chroma-spin-400 Zentrifugationssäulen (Clontech). Die Fraktionen, welche die DNA in gewünschter Größe enthielten, wurden gepoolt und ca. 200 ng Hämocyten-DNA in einem Volumen von 1.2  $\mu$ l in den Phagenvektor ligiert. Die Reaktion wurde bei 16°C über Nacht (14 h) durchgeführt. Mit der Verpackung dieser rekombinanten  $\lambda$ -DNA in Phagenhüllen entstehen infektiöse Formen, mit denen sich die geeigneten Wirtsbakterien infizieren lassen. Das Packaging erfolgte mit dem Gigapack III Gold Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers, wobei das

gesamte Volumen des Ligationsansatzes (5  $\mu$ l) in die Reaktion eingebracht wurde. Durch die Zugabe von 20  $\mu$ l Chloroform können die Phagen bei 4°C gelagert werden.

### 2.2.18.2 Titerbestimmung der Phagenbank

Zur Bestimmung des Titers wurde von der Phagenbibliothek eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  in  $\lambda$ -dilution-buffer (2.1.11) hergestellt. Ein  $\mu$ l von jeder Verdünnung wurde mit 200  $\mu$ l der kompetenten Wirtsbakterien *E. coli* XL1-Blue ( $OD_{600} = 2.0$ ) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit der Anzahl der durch die Lyse der Bakterien entstandenen Plaques, lässt sich die Ausgangskonzentration der Phagensuspension mit folgender Formel berechnen (Sambrook et al. 1989).

$$\frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^3 \mu\text{l/ml}}{\text{Eingesetztes Volumen in } \mu\text{l}} = \text{pfu/ml}$$

Eine repräsentative cDNA-Genbank sollte aus etwa  $2 \times 10^6$  unabhängigen Klonen bestehen. Bei einer solchen Anzahl von Klonen ist die Wahrscheinlichkeit, dass jede cDNA-Sequenz in der Genbank vorhanden ist sehr groß. Um die Effizienz der Klonierung zu überprüfen, wurde gleichzeitig ein Blau/Weiß-Screening durchgeführt. Dazu wurden dem Ansatz vor dem Ausplattieren zusätzlich 15  $\mu$ l IPTG (0.5 M) und 75  $\mu$ l X-Gal (40 mg/ml) zugegeben.

### 2.2.18.3 Ausplattieren der Phagenbank

Um die Phagenbank auszuplattieren, wurde zunächst eine Einzelkolonie der Bakterien *E. coli* XL1-Blue in 15 ml LB/MgSO<sub>4</sub>/Maltose-Medium (2.1.12.b) bei 37°C bis zu einer OD von 2.0 inkubiert. Die Bakterien wurden bei 5000 rpm für 5 min pelletiert und in 7.5 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. Je nach Titer wurde die entsprechende Menge an Phagensuspension, die ca. 10000 pfu/Platte liefert, mit 200  $\mu$ l der Bakterien für 15 min bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend mit 3 ml 45-50°C warmen Top-Agar (2.1.12.b) gemischt und auf vorgewärmten LB/MgSO<sub>4</sub>-Agarplatten (2.1.12.b) ausplattiert. Diese wurden im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Plaques waren nach dieser Inkubation 1 - 2 mm groß und noch nicht konfluent.

### 2.2.19 Plaque-lifting

Die Methode wird dazu verwendet, um in der ausplattierten  $\lambda$ -Phagen-Genbank Klone zu identifizieren, die die gesuchten DNA-Fragmente als Insert tragen. Unter dem Plaque-lifting versteht man den Transfer der von den Phagen durch Bakterienlyse gebildeten Plaques auf der Agarplatte auf eine Nylonmembran. Diese werden anschließend lysiert und die dadurch freigewordene DNA an die Membran gebunden.

Damit sich der Top-Agar während des Plaque-liftings nicht von den Platten löst und an der Membran haften bleibt, mussten diese zunächst für 1 h auf 4°C abgekühlt werden. Auf die Oberfläche der Platten wurde dann eine Nylonmembran luftblasenfrei für 2 min aufgelegt. Um eine spätere Zuordnung der erhaltenen Signale zu den Phagen-Klonen zu ermöglichen, wurden durch Perforation Markierungen auf der Membran und dem Agar angebracht. Der Nylonfilter wurde anschließend für 5 min auf ein in Denaturierungslösung (2.1.11) getränktes Filterpapier (Whatman) aufgelegt. Auf dieselbe Weise wurde die Membran für 5 min in der Neutralisierungslösung (2.1.11) und für 5 min in 2 x SSC-Puffer (2.1.11) inkubiert. Nach dem Trocknen bei *RT* wurde die Phagen-DNA durch UV-Crosslinking (UV Stratalinker 1800, Stratagene) an die Membran gebunden und konnte anschließend in eine Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

### 2.2.20 Dot-blot

Dot-blots wurden, zusätzlich zur SSCP-Analyse (s. 2.2.6), zur Verifizierung der differentiell exprimierten DNA-Fragmente durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine relativ schnell durchzuführende Methode, da die DNA nach ihrer Denaturierung direkt auf eine Nylonmembran aufgetragen und durch UV-Behandlung (s.o.) an diese gebunden wird. Die Membran kann anschließend sofort in eine Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden eingesetzt werden.

Dazu wurde die aufzutragende DNA durch Zugabe von Natronlauge (Endkonzentration 0.2 M) für 15 min bei 65°C inkubiert und dadurch denaturiert. Der Ansatz wurde sofort auf Eis gestellt, und die DNA anschließend mit einer Pipette in 1.5  $\mu$ l-Portionen auf eine Nylonmembran aufgetropft. Das Neutralisieren der Membran erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation auf einem in 10 x SSC-Puffer (2.1.11) getränktem Filterpapier (Whatman). Durch UV-Crosslinking wurde die DNA auf der Nylonmembran fixiert. Nach dem Trocknen bei *RT* konnte diese sofort zur Hybridisierung benutzt werden.

## 2.2.21 Hybridisierung

Eine mit Digoxigenin markierte DNA kann als leicht nachzuweisende Sonde bei einer Hybridisierung eingesetzt werden. Der Nachweis der DNA-Sonde erfolgt mit einem spezifischen, gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörper, an den alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Die Reaktion des Enzyms mit einem Chemilumineszenz-Farbstoff (CSPD) kann auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

### 2.2.21.1 Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin

Die Markierung von Nukleinsäuren (DNA-Sonden) erfolgte während einer PCR-Reaktion durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP, Roche) anstelle von dTTP in die neu amplifizierte DNA-Stränge. Die Konzentration der Desoxynukleotide wurde für diese Markierungsreaktion verändert. Damit der Einbau des modifizierten Nucleotids effizienter erfolgen konnte, wurde der Syntheseschritt für 2 Minuten durchgeführt.

dNTP-Mix: dTTP (130  $\mu\text{M}$ ); dATP, dCTP, dGTP (je 200  $\mu\text{M}$ )

Pipettierschema des Ansatzes:

Komponenten	$\mu\text{l}$	Endkonzentration	Hersteller
PCR-Puffer (10 x)	2.5	1 x	Qiagen
dNTP-Mix (s.o.)	0.5		Roche
DIG-dUTP (1 mM)	1.75	70 $\mu\text{M}$	Roche
Vorwärts-Primer (50 $\mu\text{M}$ )	0.5	1 $\mu\text{M}$	s. 2.1.4
Rückwärts-Primer (50 $\mu\text{M}$ )	0.5	1 $\mu\text{M}$	s. 2.1.4
Taq (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0.5	2.5 U	Qiagen
DNA	2.0		
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	ad 25.0		

Die Markierungs-Reaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

94°C-3 min:	1 Zyklus
x°C-1 min; 72°C-2 min; 94°C-1 min:	35 Zyklen
x°C-1 min; 72°C-5 min:	1 Zyklus

x = Annealing-Temperatur der spezifischen Primer

Der Erfolg der Markierung wurde anschließend auf einem 1.5%-igen Agarosegel kontrolliert (2.2.7) und die Konzentration der DIG-markierten DNA nach einer der unter 2.2.4 beschriebenen Methoden bestimmt. Bevor die Sonde in die Hybridisierungs-Reaktion eingebracht werden konnte, wurde diese von Primern, Desoxynukleotiden und Puffer gereinigt (2.2.9).

### 2.2.21.2 Durchführung der Hybridisierung

Nachdem die Nylonmembran in 2 x SSC-Puffer (2.1.11) gewaschen wurde, erfolgte anschließend eine Inkubation für 25 Minuten bei 40°C in der Prähybridisierungslösung (DIG Easy Hyb, Roche; 2 ml/10 cm<sup>2</sup> Membranoberfläche). Durch diesen Schritt wurden unspezifische Bindungsstellen für die DNA-Sonde auf der Membran abgesättigt. Die Prähybridisierungslösung wurde danach durch die Hybridisierungs (Hb)-Lösung (DIG Easy Hyb; 1 ml/10 cm<sup>2</sup> Membranoberfläche) ersetzt. Zuvor jedoch wurde die DNA-Sonde durch 10-minütiges Kochen im Wasserbad denaturiert und in einer Konzentration von 10 - 15 ng/ml der Hb-Lösung zugegeben. Die Hybridisierungs-Reaktion wurde bei 40 bis 45°C über Nacht durchgeführt. Dies geschah mit kleineren Membranen (Dot-Blot) unter leichtem Schütteln im Hb-Ofen (MWG Biotech). Die größeren Rundfilter, die beim Plaque-lifting (2.2.19) verwendet werden, wurden luftblasenfrei in eine Petrischale gelegt und mit einer dünnen Folie, die das Eintrocknen der Hb-Lösung verhindern sollte, bedeckt. Durch Parafilm luftdicht abgeschlossen wurde diese bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

Die Temperaturen für die Hybridisierung und die daran anschließenden Waschschrte lassen sich nach folgender Formel berechnen (Sambrook et al. 1989):

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{ GC}) - 600/N$$

[Na<sup>+</sup>] = Natriumionen-Konzentration

% GC = GC-Gehalt der DNA-Sonde in Prozent

N = Länge der DNA-Sonde in bp

Mit dieser Formel lässt sich allerdings nur die ungefähre Temperatur berechnen. Die optimale Hybridisierungstemperatur muss zusätzlich experimentell ermittelt werden.

Nach der Hybridisierung wurde die Hb-Lösung/DNA-Sonde abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Sie konnte mehrmals (3 bis 4 x) wiederverwendet werden. Die Membran wurde je 2 x 5 min unter leichtem Schütteln bei *RT* in Waschpuffer H1 (2 x SSC; 0.1% SDS) gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte bei einer Temperatur von  $65^{\circ}\text{C}$  je ein Waschschrift in Puffer H2 (0.5 x SSC; 0.1% SDS) und Puffer H3 (0.1 x SSC; 0.1% SDS). Auf der Membran konnte dann sofort die Detektion der gebundenen Sonde durchgeführt werden.

### 2.2.21.3 Detektion

Die Nylonmembran wurde zunächst für 5 min in Puffer 1 (2.1.11) gewaschen. Um eventuell vorhandene unspezifische Antikörper-Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese für 30 min in 1%-iger Blockierungs-Lösung (Roche) inkubiert. Danach wurde der Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche), der an alkalische-Phosphatase gekoppelt ist, mit der Blockierungs-Lösung 1:5000 verdünnt, und die Membran darin für weitere 30 min inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe von je 15 min in Puffer 1 (2.1.11) und eine 3-minütige Inkubation der Membran in Puffer 3 (2.1.11). Die Membran wurde für 5 min bei *RT* in der Chemilumineszenz-Substrat-Lösung (CSPD, Roche) inkubiert und anschließend in dieser Lösung in eine Folie eingeschweißt. Während einer 15-minütigen Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  erfolgte die Reaktion des Enzyms alkalische Phosphatase mit dem Chemilumineszenz-Farbstoff. Die Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm erfolgte bei *RT*, je nach Stärke des Signals, für 4 bis 8 h.

### 2.2.21.4 Entfernen einer DNA-Sonde von der Nylonmembran/Stripping

Damit eine Nukleinsäure, die auf eine Nylonmembran geblottet ist (s. 2.2.19), mit verschiedenen DNA-Sonden untersucht werden kann, muss die zuvor eingesetzte Sonde von der Membran wieder entfernt werden.

Dazu wurde die Membran in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$  abgespült und anschließend zweimal je 15 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter leichtem Schütteln in der Stripping-Lösung (0.2 M NaOH; 0.1% SDS) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in 2 x SSC (2.1.11) konnte die Nylonmembran für eine weitere Hybridisierung mit einer anderen DNA-Sonde eingesetzt werden.

### 2.2.22 OneStep RT-PCR

Zum Nachweis der Expression von antioxidativen Enzymen, denen bei der Immunevasion der eingedrungenen Parasiten eine bedeutende Rolle zukommt, wurde die aus den Hämocyten der Biomphalarien gewonnene DNA mit genspezifischen Primern (2.1.4) amplifiziert. Bei einer OneStep RT-PCR wird die Reverse Transkription und die anschließende PCR zu einer einzigen Reaktion zusammengefasst und ausgeführt. Dies hat den Vorteil, dass die Gefahr der Kontaminationen und die Anzahl der Pipettierfehler reduziert werden kann. Zur Durchführung dieser spezifischen Polymerase Kettenreaktion wurde der OneStep RT-PCR Kit von Qiagen verwendet.

Die Synthese der aus den Abwehrzellen der Schnecken gewonnenen RNA in cDNA wurde mit dem im Kit enthaltenen Enzymmix, bestehend aus Omniscript- und Sensiscript-Reversen Transkriptasen, durchgeführt. Diese sind sensitiver als die MMLV- oder die AMV-Reverse Transkriptase. Bei der anschließenden Amplifikation der cDNA wurde eine HotStartTaq DNA-Polymerase, die ebenfalls im Enzymmix vorhanden ist, verwendet. Die Aktivierung dieser Polymerase erfolgte durch das Erhöhen der Reaktionstemperatur von 50°C auf 95°C. Bei diesem Schritt wurden gleichzeitig die Reversen Transkriptasen inaktiviert. Bei der Verwendung der genspezifischen Oligonukleotide zum Nachweis der Superoxid-Dismutase (SOD) und der Catalase (Primersequenzen s. 2.1.4) wurde eine RNA-Menge von 50 ng in die Reaktion eingesetzt. Wurde die OneStep RT-PCR-Reaktion dagegen mit den für das Aktin gen spezifischen Primern Bg1 und Bg2 (s. 2.1.4) durchgeführt, wurde die Hälfte der Menge an RNA verwendet. Dieser Nachweis diente als interne Kontrollreaktion und Aktin als Referenzgen zur Quantifizierung der antioxidativen Enzyme im Bioanalyser 2100 (Agilent).

Die OneStep RT-PCR wurde wie folgt zusammenpipettiert:

Komponenten	µl	Endkonzentration	Hersteller
OneStep RT-PCR-Puffer (5 x)	10	1 x	Qiagen
dNTP-Mix (10 mM)	2.0	400 µM	Qiagen
Vorwärts-Primer (100 pM)	1.0	2 pM	s. 2.1.4
Rückwärts-Primer (100 pM)	1.0	2 pM	s. 2.1.4
Enzym-Mix (5 U/µl)	2.0		Qiagen
RNA	x	25 bzw. 50 ng	
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub> (RNase-frei)	ad 50.0		

x = variable Menge, abhängig von der RNA-Konzentration

Die Reaktionsbedingungen für diese RT-PCR waren:

50°C-30 min; 95°C-15 min

94°C-1 min; 55°C-1 min; 72°C-1 min: 29 bzw. 32 Zyklen

72°C-10 min

Das Ergebnis der Reaktion wurde anschließend auf einem 1.5%-igen Agarosegel dargestellt.

### 3. ERGEBNISSE

#### **3.1 Isolierung von Hämocyten aus *Biomphalaria glabrata***

Für jede Probe wurde Hämolymphe aus einem Pool von 10 bis 12 Schnecken entnommen. Je nach Größe der Versuchstiere konnten so zwischen 1.0 und 1.5 ml Hämolymphe für eine Probe isoliert werden. Biomphalarien vom resistenten Phänotyp enthalten ca. 300 Hämocyten pro  $\mu$ l Hämolymphe, suszeptible Schnecken dagegen nur etwa 200 (Mohamed 1998). Der Nachweis der isolierten Abwehrzellen und deren Reinheitsgrad erfolgte unter dem Mikroskop. Je nach Verschmutzung wurde das Hämocyten-Pellet ein- bis dreimal in PBS (2.1.11) gewaschen.

Der photometrisch bestimmte RNA-Gehalt der für die Versuche verwendeten Hämocyten-Proben ist in den Tabellen im Anhang aufgelistet (s. 7.1).

#### **3.2 DNA-Verdau**

Da bei der Extraktion von RNA stets auch geringe Mengen an DNA isoliert werden, musste diese mit einer DNase verdaut werden. Reste von DNA können sich bei den nachfolgenden Reaktionen als störend erweisen.

Es wurden RNA-Proben, bei denen ein DNA-Verdau durchgeführt und Proben, bei denen die DNA nicht verdaut wurde, revers transkribiert und anschließend in eine PCR eingesetzt. Diese Reaktion wurde mit *Biomphalaria glabrata* Aktinspezifischen Oligonukleotiden (Bg1 und Bg2, s. 2.1.4), die einen 512 bp langen DNA-Abschnitt des Aktins amplifizieren, durchgeführt. Dabei zeigte sich bei den Proben ohne DNA-Verdau neben der spezifischen Aktinbande ein weiteres DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 1000 bp, die bei den DNA-verdauten Proben nicht auftrat (ohne Abb.). Der Kontrollversuch zeigt, dass bei der RNA-Extraktion auch genomische DNA mitisoliert wurde, an der die Aktinprimer binden konnten. Deshalb musste mit jeder Probe ein DNA-Verdau durchgeführt werden.

### 3.3 Differential Display Analyse

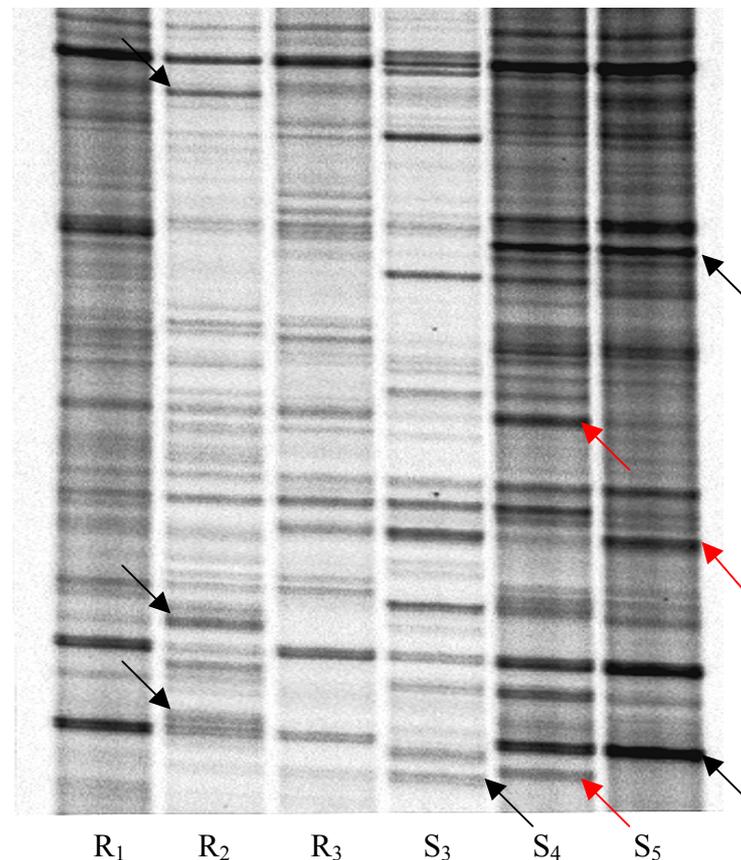
Zur Untersuchung der unterschiedlichen Genexpression in den Abwehrzellen von *Biomphalaria glabrata* mittels der Differential Display Technologie wurden drei verschiedene oligo(dT)-Ankerprimer (H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>C und H-T<sub>11</sub>G) und insgesamt 32 unterschiedliche Oligonukleotide (H-AP1 bis H-AP8, H-AP17 bis H-AP24, H-AP41 bis H-AP48 und H-AP73 bis H-AP80), deren Sequenzen nach dem Zufallsprinzip erstellt wurden, verwendet. Es wurden also insgesamt 96 Primerkombinationen zur Durchführung der Versuche eingesetzt.

In Vorversuchen musste zunächst die optimale Menge an Ausgangsmaterial für das Differential Display ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass darauf zu achten war, von jeder Probe eine RNA-Menge von genau 200 ng in die Reverse Transkriptase-Reaktion einzubringen. Geringere Mengen an eingesetzter RNA führten zu einer Abnahme der Anzahl der DNA-Banden bei der Auftrennung der DD-PCR-Produkte im Polyacrylamid-Gel. Wurden größere RNA-Mengen in die Reaktion eingebracht, traten keine zusätzlichen DNA-Fragmente auf, das Bandenmuster änderte sich nicht. Der Hintergrund wurde dabei allerdings zunehmend stärker, so dass einzelne Banden nicht mehr erkennbar waren (ohne Abb.).

Die Anzahl der DNA-Banden lag unabhängig von der verwendeten Primerkombination zwischen 100 und 200. Die amplifizierten DNA-Fragmente hatten eine Länge von 100 bis 1300 Basenpaaren. Ab einer Größe von etwa 700 bp lagen die einzelnen Banden zu eng aufeinander, so dass sich diese nicht mehr voneinander unterscheiden und zur weiteren Analyse trennen bzw. isolieren ließen.

Innerhalb desselben Schnecken-Phänotyps ergaben sich Variationen im DNA-Bandenmuster weshalb jeweils mehrere Proben (mindestens 3) vom gleichen Stamm nebeneinander auf den Polyacrylamid-Gelen aufgetragen wurden (Abb. 8). Dadurch konnten die auftretenden Unterschiede identifiziert und bei der Auswertung des Bandenmusters berücksichtigt werden. Gleichzeitig konnte damit die Anzahl der Falschpositiven herabgesetzt werden.

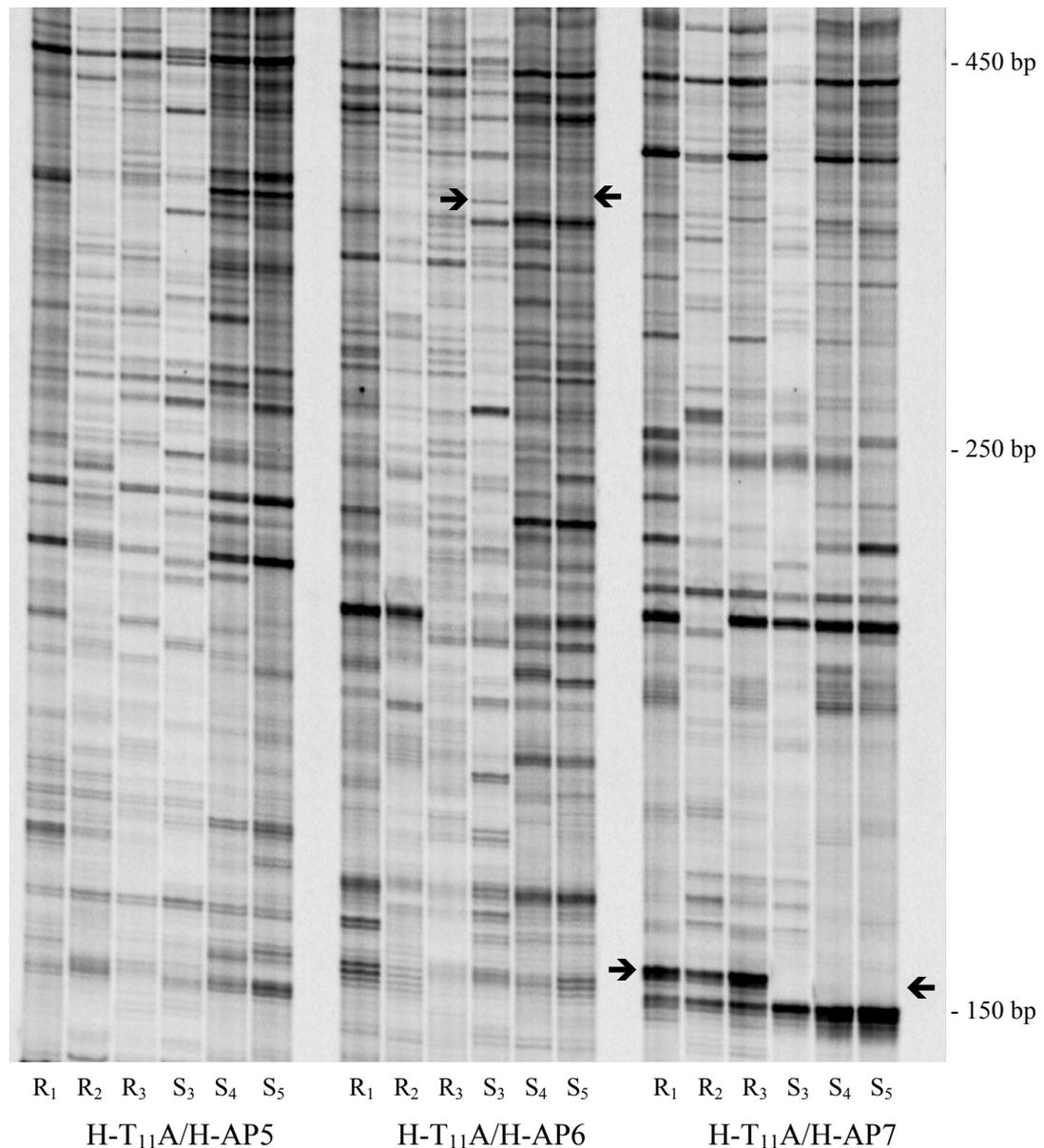
Obwohl es sich bei dem zu untersuchenden Material um nicht synchronisierte Zelllinien handelt, und jede einzelne Probe aus Zellen mehrerer Individuen gewonnen wurde, ergab sich trotzdem ein relativ einheitliches Bandenmuster. Dies ist exemplarisch in der Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 8:** Differential Display-Gel. Die Proben aus resistenten (R<sub>1</sub> - R<sub>3</sub>) und suszeptiblen (S<sub>3</sub> - S<sub>5</sub>) Schnecken wurden mit den Primern H-T<sub>11</sub>A und H-AP5 amplifiziert. Innerhalb eines Schnecken-Phänotyps ergaben sich Variationen im Bandenmuster. Um diese zu identifizieren, wurden jeweils mindestens drei Proben eines jeden Stammes nebeneinander auf dem Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Diese Unterschiede innerhalb eines Phänotyps sind durch die roten Pfeile hervorgehoben. Durch eine geringere Ausgangsmenge an RNA bei der Durchführung der Reversen Transkription ergaben sich Unterschiede im Bandenmuster, die vor allem bei den Proben R<sub>2</sub> und S<sub>3</sub> zu erkennen sind. Deren Expressionsmuster weichen von denen der jeweils beiden anderen Proben desselben Stammes in einigen Bereichen ab (schwarze Pfeile).

### 3.4 Vergleich der Genexpression in Hämocyten aus resistenten und suszeptiblen *Biomphalaria glabrata* (R<sub>ni</sub> vs. S<sub>ni</sub>)

#### 3.4.1 Differential Display und SSCP-Analyse

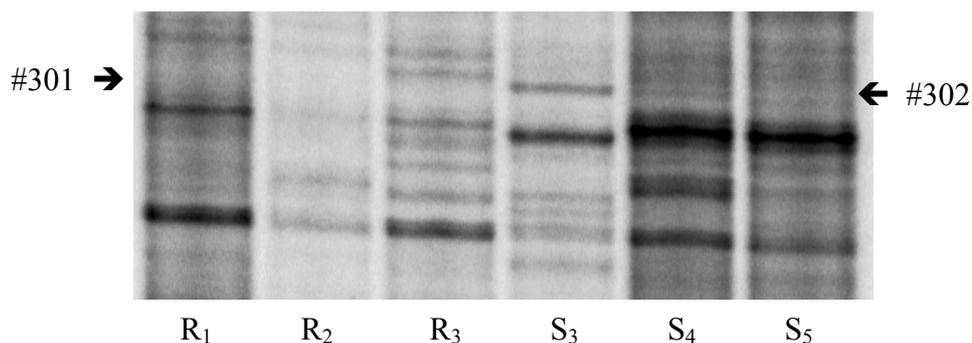


**Abbildung 9:** Autoradiografische Darstellung eines Differential Display-Gels. Das DNA-Bandenmuster zeigt die Genexpression in Abwehrzellen von resistenten (R<sub>1</sub> bis R<sub>3</sub>) und suszeptiblen (S<sub>3</sub> bis S<sub>5</sub>) Zwischenwirtschnecken. Zur Durchführung der DD-PCR wurde der oligo(dT)-Primer H-T<sub>11</sub>A und die Zufallsprimer H-AP5, H-AP6 und H-AP7 verwendet. Die Pfeile weisen auf Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Schnecken-Phänotypen hin.

Die folgenden Abbildungen zeigen Ausschnitte aus Differential Display-Gelen. Unterschiede im Bandenmuster zwischen den zu untersuchenden Hämocyten-Proben resistenter und empfänglicher Biomphalarien wurden aus den Polyacrylamid-Gelen isoliert und weiter untersucht. Dabei wurden zum einen DNA-Fragmente berücksichtigt, die jeweils nur bei einem der beiden Phänotypen im Bandenmuster des DD-Gels zu erkennen waren. Um deren differentielle Genexpression zu verifizieren, wurden sowohl die unterschiedlich auftretenden DNA-Banden als auch der äquivalente Bereich, in dem keine Banden zu erkennen waren, aus den Gelen ausgeschnitten. Da diese Bereiche DNA-Fragmente enthalten können, die unter der Nachweisgrenze des Differential Displays bzw. der Autoradiografie liegen, wurde die isolierte DNA reamplifiziert und anschließend einer SSCP-Analyse unterzogen. Zum anderen kann mit dieser Methode untersucht werden, ob es sich bei der differentiell auftretenden DNA-Bande um ein einzelnes Fragment handelt, oder ob mehrere Fragmente gleicher Größe im DD-Gel übereinander liegen und nicht aufgetrennt werden konnten.

Mit der Methode des SSCP wurden zudem DNA-Transkripte untersucht, die sowohl in den Hämocyten der resistenten als auch in denen der suszeptiblen Schnecken exprimiert wurden, die jedoch in der Stärke ihrer Genexpression deutlich variierten, d.h. hoch- bzw. herunterreguliert waren.

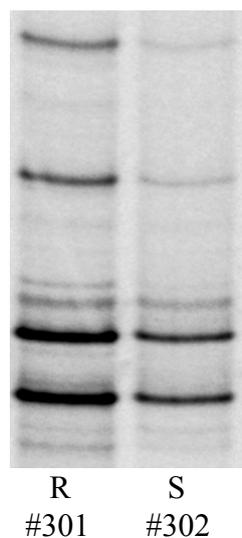
Den dargestellten DD-Gelen sind die entsprechenden und daraus resultierenden Abbildungen der SSCP-Analyse jeweils unmittelbar nachgestellt.



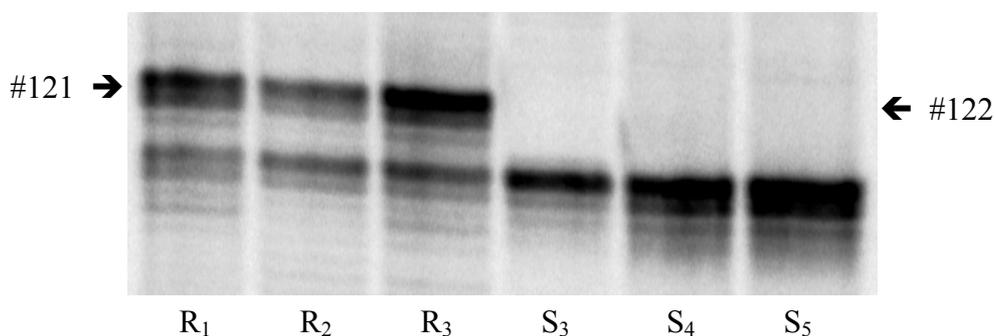
**Abbildung 10a:** 6%-iges Polyacrylamid-Gel. Die DD-PCR wurde mit der Primerkombination H-T<sub>11</sub>A und H-AP6 durchgeführt. Im Expressionsmuster der suszeptiblen Schnecken (S<sub>3</sub> - S<sub>5</sub>) ist eine DNA-Bande zu erkennen (Pfeil, #302), die im Bandenmuster der resistenten Proben (R<sub>1</sub> - R<sub>3</sub>) nicht auftaucht (Pfeil, #301)

Die im DD-Gel nur bei den Proben der empfänglichen Schnecken sichtbare Bande (#302) und der entsprechende Bereich der Proben der resistenten Schnecken, in dem keine DNA-Bande zu erkennen ist (#301), wurden isoliert und mit derselben Primerkombination reamplifiziert.

Nach der erneuten Auftrennung im SSCP-Gel zeigte sich, dass sich die Bandenmuster der beiden Proben entsprechen (Abb. 10b). Das isolierte Fragment aus den Proben der suszeptiblen Schnecken lässt sich mit Hilfe der SSCP-Analyse auch in den Hämocyten der R-Schnecken nachweisen und wird somit nicht differentiell exprimiert. Außerdem ist zu erkennen, dass es sich bei der untersuchten DNA-Bande um mehrere Fragmente gleicher bzw. ähnlicher Größe handelt, die im DD-Gel nicht aufgetrennt werden konnten.

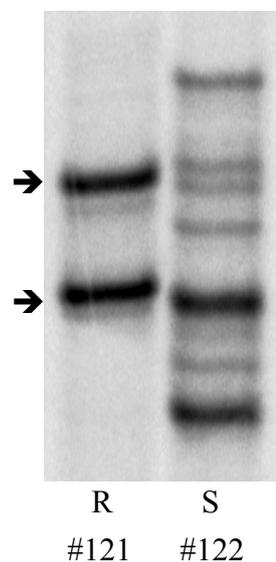


**Abbildung 10b:** SSCP-Gel. Die aus dem DD-Gel der Abb. 10a isolierten DNA-Fragmente #301 und #302 wurden mit der Primerkombination H-T<sub>11</sub>A und H-AP6 reamplifiziert und auf einem SSCP-Gel aufgetrennt. Die Bandenmuster der Einzelstränge der R- und S-Proben sind identisch, d.h., dass keine differentielle Expression vorliegt.



**Abbildung 11a:** Differential Display-Gel. Die DD-PCR wurde mit der Primerkombination H-T<sub>11</sub>A und H-AP7 durchgeführt. Bei den Hämocyten-Proben der resistenten Schnecken (R<sub>1</sub> bis R<sub>3</sub>) ist ein DNA-Fragment zu erkennen (Pfeil, #121), welches bei den Proben aus den empfänglichen Schnecken (S<sub>3</sub> bis S<sub>5</sub>) nicht exprimiert wird (Pfeil, #122).

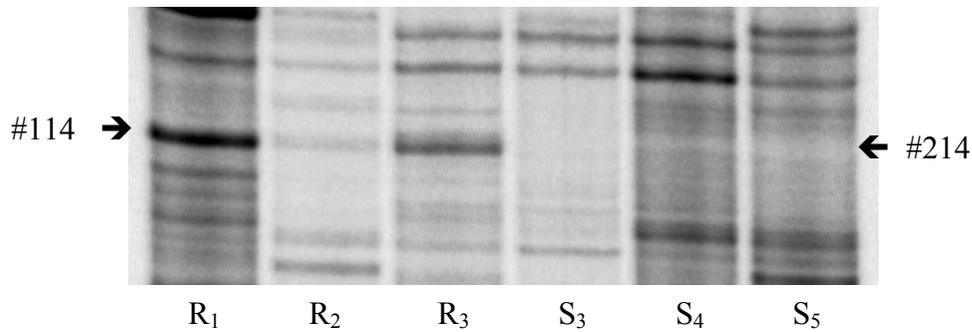
Mit Hilfe der SSCP-Analyse konnte die differentielle Expression des DNA-Fragments #121, das im Polyacrylamid-Gel nur bei den R-Proben sichtbar ist, nachgewiesen werden (s. Abb. 11b). Die im SSCP-Gel aufgetrennten Einzelstränge der beiden Proben zeigen ein unterschiedliches Bandenmuster. Keine der beiden dargestellten DNA-Banden des resistenten Phänotyps findet sich im Expressionsmuster der Hämocyten aus den suszeptiblen Schnecken wieder, d.h., dass dieses Fragment differentiell exprimiert wird. Außerdem ist zu sehen, dass es sich bei der aus dem DD-Gel ausgeschnittenen Bande #121 um lediglich ein Fragment handelt. Die beiden in der Abbildung. 11b dargestellten DNA-Einzelstränge der Probe #121 aus den Abwehrzellen der resistenten Biomphalarien wurden aus dem SSCP-Gel isoliert und anschließend kloniert und sequenziert.



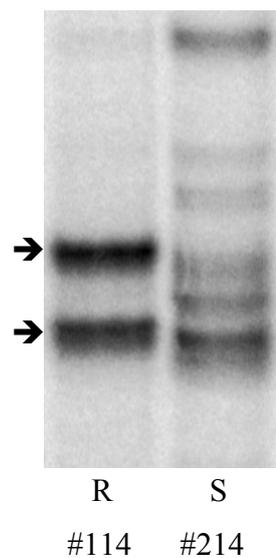
**Abbildung 11b:** SSCP-Gel. Die aus dem Polyacrylamid-Gel (s. Abb. 11a) isolierte DNA der Proben #121 (R) und #122 (S) wurde mit den Oligonukleotiden H-T<sub>11</sub>A und H-AP7 reamplifiziert. Die Expressionsmuster der beiden Proben sind unterschiedlich, d.h., dass sich die differentielle Expression des DNA-Fragments #121 bestätigt hat. Die Pfeile markieren die beiden Einzelstränge der aufgetrennten Probe #121 aus den resistenten Schnecken.

Die beiden nächsten Darstellungen geben ein weiteres Beispiel für den Nachweis einer differentiellen Genexpression in den Abwehrzellen der Zwischenwirtschnecke *Biomphalaria glabrata* wieder. Das DNA-Fragment aus den Hämocyten der resistenten Schnecken (#114) taucht im Bandenmuster der Proben aus den empfänglichen Biomphalarien nicht auf (Abb.12a). Die unterschiedliche Genexpression bestätigt sich durch die Auftrennung der aus

dem DD-Gel isolierten Proben #114 und #214 in der SSCP-Analyse. Die DNA-Einzelstränge der beiden Proben zeigen ein unterschiedliches Bandenmuster.

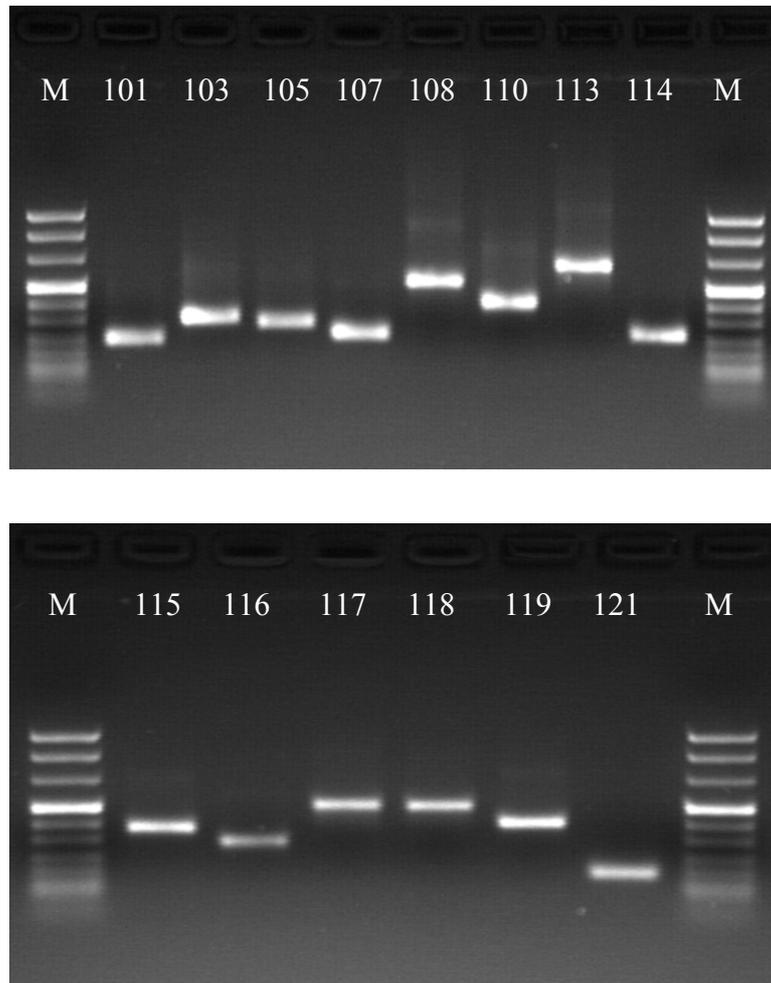


**Abbildung 12a:** Differential Display-Gel. Die Hämocyten-DNA wurde mit der Primerkombination H-T<sub>11</sub>G und H-AP5 amplifiziert. Bei den Proben der resistenten Schnecken (R<sub>1</sub> - R<sub>3</sub>) ist ein DNA-Transkript zu erkennen (Pfeil, #114), welches in den Abwehrzellen der empfänglichen Biomphalarien (S<sub>3</sub> - S<sub>5</sub>) nicht exprimiert wird (Pfeil, #214).



**Abbildung 12b:** SSCP-Gel. Das unterschiedlich exprimierte DNA-Fragment aus der Abb. 12a wurde mit derselben Primerkombination reamplifiziert. Die Einzelstränge des Fragments #114 (Pfeile) aus der R-Probe können im DNA-Bandenmuster der Probe aus den empfänglichen Schnecken (S, #214) nicht nachgewiesen werden. Es liegt eine differentielle Genexpression des DNA-Transkripts #114 vor.

Die cDNA-Fragmente mit unterschiedlicher Genexpression wurden aus den SSCP-Gelen isoliert und reamplifiziert. Anschließend wurden diese im pCR4-TOPO-Vektor kloniert und sequenziert. Eine Auswahl der reamplifizierten Fragmente ist auf den beiden folgenden Agarosegelen dargestellt.



**Abbildung 13:** Differentiell exprimierte DNA-Fragmente auf 1.5%-igen Agarosegelen. Die für die Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnitts verwendeten Primerkombinationen sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Die Größe der einzelnen Banden des Molekulargewichtsmarkers VIII (M) sind unter 2.2.7 in der Abbildung 6 dargestellt.

Im Vergleich der Expressionsmuster zwischen den Hämocyten aus resistenten (R) und suszeptiblen (S) Zwischenwirtschnecken konnten durch die Kombination der Methoden des Differential Display und der SSCP-Analyse insgesamt 59 DNA-Fragmente identifiziert werden, die nur in jeweils einem der beiden Phänotypen auftraten, das heißt, die differentiell

exprimiert wurden. Von diesen 59 DNA-Fragmenten konnten 31 den resistenten Biomphalarien und 28 dem suszeptiblen Schnecken-Phänotyp zugeordnet werden.

Des Weiteren wurden 7 DNA-Transkripte analysiert, die nach der SSCP-Analyse zwar in beiden Schnecken-Phänotypen nachgewiesen werden konnten, sich allerdings in der Stärke ihrer Genexpression deutlich voneinander unterschieden. Fünf dieser DNA-Fragmente stammten vom resistenten Phänotyp, während von den empfänglichen Schnecken zwei Fragmente analysiert wurden.

### 3.4.2 Sequenzanalysen

Sämtliche Sequenzen der isolierten cDNAs wurden sowohl auf Nukleinsäurebasis als auch übersetzt in ihre Aminosäuresequenz auf Homologien zu bereits bekannten Sequenzen und Proteinen untersucht. Der Vergleich der Nukleotidsequenzen wurde mittels BLAST in den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) durchgeführt. Das Übersetzen in die Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem *Translation tool* von ExPasy (Expert Protein Analysis System, <http://www.expasy.org/tools/dna.html>) und die Suche nach Homologien zu Proteinen mit Hilfe des FASTA-Programms in den Datenbanken des European Bioinformatics Institutes (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/fasta33>).

Alle Nukleotidsequenzen wurden unabhängig vom Erfolg der Homologiesuche in die EST-Genbank des NCBI eingegeben. Diese sind unter Angabe ihrer Accession-Nummern in den beiden folgenden Tabellen aufgelistet.

**Tabelle 1:** Differentiell exprimierte DNA-Fragmente aus dem Vergleich der Genexpression zwischen Hämocyten aus resistenten (R) und suszeptiblen (S) Biomphalarien. Neben der Bezeichnung und der Länge der Fragmente sind die Accession-Nummern, unter denen diese in der Genbanken des NCBI registriert sind, angegeben. Des weiteren ist die jeweils verwendete Primerkombination und die Zugehörigkeit zum jeweiligen Schnecken-Phänotyp aufgelistet.

Fragment-bezeichnung	Primer-kombination	Größe (bp)	Accession-number	Schnecken-stamm
101.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP2	215	BI596266	R
102.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP2	218	BI596267	S
103.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP3	310	BI596268	S
103.2	H-T <sub>11</sub> G/H-AP3	309	CB381768	S
104.2	H-T <sub>11</sub> G/H-AP3	310	BI596269	R
105.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP3	287	BI596270	R
106.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP3	290	BI596271	S
107.2	H-T <sub>11</sub> G/H-AP4	237	BI596272	S
108.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP5	502	BI596273	R
110.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP6	380	BI596274	R
113.1a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP7	238	BI596275	S
113.1b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP7	252	CB381769	S
114.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP8	234	BI596276	S
115.1	H-T <sub>11</sub> A/H-AP2	372	BI596277	R
115.2	H-T <sub>11</sub> A/H-AP2	360	BI596278	R
116.2	H-T <sub>11</sub> A/H-AP3	293	BI596279	R
117.2	H-T <sub>11</sub> A/H-AP5	499	BI596280	S
118.1	H-T <sub>11</sub> A/H-AP5	488	BI596281	R
119.2	H-T <sub>11</sub> A/H-AP5	206	BI596282	S
121.6	H-T <sub>11</sub> A/H-AP7	162	BI596283	R
121.7	H-T <sub>11</sub> A/H-AP7	159	BI596284	R
504 Ia	H-T <sub>11</sub> A/H-AP42	374	BI962097	S
510a	H-T <sub>11</sub> A/H-AP43	305	BI962098	S
512a	H-T <sub>11</sub> A/H-AP44	294	BI962099	S
520 Ia	H-T <sub>11</sub> G/H-AP23	285	BI962100	S
520 IIa	H-T <sub>11</sub> G/H-AP23	285	BI962101	S

520 IIIb	H-T <sub>11</sub> G/H-AP23	286	BI962102	S
522	H-T <sub>11</sub> G/H-AP47	455	BI962103	S
526b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP48	199	BI962104	S
534 Ia	H-T <sub>11</sub> C/H-AP41	254	BI962105	S
534 IIb	H-T <sub>11</sub> C/H-AP41	236	BI962106	S
421	H-T <sub>11</sub> C/H-AP78	110	BI962107	S
425	H-T <sub>11</sub> A/H-AP75	218	BI962108	S
431	H-T <sub>11</sub> A/H-AP78	160	BI962109	S
433	H-T <sub>11</sub> A/H-AP78	110	BI962110	S
453	H-T <sub>11</sub> G/H-AP79	349	BI962111	S
455	H-T <sub>11</sub> G/H-AP79	289	BI962112	S
457a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP80	102	BI962113	S
457b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP80	100	BI962114	S
505a	H-T <sub>11</sub> A/H-AP42	365	BI962117	R
511 Ib	H-T <sub>11</sub> A/H-AP43	230	BI962118	R
511 IIb	H-T <sub>11</sub> A/H-AP43	299	BI962119	R
521 Ib	H-T <sub>11</sub> G/H-AP23	267	BI962120	R
521 IIa	H-T <sub>11</sub> G/H-AP23	283	BI962121	R
523b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP47	455	BI962122	R
535a	H-T <sub>11</sub> C/H-AP41	253	BI962123	R
535b	H-T <sub>11</sub> C/H-AP41	255	BI962124	R
402a	H-T <sub>11</sub> C/H-AP73	183	BI962125	R
402b	H-T <sub>11</sub> C/H-AP73	185	BI962126	R
404	H-T <sub>11</sub> C/H-AP73	149	BI962127	R
408	H-T <sub>11</sub> C/H-AP74	81	BI962128	R
410	H-T <sub>11</sub> C/H-AP75	156	BI962129	R
412	H-T <sub>11</sub> C/H-AP75	82	BI962130	R
420	H-T <sub>11</sub> C/H-AP78	112	BI962131	R
428	H-T <sub>11</sub> A/H-AP77	149	BI962132	R
436a	H-T <sub>11</sub> A/H-AP80	236	BI962133	R
436b	H-T <sub>11</sub> A/H-AP80	237	BI962134	R
456a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP80	101	BI962135	R
456b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP80	101	BI962136	R

**Tabelle 2:** Nicht differentiell exprimierte DNA-Fragmente aus dem Vergleich der Genexpression der Abwehrzellen zwischen den beiden Schnecken-Phänotypen. Die DNA-Transkripte sind in beiden Schneckenstämmen nachweisbar, unterscheiden sich allerdings in der Stärke ihrer Genregulation.

Fragment-bezeichnung	Primer-kombination	Größe (bp)	Accession-number	Schnecken-stamm
506a	H-T <sub>11</sub> A/H-AP42	293	BI962115	S
506b	H-T <sub>11</sub> A/H-AP42	289	BI962116	S
509a	H-T <sub>11</sub> A/H-AP42	312	BI962137	R
509b	H-T <sub>11</sub> A/H-AP42	308	BI962138	R
517b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP22	292	BI962139	R
525a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP48	385	BI962140	R
531a	H-T <sub>11</sub> C/H-AP41	198	BI962141	R

Die Suche nach Homologien auf Basis der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen führte bei sieben der oben angeführten DNA-Fragmente zu Übereinstimmungen mit bereits bekannten Sequenzen.

Für die Probe #103.2 konnten Homologien zu Genen von verschiedenen Proteinkinasen, wie der Polo-like Kinase und der Serin/Threonin Kinase aus *Mus musculus* (BC006880 bzw. MMU01063) nachgewiesen werden. Die Übereinstimmungen der Nukleotidsequenzen liegen auf die gesamte Sequenz bezogen bei jeweils 21%. Im Bereich der Nukleotide 166 bis 242 liegt die Homologie bei 83%. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen liegt diese bei 70%. Proteinkinasen spielen bei der Regulation der Zellteilung und bei der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle.

Das DNA-Fragment #113.1b zeigt eine 75%-ige Übereinstimmung zu Genen aus *Biomphalaria glabrata* (AY028462), die für Fibrinogen-verwandte Proteine (FREPs) kodieren. In einem 197 bp langen Bereich der Sequenz besteht eine 95%-ige Homologie. Bei den FREPs handelt es sich um Hämolymp- Proteine, die Parasitenantigene binden.

Für das DNA-Transkript #119.2 konnte ebenfalls eine Homologie zu einer bekannten Sequenz aus *Biomphalaria glabrata* (AAN85870) festgestellt werden. Dabei handelt es sich um das Methyl-CpG-bindende Protein, dessen vier verschiedene Domänen an methylierte

DNA binden können und damit eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung der Transkription und beim Gene Silencing spielen. Die Übereinstimmung der beiden Nukleotidsequenzen liegt bei 61%, im Bereich der Nukleotide 79 bis 206 bei 96%. Auch auf Basis der Aminosäuresequenz konnte diese Homologie bestätigt werden, dort liegt sie bei 84%.

Beim Fragment #520 IIIb konnte eine 60%-ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zu Septin bzw. Septin-ähnlichen Proteinen aus *Homo sapiens* (AAO13878 und Q92599) und *Mus musculus* (Q9ESF7) festgestellt werden (s. Anhang). Der Proteinfamilie der Septine fällt bei der Cytokinese eine wichtige Rolle zu, speziell bei der Organisation des Zellcortexes.

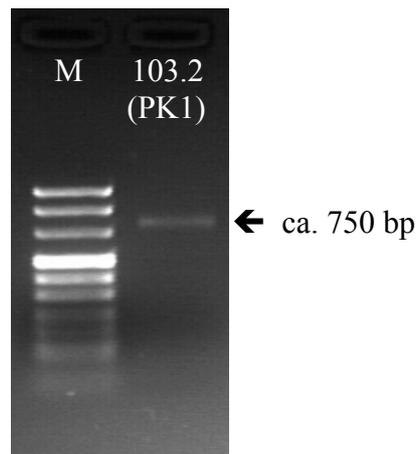
Eine 58%-ige Übereinstimmung der AS-Sequenzen ergab sich für das DNA-Fragment #521 Ib. Diese Homologie bezieht sich auf die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH), ein Enzym, welches im Glukose- und Energiestoffwechsel vieler Organismen wie bspw. *Drosophila melanocephala* (Q9GS33), *Ceratitidis capitata* (O02625), *Apis mellifera* (O61368) und *Locusta migratoria* (O96558) von Bedeutung ist (s. Anhang).

Das Fragment #522 weist Homologien zur Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (GPAT) aus verschiedenen Organismen auf (*Drosophila melanogaster*, Q27601; *Mus musculus*, Q8CIH9; *Gallus gallus*, P28173), wobei die Proteinsequenzen bis zu 72% identisch sind (s. Anhang). GPAT ist am Prozess der *de novo* Biosynthese von Purinen maßgeblich beteiligt.

Der Vergleich der Proteinsequenzen ergab für die Probe #534 IIb eine Homologie von bis zu 58% zu dem Enzym Acetat-Kinase, welches im Stoffwechsel verschiedener Bakterienarten, wie bei *Thermotoga maritima* (Q9WYB1) oder *Clostridium perfringens* (Q8XJN2) eine Rolle spielt (s. Anhang).

### 3.4.3 Verlängerung der cDNA mit Hilfe der RACE-PCR

Anhand der Nukleotidsequenz des DNA-Fragments #103.2 wurde ein Primer (PK1: 5'-TGA CCA GAC ATC CAC TTC GTA ACT GTG ACC -3') generiert, mit dem, wie unter 2.2.17 beschrieben, eine 5'-RACE-PCR durchgeführt werden konnte. Mit dieser Technik kann das fehlende 5'-Ende eines Genabschnitts identifiziert und die Sequenz des Fragments verlängert werden.



**Abbildung 14:** 1.5%-iges Agarosegel. DNA-Fragment #103.2 (PK1) nach der 5'-RACE-PCR mit einer Länge von ca. 750 bp. M = Molekulargewichtsmarker VIII (s. 2.2.7, Abb. 6)

Das Produkt aus der RACE-PCR mit einer Größe von 747 bp wurde aus dem Agarosegel isoliert und im pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Anschließend wurde die DNA sequenziert. Zusammen mit der bereits bekannten Sequenz des DD-Fragments konnte diese auf eine Länge von 911 bp verlängert werden. Die Sequenz wurde in die Datenbank des NCBI unter der Accession-Nummer CB381770 eingetragen. Übersetzt in die Aminosäuresequenz konnte ein offener Leserahmen (ORF) von 226 AS bzw. 678 bp mit einem Methionin als Translationsstartpunkt gefunden werden. Beide Sequenzen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

```

1 taagcagtggtaacaacgcagagtagcgcgggggtccgtgcaagaactggtggctcgctc 60
  - A V V T T Q S T R G V R A R T G G S L
61 ctttagatagaagtgtatggtgtactcaagatttacagatttggatggcttagtacagtt 120
  L - I E V Y V V L K I Y R F V M A S T V 5
121 gtcaaagatgatgggcgcccgaaggaacaatacccgaaattctacatgatccagggact 180
  6 V K D D G R P K G T I P E I L H D P G T 25
181 ggaaagcgatatttacgtggacgatttcttggcaaggggtggatttgcaaaatggttacgaa 240
  26 G K R Y L R G R F L G K G G F A K C Y E 45
241 ctaacagatatggatacaaaggagctttgggcaggaaagattggtccaaagtctctactt 300
  46 L T D M D T K E L W A G K I V P K S L L 65
301 gtaaacagccccagaaggataaaatgggctccaagaaattcgctatttcatcgaaagtg 360
  66 V N Q P Q K D K M G S K K F A I S S K V 85
361 tgggctcataggcacattggttcagtttcacacattttttgaagacagcgagaatgtttat 420
  86 W A H R H I V Q F H T F F E D S E N V Y 105
421 atcttactggagctatgcagaagaaggcctctgatggaacttcacaagcgtaggaaggct 480
  106 I L L E L C R R R S L M E L H K R R K A 125
481 gtcacagagcctgaggcccgttactttcccttcagattatagaagcctgtcagtatctt 540
  126 V T E P E A R Y F S L Q I I E A C Q Y L 145
541 cacaataataaagttattcatagagacctgaaacttggaatcttttccctcaatgatgag 600
  146 H N N K V I H R D L K L G N L F L N D E 165
601 atggagttgaagataggagactttgggctggccacaaaactggattatggaggagaaagg 660
  166 M E L K I G D F G L A T K L D Y G G E R 185
661 aaaaaaactttgtgtggaactcctaactatattgctcctgaggtgcttggaaagaaaggt 720
  186 K K T L C G T P N Y I A P E V L G K K G 205
721 cacagttacgaagtggatgtctgggtcactaggatgtattgtgtatgtaacaatgcttttc 780
  206 H S Y E V D V W S L G C I V Y V T M L F 225
781 ttataatgaaatatttatcttaaaaataactaccaaaaaaatgtctagtacaaaatgtaa 840
  226 L - - N I Y L K N N Y Q K N V - Y K M -
841 aatttacttttagcttaaaagttctgttagggaaataacttaacatttgacttactccaaaa 900
  N L L - L K V L L G K - L N I - L T P K
901 gtaatattgac 911
  V I L

```

**Abbildung 15:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Probe #103.2 (PK1) nach der 5'-RACE-PCR (in 3'-5'-Richtung). Der offene Leserahmen besteht aus 226 AS, das Startcodon Methionin (M) ist grau unterlegt, Stopcodons sind als Striche dargestellt. Die Asparaginsäure (D, schwarz) kennzeichnet das aktive Zentrum des Proteins.

Bei der Suche nach Homologien ergaben sich signifikante Übereinstimmungen zu Proteinkinasen aus verschiedenen Organismen, wie *Homo sapiens* (P53350), *Mus musculus* (Q07832), *Hemicentrotus pulcherrimus* (Q9GRB7), *Drosophila melanogaster* (P52304),

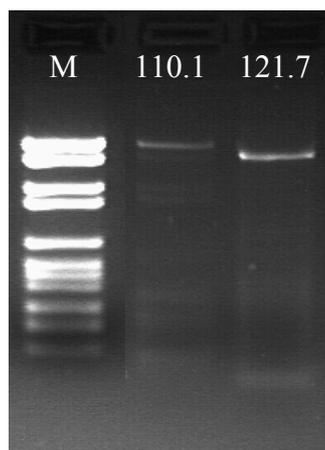
*Xenopus laevis* (BC046839) oder *Caenorhabditis elegans* (Q9N2L7). Die Homologien zu diesen Proteinen liegen zwischen 68 und 70%.

Sequenz 1:	<i>Mus musculus</i>	603 AS
Sequenz 2:	<i>Homo sapiens</i>	603 AS
Sequenz 3:	<i>Xenopus laevis</i>	598 AS
Sequenz 4:	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	582 AS
Sequenz 5:	<i>Biomphalaria glabrata</i>	226 AS
Sequenz 6:	<i>Caenorhabditis elegans</i>	632 AS
Sequenz 7:	<i>Drosophila melanogaster</i>	576 AS
Mus	MNAAAKAGKLARAPADLGKGGVPGDAVPGAPVAAPLAKEIPEVLVDPRSRRRQYVRGRFLG	60
Homo	MSAAVTAGKLARAPADPGKAGVPGVAAPGAPAAAAPPAKEIPEVLVDPRSRRRYVRGRFLG	60
Xenopus	--MAQVAGKKLTVAPEAAK-----PPGIPGSSSAVKEIPEILVDPRTRRRYLRGRFLG	51
Hemicen	--MASRHKEDLR-----VKEVPDVVTDPTSTGKTYTKGRFLG	34
Biomphal	--MASTVVKDDGRP-----KGTIPEILHDPGTGKRYLRGRFLG	36
Caenorhab	--MQRVQPSAARVKSQKKE-----KAPPDVPDVILDGERKTRYEKGKFLG	43
Drosophila	--MAAKPEDKST-----DIPDRLVDINQRKTYKRMRFEG	32
	.	:* : * * : :*:*
Mus	KGGFAKCFEISDADTKEVFAGKIVPKSLLLKPHQKEKM-SMEISIH-RSLAHQHVVGFHD	118
Homo	KGGFAKCFEISDADTKEVFAGKIVPKSLLLKPHQREKM-SMEISIH-RSLAHQHVVGFHG	118
Xenopus	KGGFAKCYEITDLESREVFAGKIVPKTMLLKPHQKDKM-TMEIAIQ-RSLDHRHVVGFGH	109
Hemicen	KGGFAKCYELTDDATKQIFAGKVSKALLVKPHQKDKM-TMEIHIH-KSLHHRHVVGFGHS	92
Biomphal	KGGFAKCYELTDMDTKELWAGKIVPKSLLVNQPKDKMGSKKFAISSKVVWAHRHIVQFHT	96
Caenorhab	KGGFAHCYELRNKSTGELFAGKVVPKALLIKQYQRDKM-AQEVQIH-RNLQHRNVVKLYH	101
Drosophila	KGGFAKCYEIIDVETDDVFAGKIVSKKLMIKHNQKEKT-AQEITIH-RSLNHPNIVKFHN	90
	*****:*:* : : :*:**:*.* :*: :* : * : * :* :*	
Mus	FFEDSDFVFFVLELCRRRSLLELHKRRKALTEPEARYYLRQIVLGCQYLHRNQVIHRDLK	178
Homo	FFEDNDFVFFVLELCRRRSLLELHKRRKALTEPEARYYLRQIVLGCQYLHRNRVIHRDLK	178
Xenopus	FFEDNDFVFFVLELCRRRSLLELHKRRKAVTEPEARYYLRQIVLGCQYLHSNRVIHRDLK	169
Hemicen	FFEDKENVFFVLELCRRRSLMELHKRRKAITEPETRYFMRQCILACQYLAKTKVIHRDLK	152
Biomphal	FFEDSENVYILLELCRRRSLMELHKRRKAVTEPEARYFSLQIIEACQYLHNNKVIHRDLK	156
Caenorhab	FFEDKSNVYITLELCPRRSLMELHKRRKAVTEPEARYFTYQIVEGVLYLHNLKIVHRDLK	161
Drosophila	YFEDSQNIYIVLELCCKRSMELHKRRKSITFEFCRYIYQIIQGVKYLHDNRIHRDLK	150
	:**.. :*: ** :*:**:*:*:*:* :* * ** : * : . ** :*:**:*	
Mus	LGNLFLNEDLEVKIGDFGLATKVEYGERKKTLCGTPNYIAPEVLSKKGHSFEVDVWSIG	238
Homo	LGNLFLNEDLEVKIGDFGLATKVEYDGERKKTLCGTPNYIAPEVLSKKGHSFEVDVWSIG	238
Xenopus	LGNLFLNDEMELKIGDFGLATKVEYDGERKKTLCGTPNYIAPEVLGKKGHSFEVDIWSIG	229
Hemicen	LGNLFIDNEMELKIGDFGLATKVDGGERKKTLCGTPNYIAPEVLSKKGHSFEVDLWSIG	212
Biomphal	LGNLFLNDEMELKIGDFGLATKLDYGERKKTLCGTPNYIAPEVLGKKGHSFEVDVWSIG	216
Caenorhab	LGNLFLNDELQVKIGDFGLATTCND-ERKKTLCGTPNYIAPEVLNKGHSFEVDLWAI	220
Drosophila	LGNLFLNDLLHVKIGDFGLATRIEYGERKKTLCGTPNYIAPEILTCKGHSFEVDIWSIG	210
	*****: : :*:**:*:* : ***** :* * ** :*:*:*:*	
Mus	CIMYTLVVGKPPFETSCLKETYLRIRKNEYSIPKHINPVAASLIQKMLQTDPTARPTIHE	298
Homo	CIMYTLVVGKPPFETSCLKETYLRIRKNEYSIPKHINPVAASLIQKMLQTDPTARPTINE	298
Xenopus	CIMYTLVVGKPPFETSCLKETYMRIKNEYSIPKHINPVAASLIQKMLRSDPTSRPTIDD	289
Hemicen	CIMYTLVVGKPPFETQSLKDTYQRIKRNEYRVPSHVSTPARNLIVKLLKNDPTQRPHIDT	272
Biomphal	CIVYVTMLFL-----	226
Caenorhab	CILYILLFGHPFESKSLEETYSRIKNNYVIPTASAAAASQLIRVLLDPVPSRRPNARA	280
Drosophila	CVMYTLVVGQPPFETKTLKDTYSKIKKCEYRVPSYLRKPAADMVIAMLQPNPESRPAIGQ	270
	*:* :*	

Mus	LLNDEFFTSGYIPARLPITCLTIPPRFSIAPSSLDPSSRKPLKVLNKGVENPLPDR----	354
Homo	LLNDEFFTSGYIPARLPITCLTIPPRFSIAPSSLDPSNRKPLTVLNKGLENPLPER----	354
Xenopus	LLNDEFFTSGYIPSRLPPTTCLTVPPRFSIAPSTIDQSLRKPLTAINKGQDSPLVEKQV-	348
Hemicen	LLQDEFFTTGYLPPQLPTTCLTMAPRFQVPVS----SGRRPLLEVNGQDENVPPSREQSG	328
Biomphal	-----	
Caenorhab	VCRDHFFKSGFMPARLPVSCSLTMVPHLNDDEYAEENVSPSGTIDQRGPHQAGRSGLSAIP	340
Drosophila	LLNFEFLKSGKVPMLPSSCLTMAPRIGSNDTIEDSMHRKPLMEMNGIRPDDTRLESTFL	330
Mus	-----PREKEEPVVRETNEAIECHLSDLLQQLTSVNASKPS--ERGLVRQEEAEDPAC	405
Homo	-----PREKEEPVVRETGEVVDCHLSDDLQQLHSHVNASKPS--ERGLVRQEEAEDPAC	405
Xenopus	-----PAKEEEMQQPEFTEPADCYLSEMLQQLTCLNAVKPS--ERALIRQEEAEDPAS	399
Hemicen	KPHRKHSDRKENGSGGKPKVFQPKEDHLASLKVHLTSVVAAKPS--EKADIRLDEAEDPAA	386
Biomphal	-----	
Caenorhab	AHLVSRNSERQQTHRMEAYRQPTDCYLSNLLAQVNDLLATPTADIDDAEAALDSYQSPEA	400
Drosophila	KAN--LHDAITASAQVCRHSEDYRSDIESLYQQLTNLINGKPRILQGNLG--DENTDPAA	386
Mus	IPIFWVSKWVDYSDKYGLGYQLCDNSVGVLFNDSTRILILYNDGDSLQYIERDGTESYLTV	465
Homo	IPIFWVSKWVDYSDKYGLGYQLCDNSVGVLFNDSTRILILYNDGDSLQYIERDGTESYLTV	465
Xenopus	IPIFWVSKWVDYSDKYGLGYQLCDNSVGVLFNDSTRILIMYNDGDSLQYIERNNTESYLVN	459
Hemicen	APILWVSKWVDYSDKYGLGYQLCDGSGVGVLFNDSTRLLLLHANADTLEYIERDGNKEYCRL	446
Biomphal	-----	
Caenorhab	LPVFWVSKWVDYSDKYGIGYQLCDNSVGVLFNDNSRIMLDTAGTQLTYYIEKTEKEHYFDM	460
Drosophila	QPLFWVSKWVDYSDKYGFGYQLCDEGIGVMFNDTTKLILLPNQINVHFIDKDGKETYMFT	446
Mus	S-SHPNSLMKKITLLNYFRNYMSEHLLKAGANITPREGDELARLPYLRTWFRTRSAIILH	524
Homo	S-SHPNSLMKKITLLKYFRNYMSEHLLKAGANITPREGDELARLPYLRTWFRTRSAIILH	524
Xenopus	R-SYPTTLTKKITLLKYFRNYMSEHLLKAGANTTPREGDELARLPFLRTWFRTRSAIILH	518
Hemicen	G-SYDSTLHKKVTLTKYFRNYMSEHLLKAGAAMPRESDSMARLPFLQSWFRTKSAIVLH	505
Biomphal	-----	
Caenorhab	ESAIPSGLQKKMTLLKYFRSYMNDHLLQAGQQVTRKVGDDLARLPFLRVWFRTKSAIVLH	520
Drosophila	T-DYCKSLDKKMKLLSYFKRYMIEHLVKAGANNVNIESDQISRMPHLHSWFRFTCAVVMH	505
Mus	LSNGTVQINFFQDHTKLIILCPLMAAVTYINEKRDFQTYRLSLLEEYGCCKELASRLRYAR	584
Homo	LSNGSVQINFFQDHTKLIILCPLMAAVTYIDEKRDFRTYRLSLLEEYGCCKELASRLRYAR	584
Xenopus	LSNGTVQINFFQDHTKIILCPLMAAVSYIDEKREFRTYKLSLIQEFGCCKELASRLRYAR	578
Hemicen	LSNGTVQINFFEDHTKLIIVCPMMGAATYIDAKRNFRTFRLNLIKHHGCTPDLYDRIKYAN	565
Biomphal	-----	
Caenorhab	LSNGTVQINFFNDHIKVMVLCPLMQAVTFIDENKRMFTYKFSHLAENGCPKFLHRIQYAK	580
Drosophila	LTNGSVQLN-FSDHMKLIILCPMSAITYMDQEKNFRTYRFSTIVENGVS KDLYQKIRYAQ	564
Mus	TMVDKLLSSRSASNRLKAS-----	603
Homo	TMVDKLLSSRSASNRLKAS-----	603
Xenopus	TMVEKLQSSKSAVAHVKASA-----	598
Hemicen	NMVKNMLDKKTTTAAAH-----	582
Biomphal	-----	
Caenorhab	CMIQRLVEEHTKEETKHNAPAAVAVRLPSTSSNVRLESAADIQPAYPSSSRR	632
Drosophila	EKLKMKLEKMFT-----	576

**Abbildung 16:** Alignment von Proteinkinasen aus diversen Organismen. Das aktive Zentrum der Proteine (D = Asparaginsäure) ist schwarz unterlegt.

Aus den Nukleotidsequenzen der Proben #110.1 und #121.7 konnten Primer zur Durchführung einer 5'-RACE-PCR hergestellt werden, mit denen eine Verlängerung dieser DNA-Fragmente gelang. Mit den Oligonukleotiden RACE-110.1 (5'-AAC TCC AGG ATC TCT GCT TCT GTC TGT TCA -3') und RACE-121.7.1 (5'-TGT GCG ACA TTC TCA GTC ATC TCT GAA CTC -3') konnte für die Probe #110.1 ein Amplifikat mit einer Länge von ca. 1900 Basenpaaren, für die Probe #121.7 eines von etwa 1750 bp Länge synthetisiert werden. Beide RACE-Produkte wurden aus dem Agarosegel isoliert und im pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Die Nukleotidsequenzen konnten für beide DNA-Abschnitte nicht vollständig ermittelt werden, die Proben wurden lediglich ansequenziert. Beide Sequenzen wurden in die Datenbank des NCBI unter den Accession-Nummern CB381771 (#110.1) und CB038849 (#121.7) hinterlegt. Bei der anschließenden Sequenzanalyse konnten keine Homologien zu bereits bekannten Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen in den verschiedenen Genbanken gefunden werden.



**Abbildung 17:** 1.5%-iges Agarosegel. RACE-Produkte der Proben #110.1 und #121.7 mit einer Länge von ca. 1.9 bzw. 1.75 kb. M = Molekulargewichtsmarker VI (s. 2.2.7, Abb. 6)

Die Verlängerung des 5'-Endes von fünf weiteren differentiell exprimierten DNA-Fragmenten mittels der 5'-RACE-PCR führte zu keinem Erfolg. Während der PCR konnte trotz Veränderung der Reaktionsbedingungen (Änderung der Temperaturen und Anzahl der durchlaufenen Zyklen, sowie der Durchführung einer Touchdown-PCR) kein weiteres Amplifikat synthetisiert werden.

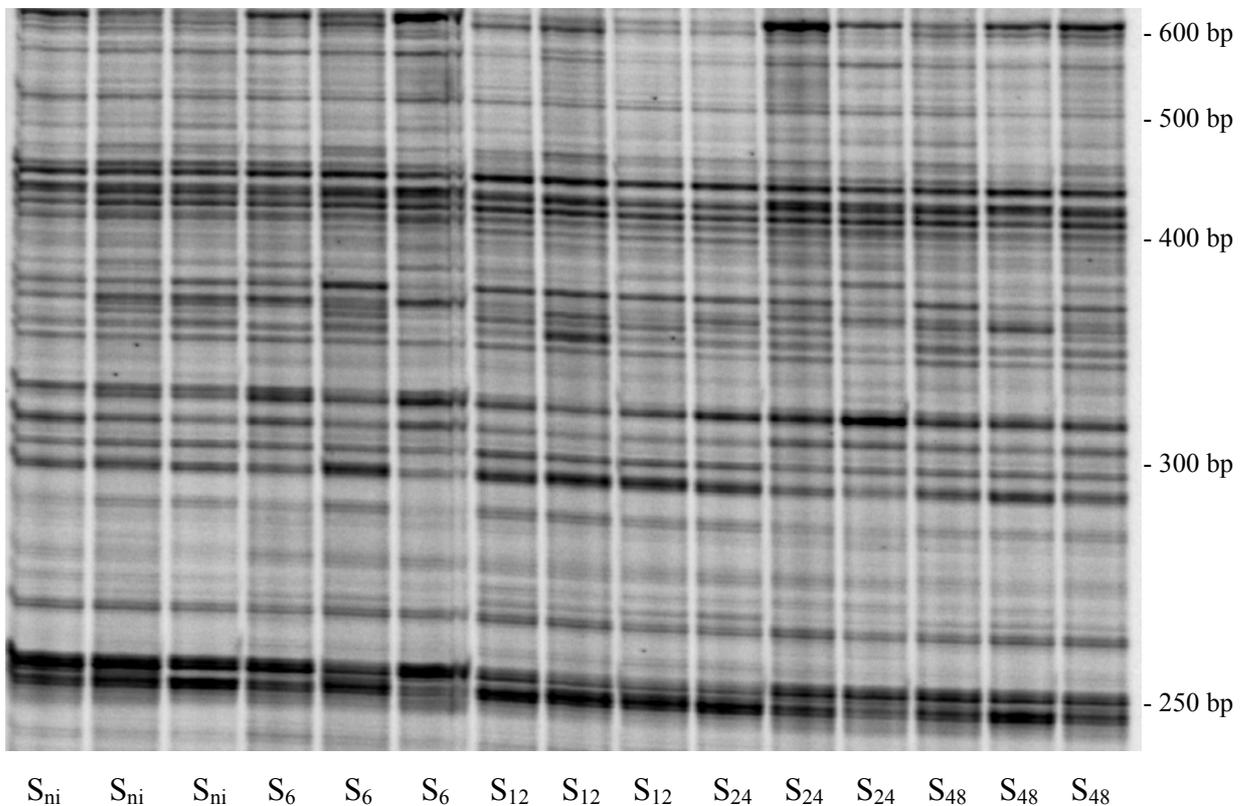
### 3.5 Vergleich der Genexpression in Hämocyten infizierter suszeptibler

#### *Biomphalaria glabrata* ( $S_{ni}$ vs. $S_{inf}$ )

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Genexpression in den Hämocyten von infizierten suszeptiblen Biomphalarien mit Hilfe der Methode des Differential Display wurden drei verschiedene oligo(dT)-Ankerprimer (H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>C und H-T<sub>11</sub>G) und acht unterschiedliche Oligonukleotide (H-AP1 bis H-AP8), also 24 Primerkombinationen verwendet. Verglichen wurde hierbei die Genexpression der Hämocyten naiver Schnecken mit derer von Abwehrzellen, die 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* aus den Zwischenwirtschnecken isoliert wurden.

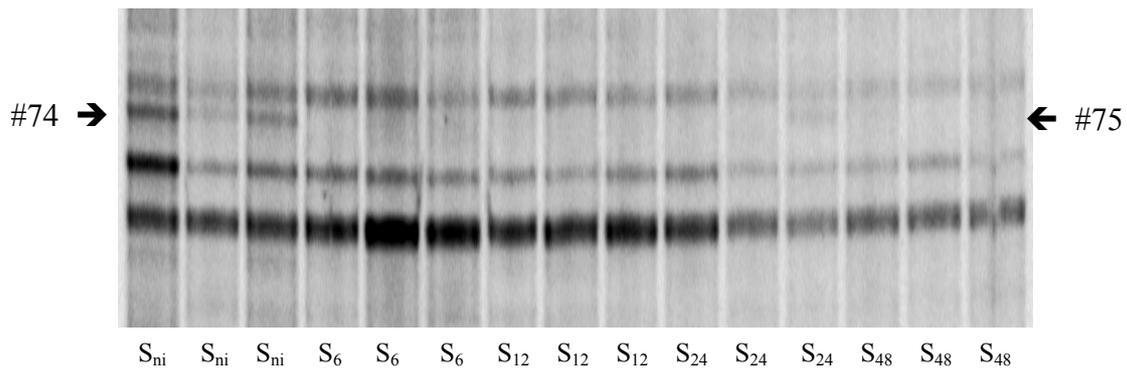
Bei diesem Vergleich zeigte sich, dass nur sehr wenige Unterschiede im Expressionsmuster der zu vergleichenden Proben nach der Infektion und während des gesamten Infektionsverlaufs auftraten. Die Differential Display-Gele zeigten jeweils unabhängig von der verwendeten Primerkombination ein sehr einheitliches DNA-Bandenmuster, was in der folgenden Abbildung exemplarisch dargestellt ist.

### 3.5.1 Differential Display- und SSCP-Gele



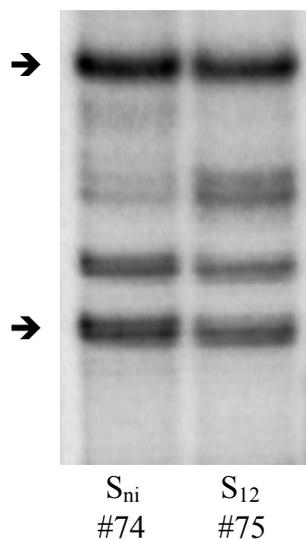
**Abbildung 18:** Autoradiografische Darstellung des Expressionsmusters von Hämocyten aus suszeptiblen Biomphalarien (S). Die Abwehrzellen wurden 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der Infektion der Schnecken mit dem Parasiten entnommen. Die DD-PCR wurde mit den Primern H-T<sub>11</sub>G und H-AP3 durchgeführt. Es sind keine Unterschiede im Bandenmuster der Hämocyten zwischen den nichtinfizierten (S<sub>ni</sub>) und infizierten Schnecken (S<sub>6</sub> bis S<sub>48</sub>) zu erkennen. Während des gesamten Infektionsverlaufs treten keine Veränderungen im Expressionsmuster auf.

Im Folgenden sind Beispiele dargestellt, in denen Unterschiede in der Stärke der Genregulation in den Hämocyten der empfänglichen Biomphalarien während der Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* in den DD-Gelen zu erkennen sind.

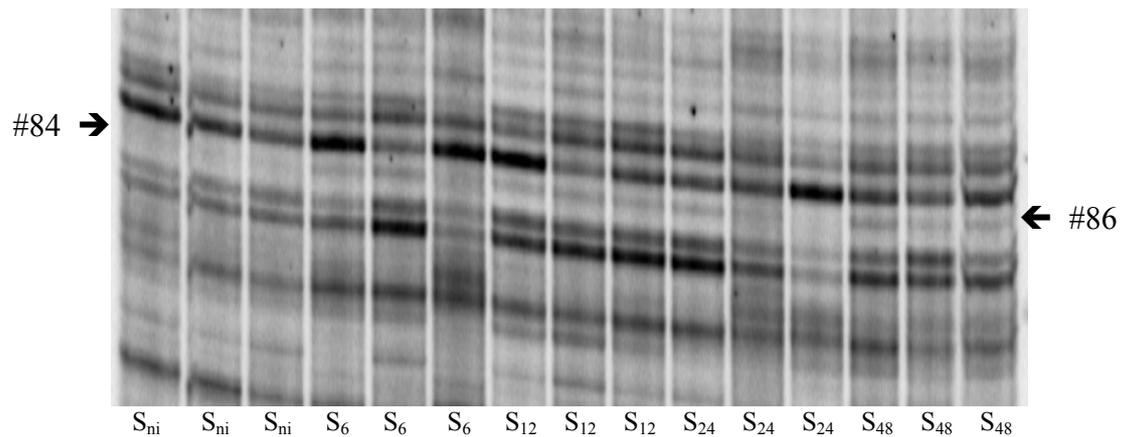


**Abbildung 19a:** DD-Gel. Die PCR wurde mit den Primern H-T<sub>11</sub>G und H-AP4 durchgeführt. Bei den Proben der naiven Schnecken (S<sub>ni</sub>) ist eine DNA-Bande zu erkennen (Pfeil, #74), die im Bandenmuster sämtlicher Infektionsstadien (S<sub>6</sub> - S<sub>48</sub>) nicht auftaucht (Pfeil, #75).

Nach der SSCP-Analyse zeigte sich, dass das in der Abbildung 19a dargestellte DNA-Fragment #74 auch in den Hämocyten der infizierten Schnecken exprimiert wird, und somit keine differentielle Genexpression dieser mRNA vorliegt (folgende Abbildung). Während des Infektionsverlaufs scheint dieser Genabschnitt allerdings herunterreguliert zu werden.

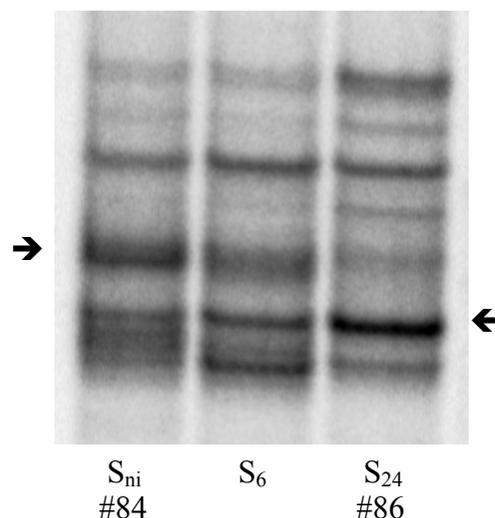


**Abbildung 19b:** SSCP-Analyse. Einzelstrang-Bandenmuster der aus dem DD-Gel (Abb. 19a) isolierten DNA-Fragmente #74 und #75, die mit den Oligonukleotiden H-T<sub>11</sub>G und H-AP4 reamplifiziert wurden. Die Pfeile weisen auf die DNA-Einzelstränge der Probe #74 hin, die isoliert und weiter analysiert wurden.

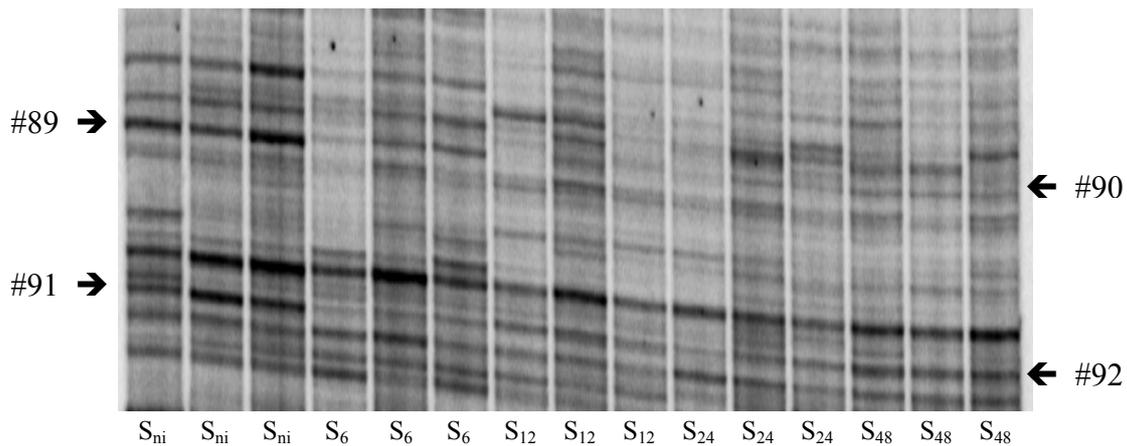


**Abbildung 20a:** Polyacrylamid-Gel. Die Hämocyten-Proben wurden mit den Primern H-T<sub>11</sub>C und H-AP7 amplifiziert. DNA-Bande bei den Infektionsstadien S<sub>6</sub> bis S<sub>48</sub> (Pfeil, #86), die im Expressionsmuster der nichtinfizierten Schnecken (S<sub>ni</sub>) nicht zu erkennen ist (Pfeil, #84).

Die SSCP-Analyse ergab auch hier, dass es sich bei dem Fragment #86, das während der gesamten Dauer der Infektion im Bandenmuster des DD-Gels vorhanden ist (Abb. 20a), um ein nicht differentiell exprimiertes DNA-Transkript handelt. Das SSCP-Gel (folgende Abbildung) zeigt für die aus dem Differential Display-Gel isolierten und erneut aufgetrennten Proben ein identisches Bandenmuster. Es existieren also lediglich Unterschiede in der Stärke der Genregulation der Probe.

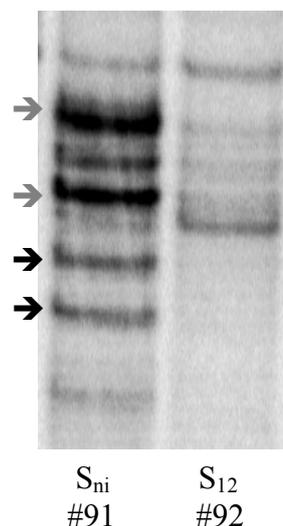


**Abbildung 20b:** SSCP-Gel. DNA-Banden aus dem DD-Gel (Abb. 20a) wurden mit den Primern H-T<sub>11</sub>C und H-AP7 reamplifiziert. Die SSCP-Analyse zeigt, dass keine differentielle Genexpression vorliegt. Alle Banden des Expressionsmusters der nichtinfizierten Probe S<sub>ni</sub> (#84) finden sich bei S<sub>6</sub> und S<sub>24</sub> wieder. Die Pfeile weisen auf die Einzelstränge hin, die isoliert und sequenziert wurden.



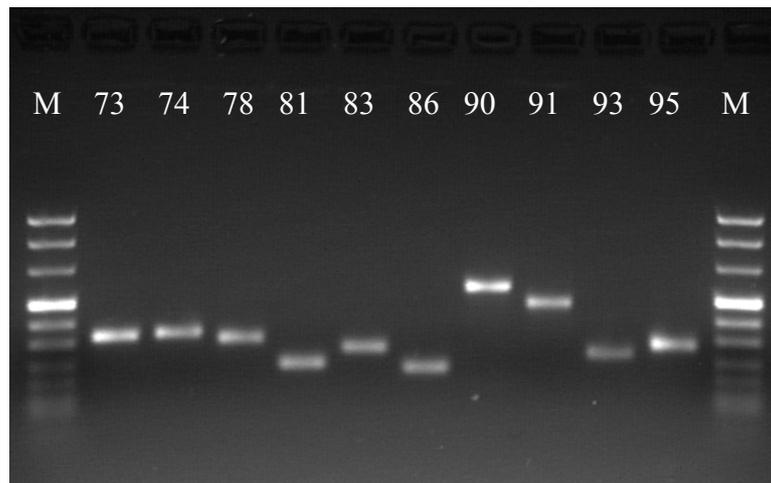
**Abbildung 21a:** Differential Display-Gel. Die DNA der Proben wurde mit der Primerkombination H-T<sub>11</sub>G und H-AP5 amplifiziert. Im Bandenmuster der nichtinfizierten Schnecken (S<sub>ni</sub>) sind DNA-Abschnitte zu erkennen (#89 und #91), die bei den Proben der verschiedenen Infektionsstadien (S<sub>6</sub> - S<sub>48</sub>) schwächer exprimiert werden (#90 und #92).

Für die aus dem DD-Gel isolierten Fragmente #89 und #90 ergab die erneute Auftrennung im SSCP-Gel ein DNA-Bandenmuster, in dem bei der Probe #90 zwei DNA-Einzelstränge auftauchen, die bei der Probe #89 nicht vorhanden sind. Es liegt somit eine differentielle Genexpression vor. Die unterschiedlich auftretenden Banden wurden isoliert und weiter analysiert (ohne Abbildung). Eine differentielle Genexpression bestätigte sich auch für das DNA-Fragment #91, was in der folgenden Abbildung veranschaulicht wird.



**Abbildung 21b:** SSCP-Gel. Die DNA der Fragmente #91 und #92 aus dem DD-Gel (Abb. 21a) wurden mit der Primerkombination H-T<sub>11</sub>G und H-AP5 reamplifiziert. Die beiden stark exprimierten Banden der Probe #91 (graue Pfeile) sind auch im Bandenmuster der Probe #92 zu finden. Im Expressionsmuster der nichtinfizierten Schneckenprobe sind zwei weitere DNA-Einzelstränge zu erkennen (schwarze Pfeile), die bei der Probe aus den infizierten Biomphalarien nicht exprimiert werden.

Im Vergleich der Genexpression der Hämocyten naiver suszeptibler Schnecken mit derer von Abwehrzellen, die 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der Infektion mit dem Parasiten aus den Zwischenwirtschnecken isoliert wurden, konnten insgesamt 23 DNA-Transkripte identifiziert und analysiert werden. Diese zeigten entweder Unterschiede in der Stärke ihrer Genregulation oder waren differentiell exprimiert. Eine Auswahl der aus den SSCP-Gelen isolierten und reamplifizierten Fragmente zeigt die Abbildung 22. Anschließend wurden diese kloniert und sequenziert.



**Abbildung 22:** Ethidiumbromid gefärbtes 1.5%-iges Agarosegel. DNA-Fragmente mit differentieller Genexpression und DNA-Transkripte mit unterschiedlich ausgeprägter Genregulation. Die für die Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnitts verwendeten Primerkombinationen sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet. M = Molekulargewichtsmarker VIII (s. Abb. 6 unter 2.2.7).

Für sieben der 23 DNA-Fragmente konnte durch die SSCP-Analyse eine differentielle Genexpression nachgewiesen werden. Fünf dieser Genabschnitte wurden ausschließlich in den Proben der infizierten Biomphalarien exprimiert, während diese in den Abwehrzellen der naiven Schnecken nicht nachgewiesen werden konnten. Dagegen wurden aus den Hämocyten der nichtinfizierten Schnecken zwei DNA-Fragmente isoliert, die in den verschiedenen Infektionsstadien nicht exprimiert wurden.

Bei den anderen 16 untersuchten DNA-Transkripten handelte es sich um Fragmente, die sowohl in den Hämocyten der nichtinfizierten als auch in denen der infizierten Biomphalarien nachgewiesen werden konnten. Diese zeigten während der Infektion Unterschiede in der Stärke ihrer Genregulation, wobei 10 Fragmente während des Infektionsverlaufs hochreguliert, sechs dagegen herunterreguliert wurden.

### 3.5.2 Sequenzanalysen

Sämtliche Sequenzen der DNA-Transkripte wurden sowohl auf Nukleinsäurebasis als auch übersetzt in ihre Aminosäuresequenz auf Homologien zu bereits bekannten Sequenzen und Proteinen untersucht.

Unabhängig vom Erfolg der Homologiesuche wurden alle Sequenzen der analysierten DNA-Fragmente in der EST-Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) hinterlegt. Diese sind unter Angabe ihrer Accession-Nummern in den beiden folgenden Tabellen aufgelistet.

**Tabelle 3:** DNA-Fragmente mit differentieller Genexpression. Die Größen der bezeichneten Proben, die verwendeten Primerkombinationen und deren Accession-Nummern sind aufgelistet. Daneben ist der Verlauf der Genexpression zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten dargestellt.

Fragment-bezeichnung	Primer-kombination	Größe (bp)	Accession-number	Expression 0/6/12/24/48
81.3a	H-T <sub>11</sub> A/H-AP8	215	BI946547	L/ <b>H</b> /H/H/H
81.4	H-T <sub>11</sub> A/H-AP8	216	BI946548	L/ <b>H</b> /H/H/H
83.3	H-T <sub>11</sub> C/H-AP6	275	BI946549	L/H/H/ <b>H</b> /H
83.5	H-T <sub>11</sub> C/H-AP6	272	BI946550	L/H/H/ <b>H</b> /H
90.3a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP5	552	BI946551	H/H/L/ <b>L</b> /L
91.1b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP5	469	BI946552	<b>H</b> /H/L/L/L
91.2a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP5	448	BI946553	<b>H</b> /H/L/L/L

L = Low (geringe Genexpression, herunterreguliert), H = High (hohe Genexpression, hochreguliert)

**Tabelle 4:** DNA-Fragmente mit unterschiedlich starker Genregulation. Die Größen der bezeichneten Proben, die verwendeten Primerkombinationen und deren Accessionnummern sind aufgelistet. Daneben ist der Verlauf der Genexpression zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten dargestellt.

Fragment-bezeichnung	Primer-kombination	Größe (bp)	Accession-number	Expression 0/6/12/24/48
73.3a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP3	329	BI946554	L/H/H/H/H
73.4b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP3	325	BI946555	L/H/H/H/H
74.2a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP4	337	BI946556	H/L/L/L/L
77.1a	H-T <sub>11</sub> C/H-AP1	334	BI936346	L/H/H/H/H
78.1a	H-T <sub>11</sub> C/H-AP2	310	BI946558	H/L/L/L/L
84.1a	H-T <sub>11</sub> C/H-AP7	201	BI946559	H/L/L/L/L
84.2a	H-T <sub>11</sub> C/H-AP7	203	BI946560	H/L/L/L/L
84.4	H-T <sub>11</sub> C/H-AP7	201	BI946561	H/L/L/L/L
86.2a	H-T <sub>11</sub> C/H-AP7	201	BI946562	H/L/L/L/L
93.1a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP6	245	BI946563	L/H/H/H/H
93.3a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP6	247	BI946564	L/H/H/H/H
94.3	H-T <sub>11</sub> G/H-AP6	245	BI946566	L/H/H/H/H
94.5	H-T <sub>11</sub> G/H-AP6	248	BI946567	L/H/H/H/H
94.6	H-T <sub>11</sub> G/H-AP6	250	BI946568	L/H/H/H/H
95.1a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP7	295	BI946569	L/H/H/H/H
95.2a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP7	283	BI946570	L/H/H/H/H

L = Low (geringe Genexpression, herunterreguliert), H = High (hohe Genexpression, hochreguliert)

Die Suche nach Homologien in den verschiedenen Datenbanken führte für das DNA-Transkript #86.2a, das während des gesamten Infektionsverlaufs herunterreguliert wird, zu einer Übereinstimmung zu Genen der Fibrinogen-verwandten Proteine (FREPs) aus *Biomphalaria glabrata* (AY028462). Diese beträgt 44%, in einem Bereich von 94 Basen jedoch 94%. FREPs sind Proteine in der Hämolymphe der Zwischenwirtschnecken, die Parasitenantigene binden (vgl. dazu auch #113.1b (3.4.2) und #20.21 (3.6.2)).

Die Aminosäuresequenz der Probe #77.1a, die nach der Parasiteninfektion hochreguliert wird, zeigt signifikante Übereinstimmungen zu Genen, die für den Elongationsfaktor 1-beta' kodieren. Dieser vermittelt während der Translation die Bindung der tRNAs an die große

Ribosomenuntereinheit. Im Vergleich mit *Drosophila melanogaster* (O96827) ergab sich eine 80%-ige, mit *Bombyx mori* (P29522) eine 77%-ige Homologie.

Das DNA-Fragment #73.3a weist in seiner AS-Sequenz eine Homologie von 52% zu dem Protein c20orf178 aus *Homo sapiens* (Q9H444) und *Mus musculus* (Q9D8B3) auf. Dieser Abschnitt gehört zur Familie der SNF7-Proteine, die wichtige Funktionen bei der Sortierung von Proteinen und bei deren Transport vom Endosom zu den Vakuolen bzw. Lysosomen ausüben.

Zu 56 bis 60% identisch ist die Aminosäuresequenz der Probe 91.1b zu dem 60S Ribosomalen Protein L23 (RPL23) aus verschiedenen Organismen, wie *Anopheles gambiae* (EAA11004), *Drosophila melanogaster* (Q9W08) oder *Homo sapiens* (P29316). RPL23 ist an der großen Untereinheit der Ribosomen lokalisiert und ermöglicht den Chaperonen die Bindung an den neu entstehenden Polypeptidketten. Es ist damit indirekt am Kontrollprozess der Faltung von Proteinen beteiligt.

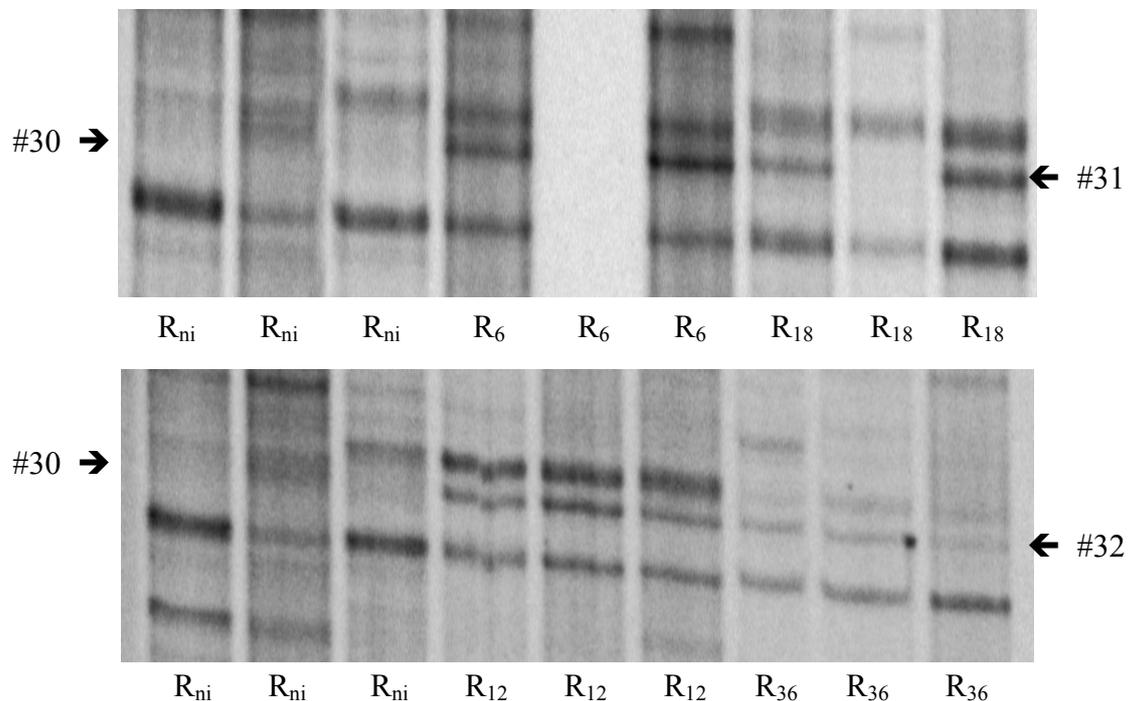
### 3.6 Vergleich der Genexpression in Hämocyten infizierter resistenter

#### *Biomphalaria glabrata* ( $R_{ni}$ vs. $R_{inf}$ )

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Genexpression in den Hämocyten von infizierten resistenten Biomphalarien wurden drei verschiedene oligo(dT)-Ankerprimer (H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>C und H-T<sub>11</sub>G) und 8 Zufallsprimer (H-AP1 bis H-AP8) verwendet. Verglichen wurde hierbei die Genexpression der Hämocyten naiver Schnecken mit derer von Abwehrzellen, die 6, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden nach der Infektion mit *Schistosoma mansoni* aus den Zwischenwirtschnecken isoliert wurden.

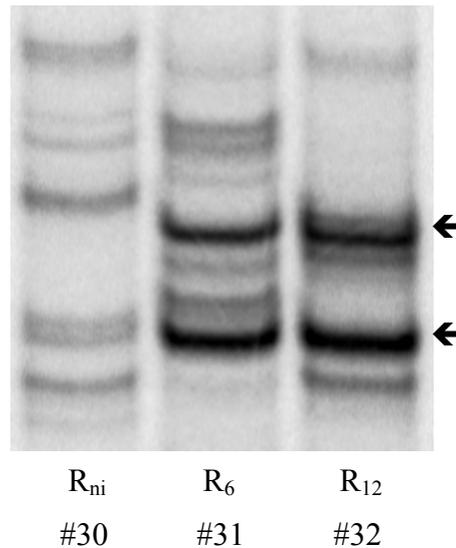
In diesem Vergleich zeigte sich, dass nach und im Verlauf der Infektion der Biomphalarien deutliche Unterschiede im Expressionsmuster der Hämocyten-Proben auftraten. Die unterschiedlichen DNA-Bandenmuster konnten jeweils unabhängig von der verwendeten Primerkombination in den Differential Display- und den SSCP-Gelen dargestellt werden. Dies wird in den nachfolgenden Abbildungen veranschaulicht.

### 3.6.1 Differential Display- und SSCP-Gele



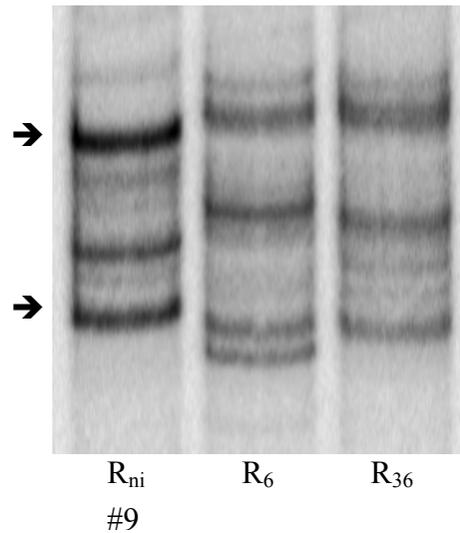
**Abbildung 23a:** DD-Gele. Mit der Primerkombination H-T<sub>11</sub>A/H-AP4 konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, welches 6, 12, 18 und 36 Stunden nach der Infektion (R<sub>6</sub> - R<sub>36</sub>) in den Hämocyten exprimiert wurde (#31 bzw. #32). In den Proben der nichtinfizierten Schnecken (R<sub>ni</sub>) ist diese DNA-Bande auf den DD-Gelen nicht zu erkennen (#30).

Die während des Infektionsverlaufs im DD-Gel auftretenden Banden wurden aus diesem isoliert und einer SSCP-Analyse unterzogen. Dabei bestätigte sich die differentielle Genexpression dieser DNA-Transkripte, die im Bandenmuster der nichtinfizierten Probe nicht nachzuweisen war (folgende Abbildung). Die DNA-Einzelstränge der unterschiedlich exprimierten Proben wurden isoliert weiter charakterisiert.



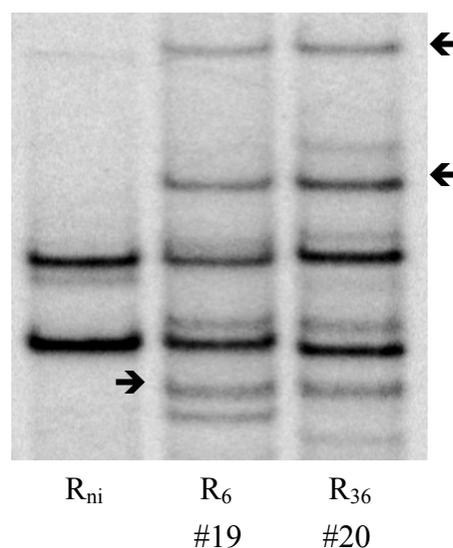
**Abbildung 23b:** SSCP-Gel. Die DNA der Proben #30, #31 und #32 aus dem DD-Gel (Abb. 23a) wurden mit den Primern H-T<sub>11</sub>A und H-AP4 reamplifiziert. Die SSCP-Analyse zeigt die differentielle Genexpression der Fragmente aus den infizierten Biomphalarien-Proben. Deren DNA-Einzelstränge (Pfeile) kommen im Bandenmuster der nichtinfizierten Probe #30 nicht vor.

Das folgende SSCP-Gel resultiert aus DNA-Fragmenten aus einem Differential Display-Gel, in dem lediglich bei den Proben aus den naiven Schnecken eine Bande zu erkennen war. Dieser Genabschnitt war im Expressionsmuster der Hämocyten-Proben der verschiedenen Infektionsstadien nicht nachweisbar. Die entsprechenden DNA-Bereiche wurden aus dem DD-Gel isoliert und einer SSCP-Analyse unterzogen, bei der sich die differentielle Genexpression des DNA-Transkripts bestätigte (folgende Abbildung). Die unterschiedlich exprimierten Banden wurden kloniert und anschließend sequenziert.



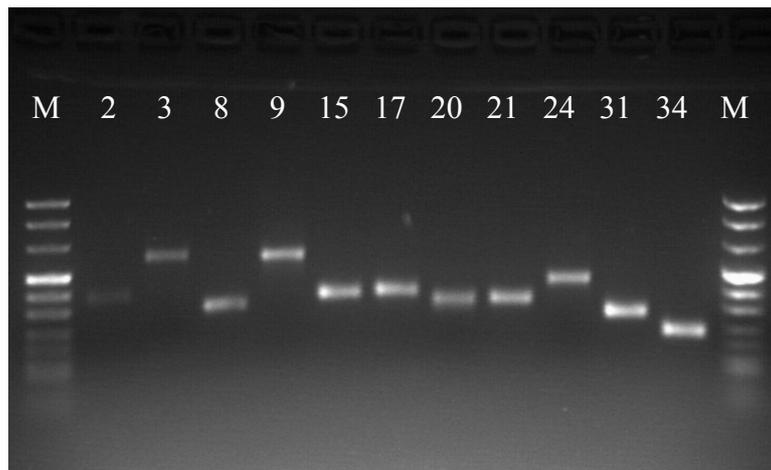
**Abbildung 24:** SSCP-Gel. Die aus dem DD-Gel isolierte DNA der Proben  $R_{ni}$ ,  $R_6$  und  $R_{36}$  wurde mit den Primern H-T<sub>11</sub>G und H-AP1 reamplifiziert. Die beiden Einzelstränge der Probe #9 (Pfeile) sind im Bandenmuster der infizierten Proben  $R_6$  und  $R_{36}$  nicht nachzuweisen, also differentiell exprimiert.

Die folgende Abbildung eines SSCP-Gels stellt ein weiteres Beispiel für die Verifizierung von differentiell exprimierten DNA-Fragmenten dar, die mit Hilfe der Differential Display-Technologie identifiziert wurden.



**Abbildung 25:** SSCP-Gel. Die DNA-Abschnitte aus dem DD-Gel wurden mit den Oligonukletiden H-T<sub>11</sub>G und H-AP4 reamplifiziert. Im Expressionsmuster der Proben aus den infizierten *Biomphalaria glabrata* #19 und #20 sind Banden zu erkennen (Pfeile), die im Bandenmuster der Probe der nichtinfizierten Schnecken ( $R_{ni}$ ) nicht erscheinen.

Im Vergleich der Hämocyten-Genexpression zwischen naiven und infizierten resistenten *Biomphalaria glabrata* konnten insgesamt 23 DNA-Transkripte identifiziert werden, die entweder differentiell exprimiert wurden, oder die Unterschiede in der Stärke ihrer Genregulation aufwiesen. Eine Auswahl dieser aus den SSCP-Gelen isolierten und reamplifizierten Fragmente zeigt die folgende Abbildung. Anschließend wurden diese kloniert und sequenziert.



**Abbildung 26:** Aus den SSCP-Gelen isolierte und reamplifizierte DNA-Fragmente in einem 1.5%-igen Agarosegel. Die Bandengrößen des Längenstandards VIII sind in Abbildung 6 unter 2.2.7 dargestellt.

Mit Hilfe der SSCP-Analyse konnte für 21 der 23 DNA-Fragmente eine differentielle Genexpression nachgewiesen werden. Von diesen wurden 12 DNA-Transkripte ausschließlich in den Abwehrzellen der infizierten *Biomphalaria* exprimiert, nicht aber in den Hämocyten-Proben naiver Schnecken. Der Nachweis der differentiellen Genexpression in den Abwehrzellen der nichtinfizierten *Biomphalaria glabrata* konnte dagegen für neun DNA-Abschnitte erbracht werden.

Lediglich bei zwei Fragmenten zeigte sich nach der Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* ein Unterschied in der Stärke der Genregulation. Dabei wurde ein DNA-Transkript hochreguliert (#14.1), während das andere im Verlauf der Infektion herunterreguliert wurde (#21.1).

### 3.6.2 Sequenzanalysen

Sämtliche DNA-Fragmente wurden sowohl auf Basis der Nukleinsäure- als auch übersetzt in ihre Aminosäuresequenz auf Homologien zu bereits bekannten Sequenzen und Proteinen untersucht.

Nach der Homologiesuche wurde die Nukleotidsequenzen in die EST-Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) eingetragen. Diese sind unter Angabe ihrer Accession-Nummern in den beiden folgenden Tabellen aufgelistet.

**Tabelle 5:** DNA-Fragmente mit differentieller Genexpression. Die Größen der Proben und deren Accession-Nummern, sowie die bei der PCR verwendeten Primerkombinationen sind angegeben. Daneben ist der Verlauf der Genexpression zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten dargestellt.

Fragment-bezeichnung	Primer-kombination	Größe (bp)	Accession-number	Expression 0/6/12/18/24/36/48
2.1	H-T <sub>11</sub> C/H-AP5	355	BI936349	L/H/H/H/H/H/H
2.2	H-T <sub>11</sub> C/H-AP5	346	BI936350	L/H/H/H/H/H/H
3.1	H-T <sub>11</sub> C/H-AP8	583	BI936351	H/L/L/L/L/L/L
4.1b	H-T <sub>11</sub> C/H-AP8	211	BI936352	H/L/L/L/L/L/L
6.1	H-T <sub>11</sub> C/H-AP8	241	BI936353	H/H/H/H/H/L/L
8.1	H-T <sub>11</sub> C/H-AP8	299	BI936354	H/H/H/H/H/L/L
8.3	H-T <sub>11</sub> C/H-AP8	290	BI936355	H/H/H/H/H/L/L
8.5	H-T <sub>11</sub> C/H-AP8	306	BI936356	H/H/H/H/H/L/L
9.12a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP1	159	BI936357	H/L/L/L/L/L/L
9.12b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP1	213	BI936358	H/L/L/L/L/L/L
9.21a	H-T <sub>11</sub> G/H-AP1	277	BI936359	H/L/L/L/L/L/L
9.21b	H-T <sub>11</sub> G/H-AP1	293	BI936360	H/L/L/L/L/L/L
15.20	H-T <sub>11</sub> G/H-AP4	358	BI936361	H/L/L/L/L/L/L
17.20	H-T <sub>11</sub> G/H-AP4	361	BI936362	H/L/L/L/L/L/L
19.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP4	210	BI936363	H/L/L/L/L/L/L
20.20	H-T <sub>11</sub> G/H-AP4	290	BI936364	H/L/L/L/L/L/L
20.21	H-T <sub>11</sub> G/H-AP4	289	BI936365	H/L/L/L/L/L/L
24.1	H-T <sub>11</sub> A/H-AP2	431	BI936366	H/L/L/L/L/L/H
24.2	H-T <sub>11</sub> A/H-AP2	428	BI936367	H/L/L/L/L/L/H

31.1	H-T <sub>11</sub> A/H-AP4	278	BI936368	L/H/ <b>H</b> /H/H/H/H
31.2	H-T <sub>11</sub> A/H-AP4	277	BI936369	L/H/ <b>H</b> /H/H/H/H

L = Low (geringe Genexpression, herunterreguliert), H = High (hohe Genexpression, hochreguliert)

**Tabelle 6:** DNA-Fragmente mit unterschiedlich starker Genregulation. Die Größen der bezeichneten Proben, die verwendeten Primerkombinationen und deren Accession-Nummern sind aufgelistet. Daneben ist der Verlauf der Genexpression zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten dargestellt.

Fragment-bezeichnung	Primer-kombination	Größe (bp)	Accession-number	Expression 0/6/12/18/24/36/48
21.1	H-T <sub>11</sub> A/H-AP1	335	BI936346	<b>H</b> /L/L/L/L/L/L
14.1	H-T <sub>11</sub> G/H-AP3	234	BI596270	L/L/H/H/ <b>H</b> /H/H

L = Low (geringe Genexpression, herunterreguliert), H = High (hohe Genexpression, hochreguliert)

Das während der Parasiteninfektion herunterregulierte DNA-Fragment #20.21 weist Homologien zu Genen auf, die für Fibrinogen-verwandte Proteine (FREPs) aus *Biomphalaria glabrata* (AY028462) kodieren. Die Übereinstimmung zu diesen FREP-Genen liegt bei 51%, in einem Sequenzabschnitt von 181 Nukleotiden bei 81% (vgl. dazu auch #113.1b (3.4.2) und #86.2a (3.5.2)).

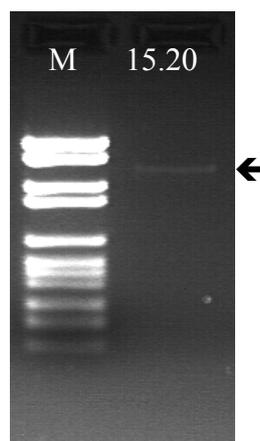
Für das DNA-Transkript #21.1 wurde dieselbe Nukleinsäuresequenz wie für den DNA-Abschnitt #77.1a aus den Versuchen mit den infizierten suszeptiblen Schnecken gefunden. Es handelt sich um einen Genabschnitt, der sowohl beim empfänglichen als auch beim resistenten Phänotyp exprimiert wird. Die Untersuchung der Genexpression mit Hilfe der Differential Display-Methode zeigt, dass während der Infektion mit *Schistosoma mansoni* dieses Gen in den Abwehrzellen der empfänglichen Schnecken hochreguliert wird (#77.1a), während es in den Hämocyten der resistenten Biomphalarien herunterreguliert wird (#21.1). Das untersuchte DNA-Transkript kodiert für den Elongationsfaktor 1-beta', der während der Translation die Bindung zwischen tRNAs und Ribosom vermittelt und hat zu diesem eine Homologie von bis zu 80% (s. 3.5.2).

Die Suche nach Homologien erbrachte für die Probe #8.5 Übereinstimmungen zum 60S Ribosomalen Protein L29 (RPL29) verschiedener Organismen. Die Aminosäuresequenz hat eine 80%-ige Identität zu der aus *Ictalurus punctatus* (Q90YT8) und eine 74%-ige zu *Mus musculus* (AAH02062). RPL29 weist eine sehr große Ähnlichkeit zu einem Heparin/Hepararan-Sulfat bindenden Oberflächenpeptid auf humanen Epithelzellen auf.

Das Fragment #14.1 besitzt dieselbe Sequenz wie das beim Vergleich der Genexpression in den Hämocyten von resistenten und empfänglichen Schnecken gefundene DNA-Fragment #105.1, welches ebenfalls dem resistenten Phänotyp zuzuordnen ist. Während der Infektion zeigt sich, dass dieses Gen ab 12 Stunden nach dem Eindringen des Parasiten in die Zwischenwirtschnecke in deren Abwehrzellen hochreguliert wird. Dieser Zustand bleibt bis zum Zeitpunkt von 48 Stunden nach der Infektion, d.h. während der gesamten Dauer der Abwehrreaktion bestehen. Eine Homologie zu bekannten Sequenzen konnte nicht gefunden werden.

### 3.6.3 Verlängerung der cDNA mit Hilfe der RACE-PCR

Anhand der Nukleotidsequenz des DNA-Transkripts 15.20 konnte ein Primer (RACE-15.20: 5'-AGA GAA GCA AAC GGA GCT CCA CTA AGT CTG- 3') hergestellt werden, mit dem eine 5'-RACE-PCR zur Verlängerung der Sequenz erfolgreich durchgeführt werden konnte.



**Abbildung 27:** Ethidiumbromid gefärbtes 1.5%-iges Agarosegel. DNA-Transkript #15.20 nach der 5'-RACE-PCR mit einer Länge von ungefähr 1.5kb. Die Größen der einzelnen Banden des Molekulargewichtsmarker VI (M) sind in der Abbildung 6 unter 2.2.7 dargestellt.

Nach der Durchführung der PCR konnte für die Probe 15.20 ein DNA-Abschnitt mit einer Größe von ungefähr 1500 bp amplifiziert werden. Das RACE-Produkt wurde aus dem Agarosegel isoliert, im pCR4-TOPO-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Mit der bereits bekannten Sequenz des DD-Fragments konnte diese auf eine Länge von 1487 bp korrigiert werden. Bei der anschließenden Sequenzanalyse konnten keine Homologien zu bereits bekannten Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen in den verschiedenen Datenbanken gefunden werden. Die Sequenz des RACE-Produktes wurde in die Datenbank des NCBI unter der Accession-Nummer CB381772 eingetragen.

### 3.7 Screening einer Hämocyten cDNA-Genbank

Alternativ zur Durchführung einer RACE-PCR wurde zur Verlängerung der Nukleotidsequenzen der differentiell exprimierten DNA-Transkripte zwei cDNA-Genbibliotheken gescreent. Mit spezifischen DNA-Sonden ist es möglich, die entsprechenden Klone in den Genbanken nachzuweisen und diese anschließend zu analysieren.

Zum einen wurde eine cDNA-Genbank aus den Hämocyten von resistenten und suszeptiblen *Biomphalaria glabrata* wie unter 2.2.18 beschrieben, hergestellt. Für diese Genbibliothek ergab sich ein Titer von  $1.92 \times 10^9$  pfu. Aus den Abwehrzellen von *Lymnaea stagnalis*, einer zu *Biomphalaria glabrata* eng verwandten Schneckenart, wurde ebenfalls eine cDNA-Bank konstruiert. Der Titer dieser Genbibliothek lag bei  $5.7 \times 10^9$  pfu. Beim Screening der beiden Genbanken mit mehreren Digoxigenin markierten DNA-Fragmenten, die aus den oben angeführten Versuchen hervorgegangen sind, konnten keine Klone identifiziert werden. Die jeweiligen Kontrollreaktion mit einer Aktin-Sonde verliefen dagegen positiv (ohne Abbildung). Veränderungen der Reaktionsbedingungen, wie dem Ändern der Hybridisierungstemperatur, der Dauer der Reaktion oder der Stringenz beim Waschen der Membranen, führten zu keinem positiven Ergebnis.

### **Zusammenfassung**

Mit der DD- und der SSCP-Technologie konnten genetische Unterschiede zwischen den beiden Phänotypen von *Biomphalaria glabrata* nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 66 DNA-Transkripte untersucht, von denen für sieben Fragmente Homologien zu bereits bekannten Sequenzen gefunden werden konnten. Zwei dieser Fragmente (#113.1b und 105.1) wurden auch bei den infizierten Schneckenstämmen nachgewiesen. Dabei handelt es sich zum einen um den für die FREPs (Fibrinogen Related Proteins) kodierenden Genabschnitt #113.1b, der sowohl bei den resistenten als auch bei den suszeptiblen Biomphalarien exprimiert wird. In beiden Phänotypen wird das Gen während des Infektionsverlaufs herunterreguliert. Außerdem wurde das DNA-Fragment #105.1 bei den infizierten R-Schnecken nachgewiesen, wo es während der Infektion hochreguliert wird. Bei den empfänglichen Schnecken trat es dagegen nicht auf.

Die Untersuchung der differentiellen Genexpression der infizierten Biomphalarien zeigte, dass beim resistenten Phänotyp während der Infektion sehr viele qualitative Unterschiede auftreten. Bei 90% der analysierten DNA-Transkripte wurde eine differentielle Genexpression festgestellt. Bei den empfänglichen Schnecken wurden dagegen mehr quantitative Unterschiede nachgewiesen. Der Großteil dieser DNA-Fragmente zeigte Unterschiede in der Stärke der Genexpression. Insgesamt wurden aus beiden Schnecken-Phänotypen 46 DNA-Transkripte analysiert. Eine große Anzahl (85%) davon konnte nicht charakterisiert werden, während für 15% der untersuchten Fragmente Homologien ermittelt werden konnten.

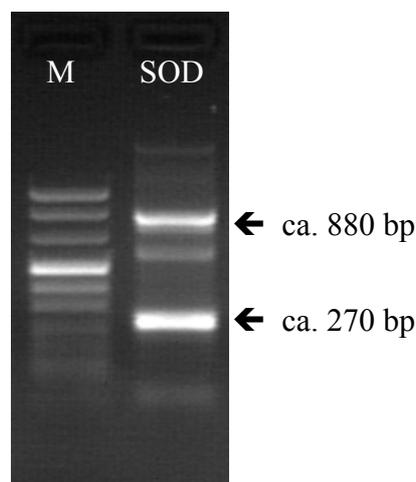
Von den DNA-Transkripten, die Homologien zu bekannten Gen- und Proteinsequenzen aufweisen, konnten drei ermittelt werden, denen verschiedene Funktionen während des Zellzyklus oder bei der Signaltransduktion zukommen. Fünf DNA-Fragmente zeigten Homologien zu abwehrrelevanten Proteinen bzw. zu Adhäsionsmolekülen. Des Weiteren konnten Übereinstimmungen zu Genen bzw. Proteinen nachgewiesen werden, die als Stoffwechsel-Metabolite in diversen Organismen vorkommen, sowie zu einem Elongationsfaktor und zu ribosomalen Proteinen.

### 3.9 Nachweis der Expression antioxidativer Enzyme mit der OneStep RT-PCR

Zum Nachweis der Expression von Enzymen, die bei der Abwehr von Fremdkörpern oder Parasiten in *Biomphalaria glabrata* eine entscheidende Rolle spielen, wurde wie unter 2.2.22 beschrieben eine OneStep RT-PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Dabei sollte die Genexpression der Superoxid-Dismutase und der Catalase, die beim Auf- und Abbau von Wasserstoffperoxid beteiligt sind nachgewiesen werden. Des weiteren sollte die Expression dieser Enzyme während des Verlaufs der Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* bestimmt werden.

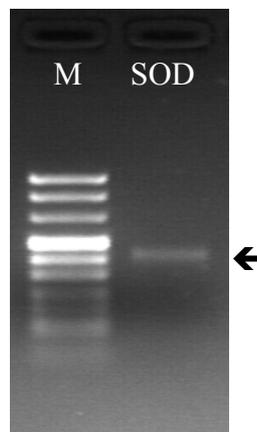
#### 3.9.1 Superoxid-Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

Zum Nachweis der Superoxid-Dismutase, welche die Reaktion zur Bildung von Wasserstoffperoxid katalysiert, wurde Gesamt-RNA aus den Hämocyten von nichtinfizierten Biomphalarien isoliert und in eine OneStep RT-PCR-Reaktion eingebracht. Mit den Oligonukleotiden SOD1 und SOD2 (s. 2.1.4) konnten dabei mehrere DNA-Produkte amplifiziert und damit die SOD in den Abwehrzellen nachgewiesen werden (s. Abb. 28).



**Abbildung 28:** PCR-Produkte nach der OneStep RT-PCR in einem Ethidiumbromid gefärbten 1.5%-igen Agarosegel. M = Molekulargewichtsmarker VIII (s. Abb. 6; 2.2.7)

Die zwei in der Abbildung 28 gekennzeichneten DNA-Produkte, die mittels der OneStep RT-PCR amplifiziert werden konnten, wurden aus dem Agarosegel isoliert und im pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Die Klonierung und die anschließende Sequenzierung verlief nur für das kleinere DNA-Fragment mit einer Größe von etwa 270 bp erfolgreich. Das größere Amplifikat konnte nicht analysiert werden. Durch eine Datenbankrecherche konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem amplifizierten DNA-Fragment um einen Abschnitt der Superoxid-Dismutase handelt. Anhand der vorliegenden Nukleotidsequenz wurde ein Primer zur Durchführung einer 5'-RACE-PCR generiert (SOD-RACE: 5'-CTG TGC CAT CAT CCC CTG CTA TTA TAT TTC C- 3'). Mit diesem konnte die bereits bekannte Nukleotidsequenz verlängert werden.



**Abbildung 29:** 1.5%-iges Agarosegel. RACE-Produkt der Superoxid-Dismutase (SOD) aus *Biomphalaria glabrata*. Die Größen der einzelnen Banden des Molekulargewichtsmarkers VIII (M) sind in der Abbildung 6 unter 2.2.7 dargestellt.

Die Größe des DNA-Fragments lag nach der RACE-PCR bei 419 bp. Zusammen mit der bereits vorliegenden bekannten Sequenz ergab sich eine Länge von 551 Basenpaaren. Übersetzt in die Aminosäuresequenz konnte ein offener Leserahmen (ORF) mit einer Länge von 140 AS bzw. 420 bp gefunden werden. Dieser beinhaltet das Startcodon ATG und die für die SOD charakteristischen Bindungsstellen für die Metallatome. Beide Sequenzen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

```

1 aagcagtggtaacaacgcagagtacgcgggggtccacccttgacctttaacaaaactgctt 60
  S S G N N A E Y A G V H P - P L T K L L
61 tatcataactaagtgtctacattatTTTTAGACGAACACCAACTGTAAAGACGCACACTTAA 120
  Y H T K C L H Y F R R T P T V K T H T -
121 agattgaagatgggtcaaggcgggtgtgtgttttgagtccaggatcagctgcaggaatcagc 180
  1 R L K M V K A V C V L S P G S A A G I T 17
181 ggaacaatcacatttactcaagagacttctggtgattgtacattagtttccggacaggtg 240
  18 G T I T F T Q E T S G D C T L V S G Q V 37
241 aaaggccttgctccaggcaaacatggtttccatattcaccaatttggtgactataactaat 300
  38 K G L A P G K H G F H I H Q F G D Y T N 57
301 ggatgtgtaagtgtggagccattttaacccaaaaacaagtctcacgggtgggcccatta 360
  58 G C V S A G A H F N P K N K S H G G P L 77
361 gatcaagaaagacatgcaggggatttgggaaatataatagcaggggatgatggcacagca 420
  78 D Q E R H A G D L G N I I A G D D G T A 97
421 agtattgaatttaagactcgcataattcctctcataggagaaaactcaatcattgggtcgc 480
  98 S I E F K D S H I P L I G E N S I I G R 117
481 agtatagtgggtgcatgaaaaggaagatgaccttggcaaagggtggaatgatgaaagtttg 540
  118 S I V V H E K E D D L G K G G N D E S L 137
541 aagacgggaa 551
138 K T G 140

```

**Abbildung 30:** Nuklein- und Aminosäuresequenz der Superoxid-Dismutase aus *Biomphalaria glabrata* mit einer Länge von 551 Basenpaaren (in 3'-5'-Richtung dargestellt). Der offene Leserahmen besteht aus 140 AS. Das Startcodon Methionin (M) ist grau unterlegt, Stopcodons sind als Striche gekennzeichnet. Die Histidine (H) und die Asparaginsäure (D) stellen die Bindungsstellen für das Kupfer- (gelb) bzw. das Zinkatom (grün) dar. Am Histidin 65 (rot) können beide Atome binden.

Bei der Homologiesuche ergaben sich signifikante Übereinstimmungen zu Cu/Zn-Superoxid-Dismutasen diverser Organismen, wie zum Beispiel *Aplysia californica* (Q8MUT8), *Mus musculus* (P08228), *Brugia pahangi* (P41962), *Acanthocheilonema viteae* (CAB46811), *Xenopus laevis* (P13926), oder *Onchocercus volvulus* (P24706) (Abb. 30). Die Übereinstimmungen zu diesen Proteinen liegen zwischen 61 und 78% (s. Anhang).

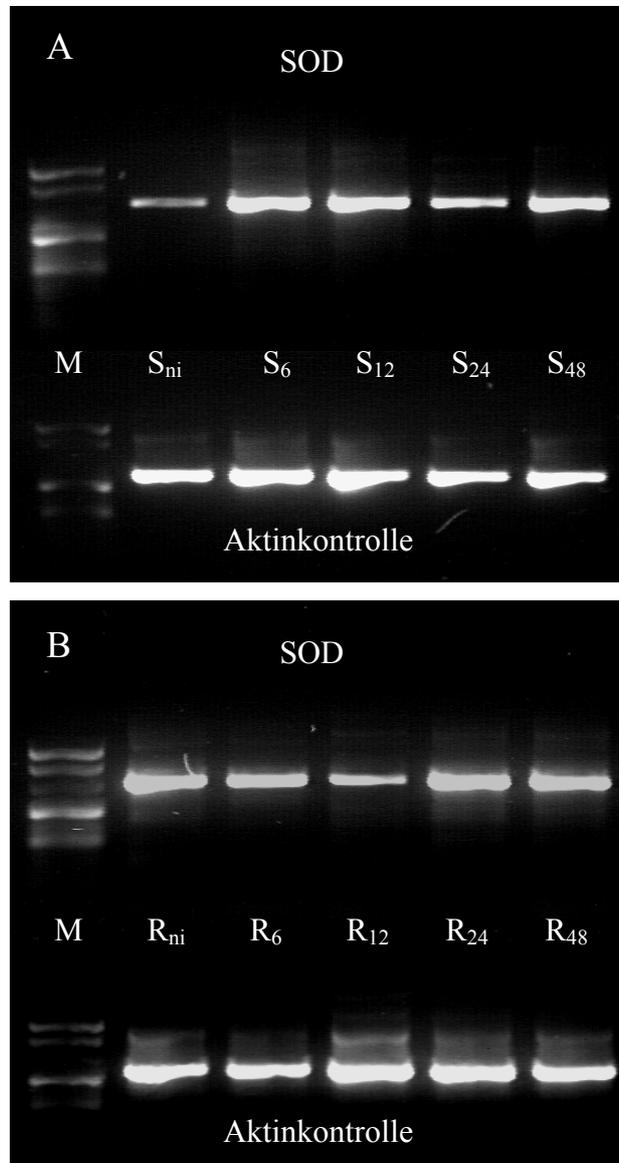
Sequenz 1:	<i>Acanthocheilonema viteae</i>	144 AS
Sequenz 2:	<i>Brugia pahangi</i>	158 AS
Sequenz 3:	<i>Onchocercus volvulus</i>	158 AS
Sequenz 4:	<i>Mus musculus</i>	153 AS
Sequenz 5:	<i>Xenopus laevis</i>	150 AS
Sequenz 6:	<i>Biomphalaria glabrata</i>	140 AS
Sequenz 7:	<i>Aplysia californica</i>	155 AS
Acantho	--MSTNAIAVLR---GNTVSGVIRFKQDKEGSPTIINGEIKGLTPGLHGFH <b>I</b> HQYGD <sup>65</sup> TTN	55
Brugia	--MSANRIAVLR---GDNVSGIIRFKQKEGSPTTISGEIKGLTPGLHGFH <b>V</b> HQYGD <sup>65</sup> TTN	55
Oncho	--MSTNAIAVLR---GDTVSGIIRFKQDKEGLPTT <sup>65</sup> VTGEVKGLTPGLHGFH <b>I</b> HQYGD <sup>65</sup> TTN	55
Mus	---AMKAVCVLK-GDGP-VQGTIHFEQKASGEPVVL <sup>65</sup> SGQITGLTEGQHGFH <b>V</b> HQYGD <sup>65</sup> N <sup>65</sup> TQ	55
Xenopus	----VKAVCVLA-GSGD-VKGVVRFEQDDGD-VTVEGKIEGLTDGNHGFH <b>I</b> HVFGD <sup>65</sup> N <sup>65</sup> TN	53
Biomphal	---M <b>V</b> KAVCVLSPGSAAGITGTITFTQETS <sup>65</sup> GDCTLVSGQVKGLAPGKHGFH <b>I</b> HQF <sup>65</sup> GDY <sup>65</sup> TN	57
Aplysia	---MVKAVCVLAAGSSTSITGTITFTQEGPADST <sup>65</sup> IVTGEVKGLAPGKHGFH <b>I</b> HQF <sup>65</sup> GDY <sup>65</sup> TN	57
	: :. ** . : * : * * . . : **: **: * ****: * : ** * :	
Acantho	GCISAGP <b>H</b> FNPHN <b>K</b> T <b>H</b> GGPTDEIR <b>H</b> V <b>G</b> DLGNIVAGADGTAHIDISDKQVQLLGPNSIIGR	115
Brugia	GCISAGP <b>H</b> FNPN <b>K</b> T <b>H</b> GGPTDEM <b>R</b> H <b>V</b> DLGNIVAGADGTAHIDISDKHVQLLGPNSIIGR	115
Oncho	GCISAGP <b>H</b> FNPN <b>K</b> T <b>H</b> GDRTDEIR <b>H</b> V <b>G</b> DLGNI <b>E</b> AGADGTAHISISDQHIQLLGPNSIIGR	115
Mus	GCTSAGP <b>H</b> FNPHS <b>K</b> K <b>H</b> GGPADEER <b>H</b> V <b>G</b> DLGNV <b>T</b> AGKDGVANVSI <b>E</b> DRVISLSGEHSIIGR	115
Xenopus	GCLSAGP <b>H</b> FN <b>P</b> Q <b>N</b> K <b>N</b> H <b>G</b> SPK <b>D</b> ADR <b>H</b> V <b>G</b> DLGN <b>V</b> T <b>A</b> -EGGVAQFKFTDPQISLKGERSIIGR	112
Biomphal	GCVSAG <b>A</b> <b>H</b> FN <b>P</b> K <b>N</b> K <b>S</b> <b>H</b> GGPLDQ <b>E</b> R <b>H</b> AGDLGNI <b>I</b> AGDDGTASIEFKD <b>S</b> H <b>I</b> PLIGENSIIGR	117
Aplysia	GCMSAG <b>G</b> <b>H</b> FN <b>P</b> L <b>G</b> A <b>T</b> <b>H</b> GGPDDA <b>V</b> R <b>H</b> AGDLGNI <b>I</b> AGDDGVAK <b>V</b> EIKDPQ <b>V</b> PLIGENSIVGR	117
	** ** ** * ** . . ** . * ** . * ** : * . * . * . . : * : * * . ** : **	
Acantho	SIVV <b>H</b> ADEDDL <b>G</b> K <b>G</b> V <b>G</b> D <b>K</b> K <b>N</b> ESLKTGNAG-----	144
Brugia	SLVV <b>H</b> ADQDDL <b>G</b> K <b>G</b> V <b>G</b> D <b>K</b> K <b>D</b> ESLKTGNAGARVACGIVAVSAAS	158
Oncho	SIVV <b>H</b> ADQDDL <b>G</b> K <b>G</b> V <b>G</b> A <b>K</b> K <b>D</b> ESLKTGNAGARVACGIVAIGAAS	158
Mus	TMVV <b>H</b> E <b>K</b> QDDL <b>G</b> K <b>G</b> ---NEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ--	153
Xenopus	TAVV <b>H</b> E <b>K</b> QDDL <b>G</b> K <b>G</b> ---DDESLKTGNAGGRLACGVIGFCP--	150
Biomphal	SIVV <b>H</b> E <b>K</b> EDDL <b>G</b> K <b>G</b> ---NDESLKTG-----	140
Aplysia	SLVV <b>H</b> E <b>K</b> EDDL <b>G</b> K <b>G</b> ---NEESLKTGNAGPRVACGVIGITK--	155
	: ** * . : * ** * . . : ** * **	

**Abbildung 31:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase aus verschiedenen Organismen. Methionin (M) = Translationsstartpunkt. Histidine (H) und Asparaginsäure (D) = Bindungsstellen für Kupfer- (gelb) bzw. Zinkatom (blau). Am Histidin 65 (rot) können beide Atome binden.

### SOD spezifische PCR mit infizierten *Biomphalaria glabrata*

Basierend auf der vorliegenden Nukleinsäuresequenz der SOD konnten neue Primer (SOD8f und SODf, s. 2.1.4) zur Durchführung einer weiteren OneStep RT-PCR synthetisiert werden. Mit diesen sollte die Expression der Superoxid-Dismutase in den Hämocyten von suszeptiblen und resistenten Biomphalarien während des Verlaufs der Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* bestimmt werden. Dabei wurden die Zeitpunkte 6, 12, 24 und 48 Stunden p.i. berücksichtigt. Als interne Kontrolle diente das Haushaltsgen Aktin, das eine

Fragmentgröße von 551 bp aufweist. Die PCR wurde wie unter 2.2.22 beschrieben durchgeführt.



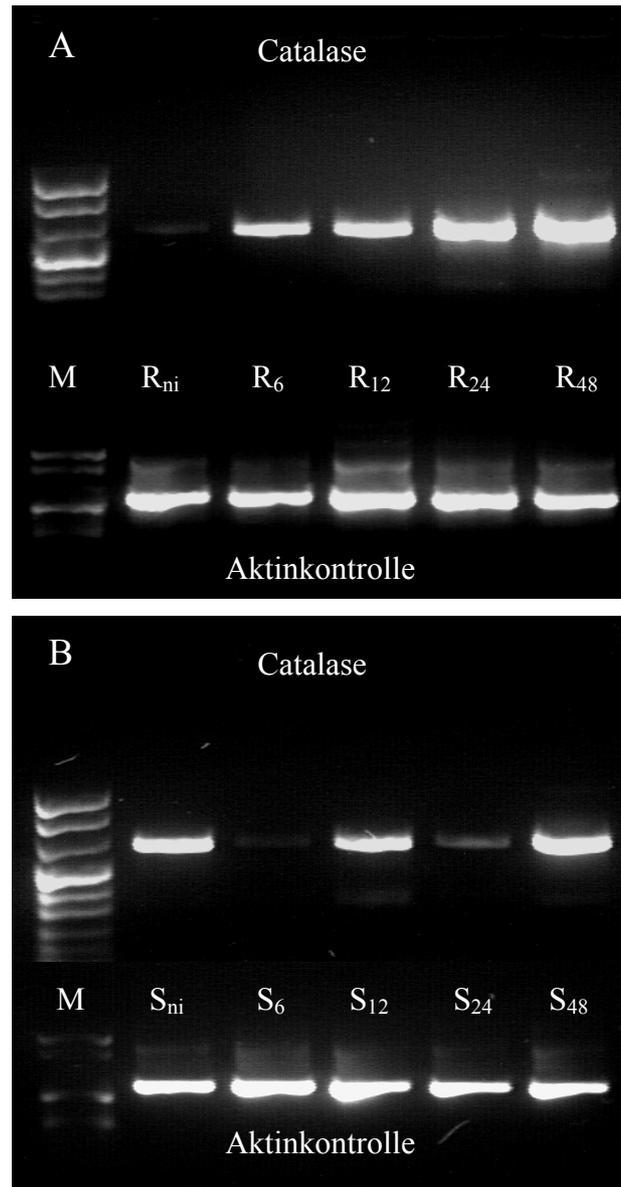
**Abbildung 32:** 1.5%-ige Agarosegele. Mit den Primern SOD8f und SODf amplifizierter DNA-Abschnitt der Superoxid-Dismutase (SOD) mit einer Größe von ca. 700 bp (rote Pfeile). (A): Infektionsverlauf bei suszeptiblen Biomphalarien (S<sub>ni</sub> - S<sub>48</sub>). (B): Infektionsverlauf bei resistenten Biomphalarien (R<sub>ni</sub> - R<sub>48</sub>). Aktin dient als interne Kontrolle. M = Molekulargewichtsmarker VIII (s. Abb. 6; 2.2.7).

Mit Hilfe der OneStep-RT-PCR und den Oligonukleotiden SOD8f und SODf konnte ein DNA-Abschnitt der Superoxid-Dismutase in den Hämocyten der infizierten Biomphalarien amplifiziert werden, was durch die anschließende Sequenzierung der DNA-Banden bestätigt wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass die SOD in den Abwehrzellen der suszeptiblen Biomphalarien nach der Infektion mit dem Parasiten hochreguliert wird. Bereits 6 h p.i. ist eine erhöhte Genexpression festzustellen, die während des gesamten Infektionsverlaufs bestehen bleibt (Abb. 32A). Im Gegensatz dazu zeigt sich die Expression der SOD in den Hämocyten der resistenten Biomphalarien nach der Infektion unverändert. Auch während des gesamten Zeitraums der Infektion ist darin keine Veränderung festzustellen (Abb. 32B). Deutlich zu erkennen ist allerdings der Unterschied der Stärke der SOD-Banden zwischen den beiden nichtinfizierten Schnecken-Phänotypen  $R_{ni}$  und  $S_{ni}$ . Das Amplifikat des Kontrollgens Aktin zeigte sowohl bei R als auch bei S zu jedem Infektionszeitpunkt in etwa dieselbe Stärke in seiner Expression (Abb. 32A/B).

### 3.9.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Mit Hilfe einer OneStep-RT-PCR und den degenerierten Oligonukleotiden CAT1r und CAT1f (s. 2.1.4) sollte die Expression der Catalase während des Verlaufs der Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* bestimmt werden. Dieses Enzym katalysiert den Abbau des Wasserstoffperoxids ( $H_2O_2$ ), dem bei der Immunabwehr eine entscheidende Rolle zukommt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus den Hämocyten der Schnecken zu den Zeitpunkten 6, 12, 24 und 48 Stunden p.i. extrahiert und in die PCR-Reaktion eingebracht. Das Haushaltsgen Aktin diente dabei als interne Kontrolle. Die OneStep-RT-PCR wurde wie unter 2.2.22 beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 33:** 1.5%-ige Agarosegele. Mit den Primern CAT1f und CAT1r amplifizierter DNA-Abschnitt der Catalase mit einer Größe von ca. 750 bp (Pfeile). (A): Infektionsverlauf bei resistenten Biomphalarien (R<sub>ni</sub> - R<sub>48</sub>). (B): Infektionsverlauf bei suszeptiblen Biomphalarien (S<sub>ni</sub> - S<sub>48</sub>). Aktin dient als interne Kontrolle. M = Molekulargewichtsmarker VIII (s. Abb. 6; 2.2.7).

Sowohl bei den resistenten als auch bei den suszeptiblen Biomphalarien konnte mit den genspezifischen Primern während der PCR ein DNA-Abschnitt der Catalase amplifiziert werden. Die bei den verschiedenen Infektionszeitpunkten auftretenden DNA-Banden wurden aus den Agarosegelen isoliert und analysiert. Aus den erhaltenen Sequenzen wurde eine Nukleinsäuresequenz editiert, die unter der Accession-Nummer CA820675 beim NCBI hinterlegt wurde. Übersetzt in die Aminosäuresequenz konnte ein inkompletter offener

Leserahmen (ORF) bzw. ein Sequenzabschnitt mit einer Länge von 89 AS bzw. 267 bp gefunden werden. Die Sequenzen sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Bei der Suche nach Homologien ergaben sich signifikante Übereinstimmungen zu Catalasen aus verschiedenen Organismen, wie *Bacteroides fragilis* (P45737), *Streptomyces coelicolor* (Q9RJK9), *Pseudomans aeruginosa* (O52762), *Vibrio fischeri* (O68146). Die Übereinstimmungen zu diesen Proteinen liegen zwischen 54 und 60% (s. Abb. 35 und Anhang).

```

1  attaatgcggaggggagcgggtgtggtgcaagttccacttcaagagcaagcagggaaac  60
1  I N A E G E R V W C K F H F K S K Q G I  20
61  aagaacttgacggatgaggagtctgccgcgcgattggcggggatcgtgagacgcataag  120
21  K N L T D E E S A A A I G G D R E T H K  40
121  cggncnttgtttaatgcgattgcacggggtgaatttcccaagtggcgcgtgtgcattcag  180
41  R X L F N A I A R G E F P K W R V C I Q  60
181  gtgatgacgcagaagcaagcgnagacggttccggtggaatccgtttgatctgaccaaggtg  240
61  V M T Q K Q A X T F R W N P F D L T K V  80
241  tggccgcacaaggaattccccgctgattgaagtgggggtagcaggaagcttgaatcgcaa  300
81  W P H K E F P A D - S G G S R K L E S Q  100
301  tcccagaagaaattatctttgcggaagngtgggaggcaaagcgggctttcgaanccgta  360
    S Q K K L S L R K X G R Q S G R F E X V
361  aggccactatggctggccgggnatcgggctgtttcgccc  400
    R P L W L A G X S G C F A

```

**Abbildung 34:** Nuklein- und Aminosäuresequenz der Catalase aus *Biomphalaria glabrata* mit einer Länge von 400 Basenpaaren. Der homologe Bereich der Sequenz hat eine Länge von 89 AS (grau unterlegt). Stopcodons sind als Striche gekennzeichnet, X steht für eine nicht bestimmbare Aminosäure.

Sequenz 1:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	482 AS
Sequenz 2:	<i>Vibrio fischeri</i>	482 AS
Sequenz 3:	<i>Streptomyces coelicolor</i>	487 AS
Sequenz 4:	<i>Bacteroides fragilis</i>	486 AS
Sequenz 5:	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	500 AS
Sequenz 6:	<i>Biomphalaria glabrata</i>	89 AS

Pseudo	----MEEKTRLTTAAGAPVVDNQNVTAGPRGPMLLQDVWFLEKLAHFDREVIPERRMHA	56
Vibrio	-----MSKKLTTAAGCPVAHNQNVQTAGKRGPLLQDVWFLEKLAHFDREVIPERRMHA	54
Strepto	--MPENNQKPLTTVAGAPVPDNQNSLTSGPRGPMLLQDVWFLEKLAHFDREVIPERRMHA	58
Bactero	-----MENKKLTAANGRPVADNQNQNSQTAGPRGPIMLQDPWLVLEKLAHFDREVIPERRMHA	55
Neisseria	MTTSKCPVTHLTMNNGAPVADNQNQNSLTAGTRGPLLTQDLWLNEKLADEFVREVIPERRMHA	60
Biomphal	-----	
Pseudo	KGSAAYGTFTVTHDITPYTRAKIFSQVGKKTDMFLRFSTVAGERGAADAERDIRGFMSRF	116
Vibrio	KGSGAYGTFTVTHDITKYTKAKLFSEIGKQTELFARFTTVAGERGAADAERDIRGFALKF	114
Strepto	KGSGAFGTFTVTHDITRYTSAKIFSEIGKKTPLFTRFSTVAGERGAADAERDIRGFVAVKF	118
Bactero	KGSGAYGTFTVTHDITKYTRAAIFSQVGKQTECFVRFSTVAGERGAADAERDIRGFAMKF	115
Neisseria	KGSGAFGTFTVTRDITKYTRAKIFSEVGGKTEMFGRLATVAGERG-ADAYTRVRGFALKF	119
Biomphal	-----	

Pseudo	YTEQGNWDLVGNNTPVFYLRDPLKFPDLNHVVKRDPRTNLRNATFKWDFFSHLPESLHQL	176
Vibrio	YTEEGNWDLVGNNTPVFFLRDPLKFPDLNHAVKRDPRTNMRSAKNNWDFWTSLEALHQV	174
Strepto	YTDEGNWDLVGNNTPVFFFRDPLKFPDLNHAVKRDPRTNLRNAENNWDFWTLPEALHQV	178
Bactero	YTEEGNWDLVGNNTPVFFLRDPLKFPDLNHAVKRDPRNNMRSANNWDFWTLLEALHQV	175
Neisseria	YTEEGNWDVVGNNTPVFYFYP-DLRKFPDLNKAVKR-SAHQYSSATNNWDFWALLPEALHQV	177
Biomphal	-----	
Pseudo	TIDFSDRGLPKSYRHIHGFGSHTFSFINANNERFWVKFHFKTQQGIENLTNAEAAEIVIAQ	236
Vibrio	TIVMSDRGIPATYRHHMHGFGSHTFSFINSDNERFWVKFHFKSQQGIKNLSDAEAAQVIGQ	234
Strepto	TIVMSDRGIPASYRHHMHGFGSHTYSLINAAGERFWVKFHHRTQQGIKNLTDAAEAEALVGK	238
Bactero	TITMSPRGIPASYRHHMHGFGSHTYSFLNAENKRIWVKFHLKTMQGIKNLTDQEAEEAIIAK	235
Neisseria	TIVMSDRGIPASYRHHMHGFGSHTYSLWNEAGERFWVKFHFQRSQQGIKNLTNEEAAKIAD	237
Biomphal	-----INAAGERVWCKFHFKSQGIKNLTDDEESAAAIGG	34
	* .:*. * *** :: ***:***: * : .:	
Pseudo	DRESSQRDLYESIEKGFDPRWKMYVQIMPEKEAATYRYNPFDLTKVWPHGDYPLIEVGGF	296
Vibrio	DRESHQRDLLESIDNQDFPKWTLKVIQIMPEADAATVPYNPFDLTKVWPHKDYPLIEVGEF	294
Strepto	DRESHQRDLFDAIEDGDFPKWKLFIQVMPEADAENYRFHPFDLTKVWSSKDYPLIEVGEW	298
Bactero	DRESHQRDLYESIERGDFPKWKFQIQMLTEEEADNYRINPFDLTKVWPHKDFPLQDVGIL	295
Neisseria	DRESHQRDLYEAIERGEFPPKWTMYIQVMPEADAAPYHPFDLTKVWPKDYPLIEVAEF	297
Biomphal	DRETHKRXLFNAIARGEFPKWRVCIQVMTQKQAXTFRWNPFDLTKVWPHKEFP-----	87
	***: :* * ::* :***: * . :*:*. : * . :*****: : :*	
Pseudo	ELNRNPDNYFAEVEQAAFTPANVVPGISFSPDKMLQGRLFSYGDAHRYRLGVNHHQIPVN	356
Vibrio	ELNRNPQNFFAEVEQSAFNPANVVPGISFSPDKMLQGRLFAYGDAQRYRLGVNHQHIPVN	354
Strepto	ELNRNPDNYFADVEQAAFSPANVVPGISFSPDRMLQGRLFSYGDAQRYRLGVNHHQIPVN	358
Bactero	ELNRNPDNYFAEVEQSAFNPMNIVEGIGFSPDKMLQGRLFSYGDAQRYRLGVNSEQIPVN	355
Neisseria	ELNRNPDNYFADVEQSAFAPSNLVPGISGASPDKMLQARLFNYADAQRYRLGVNFRQIPVN	357
Biomphal	-----AD-----	89
	*:	
Pseudo	AARCPHQVYHRDGGMRVDGNNNAHQRVTYEPNSFNQWQEQPDFSEPPLESLEGAADHWNHRV	416
Vibrio	APRCPVHSYHRDGMARVDG-NFGSTLGYEPNNEGQWAEQPDFAEAPALNLDGAAAHWDHRE	413
Strepto	APKNPVNSYHRDGMARVDG-NQGATPGVEPNSYGRWQEQPAYRDPQAVGAVADRFNYRE	417
Bactero	KPRCPFHAFHRDGMARVDG-NYGSAGYEPNSYGEWQDSPEKKEPPLKVHGDVFNYNERE	414
Neisseria	RPRCPVHSNQRDGGGRATE--LRQPAHYEPNSFGQWSQPDFAEPPKINGDAAHWDYRQ	415
Biomphal	-----	
Pseudo	DDD-YYSQPAALFHLFTDEQKQRLFANIAEDIRDVPEQIQRRQIGLFLKVDPAYGKGVAD	475
Vibrio	DED-YFSQPGDLFRLMTAEQQAILFDNTARNLNGVPKEIQLRHLRHICYKADPAYGEGIGK	472
Strepto	DDDNIFEQPGNLFQMSPEQQVLFENTARAIDGASAQTIERHIGNCTQADPAYGAGVRK	477
Bactero	YDDDYYSQPGDLFRLMPADEQQLLFENTARAMGDAELFIKQRHVRNICYKADPAYGTGVAQ	474
Neisseria	DDDDYFSQPRALFNLMNDAQKQALFDNTAAAMGDAPDFIKYRHIRNICYRCDPAYGEGGSK	475
Biomphal	-----	
Pseudo	ALGLKLD-----	482
Vibrio	LLDIDVSEFN-----	482
Strepto	AIEALAAGNL-----	487
Bactero	ALGIDLEEALKE-----	486
Neisseria	ALGLTVEEPQAARATDPALGQGGLL	500
Biomphal	-----	

**Abbildung 35:** Alignment der Aminosäuresequenzen der Catalase diverser Organismen. Histidin (H) und Aspargin (N) sind die aktiven Zentren des Proteins. Das Tyrosin (Y) stellt die Fe-Bindungsstelle dar.

In den Abwehrzellen der resistenten Schnecken konnte bereits 6 h nach der Infektion eine stark erhöhte Expression der Catalase nachgewiesen werden. Im weiteren Infektionsverlauf zeigte sich, dass die Enzym-Expression weiter zunimmt und dieser Zustand bis 48 Stunden p.i. bestehen bleibt (Abb. 33A). Dagegen ergab sich bei den suszeptiblen Biomphalarien, dass die Expression der Gene, die für die Catalase kodieren vor und während des Infektionsverlaufs in den Abwehrzellen der Schnecken unverändert hoch bleibt (Abb. 33B). Deutlich zu erkennen ist allerdings der Unterschied der Stärke der Catalase-Banden zwischen den beiden nichtinfizierten Schnecken-Phänotypen  $R_{ni}$  und  $S_{ni}$ . Während in der Probe der resistenten Biomphalarien ( $R_{ni}$ ) das Catalase-Gen nur sehr schwach exprimiert wird, ist in den Hämocyten der suszeptiblen Schnecken ( $S_{ni}$ ) dagegen eine sehr hohe Expression des Enzyms festzustellen. Das Amplifikat des Kontrollgens Aktin zeigte zu jedem Infektionszeitpunkt in etwa dieselbe Expressionsstärke (Abb. 33A/B).

## 4. DISKUSSION

### **4.1 Methodik**

Bei der Immunabwehr von Fremdkörpern und Parasiten in dem Mollusken *Biomphalaria glabrata* spielen, wie in allen Invertebraten, die Hämocyten eine entscheidende Rolle. Sowohl bei den Schistosomen-resistenten als auch bei den Schistosomen-suszeptiblen Zwischenwirtschnecken findet eine Fremderkennung durch die Abwehrzellen statt. Doch lediglich den Hämocyten des resistenten Phänotyps gelingt es, eine erfolgreiche Abwehrreaktion durchzuführen. Die eingedrungenen Parasiten werden eingekapselt und abgetötet. Bei den empfänglichen Biomphalarien findet dagegen keine Anlagerung der Hämocyten an die Schistosomen statt, so dass diese der Immunabwehr ihres Zwischenwirtes entgehen. In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen untersucht werden, ob generell genetische Unterschiede zwischen den Abwehrzellen der resistenten und der suszeptiblen Biomphalarien existieren. Des weiteren sollte gezeigt werden, ob und in welcher Art und Weise sich die Genexpression in den Hämocyten der beiden Schnecken-Phänotypen nach einer Infektion mit *Schistosoma mansoni* verändert, d.h., welche Faktoren dabei in Erscheinung treten bzw. welche Gene hoch- und welche herunterreguliert werden. Es sollten damit Unterschiede oder auch Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Schnecken-Phänotypen während einer Infektion aufgezeigt werden.

Mit biochemischen und immunologischen Methoden konnten bisher einige Moleküle beschrieben werden, die bei der Abwehr von Fremdkörpern oder Parasiten eine wichtige Rolle spielen, so zum Beispiel Lektine, Opsonine oder auch Agglutinine (Hertel et al. 1994, Zelck et al. 1995, Fryer et al. 1996). Es konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, dass diese mit der Resistenz oder der Empfänglichkeit der Biomphalarien korrelieren. Aus diesem Grund wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit speziell auf die Untersuchung der Hämocyten von *Biomphalaria glabrata* vor und nach einer Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* gelegt. Sämtliche Untersuchungen sollten mit molekularbiologischen Methoden durchgeführt werden.

Nach Mohamed (1998) und Bayne (pers. Mitteilung) sind in einem Mikroliter Hämolymphe des resistenten Phänotyps etwa 300 Hämocyten enthalten, wohingegen beim suszeptiblen Phänotyp nur ca. 200 Abwehrzellen enthalten sind. Da aus einer einzelnen Schnecke je nach

Größe lediglich zwischen 50 und 100 µl Hämolymphe gewonnen werden können, muss zur Untersuchung der unterschiedlichen Genexpression in diesen Zellen eine entsprechende Methode gewählt werden, die zum einen mit sehr wenig Ausgangsmaterial durchgeführt werden kann, und zum anderen dabei sehr sensitiv ist. Da beim Arbeiten mit genomischer DNA auch nicht kodierende Abschnitte, wie Introns oder repetetive Sequenzen, miteinander verglichen werden, ist es von Vorteil, wenn zur Untersuchung der differentiellen Genexpression lediglich die kodierenden Sequenzen, also die mRNAs der an der Abwehr beteiligten Hämocyten analysiert werden. Diese Voraussetzungen erfüllt die Methode des Differential Display (DD) nach Liang und Pardee (1992, 1995). Damit können die Expressionsmuster mehrerer Proben parallel miteinander verglichen und so gleichzeitig hoch- bzw. herunterregulierte Gene in den zu vergleichenden Zellen nachgewiesen werden.

Das Differential Display findet in vielen Forschungsbereichen wie auf den Gebieten der Genetik, der Immunologie, der Entwicklungsbiologie oder der Parasitologie Anwendung. So konnten damit bspw. bei *Drosophila melanogaster* einige Gene, die bei der Entwicklung der Insekten (Dubrovsky et al. 2000) oder bei der antibakteriellen Abwehr eine Rolle spielen, nachgewiesen werden (Asling et al. 1995). Bei *Aedes aegypti*, dem Zwischenwirt einiger Nematodenarten gelang der Nachweis verschiedener Defensin-Proteine (Gao et al. 1999) und bei dem Parasiten *Trypanosoma brucei rhodesiense* die Identifizierung eines serum resistance associated proteins (Milner et al. 1999). Bei der Honigbiene *Apis mellifera* konnte mit Hilfe der DD-Technologie eine unterschiedliche Genexpression zwischen Königin und Arbeitern während der Determinierung der Kasten festgestellt werden (Corona et al. 1999). Auch bei anderen sozialen Insekten, wie der Termitenart *Hodotermopsis japonica* wurde ein Gen (SOL1) identifiziert, welches eine große Rolle während der Differenzierung der Termiten-Soldaten spielt (Miura et al. 1999). Und mittels der DD-Methode konnten Parasiten-spezifische Genprodukte aus dem Leberstadium von *Plasmodium yoelii* identifiziert werden (Lau et al. 2000). Bei allen diesen Experimenten mit Invertebraten stand, wie bei den hier untersuchten Abwehrzellen aus *Biomphalaria glabrata*, nur sehr wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung.

Alternativ zur Differential Display-Technologie stehen einige weitere Methoden wie die Subtraktive Hybridisierung (Hara et al. 1991, Aasheim et al. 1994, Schneider 1998), die Representational Difference Analysis (RDA, Lisitsyn et al. 1993) oder auch die suppression PCR (Diatchenko et al. 1996) zur Verfügung. Seit einigen Jahren kommt verstärkt die

Microarray-Analyse (Dimopoulos et al. 2002) zum Einsatz. Diese Methode setzt allerdings voraus, dass bereits eine große Anzahl von Genen der zu untersuchenden Organismen charakterisiert und analysiert ist, was für *Biomphalaria glabrata* nicht zutrifft. Außerdem setzen sämtliche dieser Techniken zu ihrer Durchführung verhältnismäßig viel Ausgangsmaterial voraus. Meist werden zwischen ein bis fünf  $\mu\text{g}$  an poly(A)-RNA pro Reaktion benötigt, wohingegen für die Durchführung einer DD-PCR 20 ng an Gesamt-RNA ausreichend waren. Zudem können immer nur zwei Proben miteinander verglichen werden. Ein Vergleich der Expressionsmuster mehrerer Proben über einen längeren Zeitraum hinweg, wie der hier zu untersuchende Infektionsverlauf, ist damit nicht möglich.

Als nachteilig beim Arbeiten mit der DD-Methode erweist sich der Einsatz von Radionukliden (hier  $^{33}\text{P}$ ), der sehr kosten- und zeitintensiv ist und daneben gesundheitliche Risiken birgt. Alternativ dazu wurden die isolierten Nukleinsäuren mit Digoxigenin (DIG) gelabelt (Chen & Peck 1995). Dieser Versuch führte allerdings zu keiner scharfen Auftrennung der Banden im Polyacrylamid-Gel. Die einzelnen DNA-Fragmente waren nicht deutlich voneinander zu unterscheiden, weshalb die DIG-Markierung nicht weiter angewandt wurde. Eine Markierung der Nukleinsäuren mit  $^{33}\text{P}$  liefert dagegen sehr scharfe DNA-Banden im Gel und ist wesentlich sensitiver als das Digoxigenin oder andere Radionuklide, wie  $^{32}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$  (Trentmann et al. 1995). Der Faktor Zeit konnte durch den Einsatz eines Phosphorimagers wesentlich reduziert und die Gele bereits nach wenigen Stunden ausgewertet werden. Dennoch musste zum Isolieren der DNA-Banden aus dem Polyacrylamid-Gel ein Röntgenfilm aufgelegt werden.

Aus der Anwendung des Differential Display gehen viele Falschpositive hervor. Zu diesen kommt es, wenn eines der DNA-Fragmente der zu vergleichenden Proben unter der Nachweisgrenze der Autoradiografie liegt oder auch durch quantitative Unterschiede bei der Verwendung des Ausgangsmaterials. Deshalb war stets darauf zu achten, dass exakt dieselben Mengen der zu untersuchenden Proben in die Reaktionen eingesetzt wurden. Dies galt sowohl für die Reverse Transkription und für die DD-PCR, als auch für die Produktmenge, die anschließend auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurde. Falschpositive können gewöhnlich mit einem reverse Northern (Wadhwa et al. 1996, Dilks et al. 2003) bzw. einem virtual Northern (Franz et al. 1999, Hung et al. 1999) oder einem Northern-Blot (Thomas 1980) identifiziert werden. Die Durchführung eines Northern-Blots setzt allerdings sehr viel Ausgangsmaterial voraus (ein bis drei  $\mu\text{g}$ ) und durch unspezifisches Binden der

Hybridisierungssonden kann es bei diesen Methoden erneut zu falschpositiven Signalen kommen.

Da aus den Abwehrzellen der Biomphalarien nur sehr geringe Mengen an RNA isoliert werden können, muss auch zur Verifizierung der differentiell exprimierten DNA-Fragmente eine Methode gewählt werden, die mit sehr wenig Ausgangsmaterial auskommt. Als geeignet dafür erweist sich die Methode des SSCP (Single Strand Conformation Polymorphismus). Diese beruht auf der Konformation der DNA-Einzelstränge und deren Migrationsverhalten in einem speziellen Polyacrylamid-Gel (Mathieu-Daude et al. 1996a). Mit der SSCP-Methode, die normalerweise in der Krebsforschung und der Mutationsanalyse (Hayashi 1991) zum Einsatz kommt, kann der Austausch bzw. der Unterschied einer einzelnen Base in einer Nukleinsäure nachgewiesen, also eine Punktmutation festgestellt werden. Da in einem Differential Display-Gel mehrere DNA-Banden gleicher Größe übereinander liegen können, eignet sich die SSCP-Analyse dafür, diese Fragmente voneinander zu trennen. Auf diese Weise gelingt es, die falschpositiven DNA-Transkripte aus den DD-Gelen eindeutig nachzuweisen und zu identifizieren. Bei den hier durchgeführten Experimenten traf dies für insgesamt 39% der zunächst als differentiell identifizierten cDNAs zu. Eine solche Verifizierung lässt sich mit den oben genannten Methoden nicht durchführen und viele Falschpositive bleiben unentdeckt. Die Kombination der Methoden des Differential Display und des Single Strand Conformation Polymorphismus erwies sich damit für das Modellsystem *Biomphalaria-Schistosoma* als sehr erfolgreich und die Anzahl der Falschpositiven konnte erheblich reduziert werden (Schneider & Zelck 2001). Auch in anderen Forschungszweigen hat sich die Anwendung der SSCP zur Verifizierung differentiell exprimierter Transkripte bewährt (Vila-Ortiz et al. 2001, Rios et al. 2001, Lavery & Goyns 2002).

Mit der Durchführung von subtraktiven Klonierungen konnte ein neues Genprodukt aus der Mitteldarmdrüse von *Biomphalaria glabrata* identifiziert werden, welches beim resistenten Phänotyp signifikant stärker exprimiert wird als beim suszeptiblen. Dieses Protein konnte bisher allerdings nicht genauer charakterisiert werden (Miller et al. 1996). Die angewandte Methodik setzt sehr viel Ausgangsmaterial voraus und ist in ihrer Durchführung sehr zeitintensiv.

Raghavan und Mitarbeiter suchten mit Hilfe von vergleichenden Sequenzanalysen nach Unterschieden in der Genexpression in resistenten Biomphalarien (BS-90) vor und während der Infektion mit Miracidien von *Schistosoma mansoni*. Dazu wurde jeweils eine cDNA-Bibliothek konstruiert und daraus sehr viele Klone sequenziert. Die dabei am häufigsten analysierten Transkripte wiesen Homologien zu Reversen Transkriptasen (RT) auf, die allerdings in beiden Bibliotheken gleichermaßen auftraten. In der vorliegenden Arbeit konnten dagegen weder beim resistenten noch beim suszeptiblen Biomphalarien-Phänotyp Homologien zu diesen Enzymen gefunden werden. In einem funktionellen RT-Assay, zu dem sowohl Proteinextrakte aus Gewebeteilen des Kopf-Fuß-Bereichs als auch aus der hinteren (posterioren) Region beider Phänotypen verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass nach einer Parasiteninfektion die Aktivität dieser Enzyme in Gewebe der Kopf-Fuß-Region der resistenten Schnecke sehr stark ansteigt. Bei den empfänglichen Schnecken bleibt diese dagegen unverändert. Ob dieser Enzymaktivität bei der Abwehr bzw. beim Killing der Parasiten eine Bedeutung zukommt ist allerdings noch unklar (Raghavan et al. 2003). Mit dieser Methode können sehr viele neue Gensequenzen aus den Hämocyten von naiven und infizierten Hämocyten gewonnen werden. Der Nachweis, ob diese Gene hoch- bzw. herunterreguliert werden, kann über die Differential Display-Technik allerdings auf einfachere Weise erbracht werden.

Auch an *Biomphalaria glabrata* wurden bereits mehrere Studien mit der Methode des Differential Display durchgeführt. Lockyer und Mitarbeiter (2000) untersuchten damit, wie sich eine Infektion mit *Schistosoma mansoni* auf die Genexpression in verschiedenen Geweben (Ovotestis, Mantelgewebe und Nephridium) aus einem resistenten Schneckenstamm (1778, Belo Horizonte, Brasilien) auswirkt. Es konnte dabei ein Genabschnitt identifiziert werden, welcher während der Infektion herunterreguliert wird, und der eine signifikante Homologie zu der Cytochrom p450-Familie aufweist. Diese Proteine spielen beim Abbau

bzw. der Detoxifizierung von Giftstoffen und Fremdstoffen eine besondere Rolle. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der Expression dieser Proteinfamilie bei Infektionen und Entzündungen oder als Antwort auf Xenobiotika auftritt (Satarug et al. 1996, El-Kadi et al. 1997, Chang & Kam 1999). Außerdem wurden weitere Homologien zu Genen identifiziert, die für Serinproteasen und Transportproteine kodieren.

Eine Untersuchung an ganzen Geweben bzw. Organen scheint allerdings nicht spezifisch genug zu sein, um Aussagen über Unterschiede in der Genexpression der an der Abwehrreaktion maßgeblich beteiligten Hämocyten zu treffen. Da der für diese Versuche herangezogene Schneckenstamm 1778 lediglich zu 70% resistent gegenüber dem Parasiten ist, wäre es zudem interessant, wie sich eine Infektion auf die Cytochrom p450-Expression in anderen resistenten Schneckenstämmen auswirkt. Um letztendlich eine Aussage über Resistenz und Empfänglichkeit der Biomphalarien machen zu können, müssten die Untersuchungen schließlich auch auf den empfänglichen Biomphalarien-Phänotyp ausgedehnt werden.

Ebenfalls mit der Methode des Differential Display wurde die Genexpression in den Abwehrzellen eines hoch resistenten Biomphalarienstammes (BS-90) vor und nach einer *Schistosoma mansoni*-Infektion verglichen. Dabei konnten einige differentiell exprimierte Fragmente identifiziert werden, für die allerdings lediglich in 14% der Fälle Übereinstimmungen zu bekannten Sequenzen gefunden werden konnten. Diese Quote entspricht in etwa dem Resultat an gefundenen Sequenzhomologien in der vorliegenden Arbeit. Miller und Mitarbeiter konnten unter anderem eine Homologie zu einem Transposon aus *Escherichia coli* (Tn5) nachweisen. Welche Funktion dieses Gen hinsichtlich der Abwehr bzw. Resistenz besitzt bleibt allerdings offen und bedarf weiterer Nachforschungen (Miller et al. 2001). Außerdem wurde auch hier die Untersuchung suszeptibler Schneckenstämmen nicht verfolgt.

Sowohl in der Studie von Miller et al. als auch in der oben erwähnten von Lockyer und Mitarbeitern wurden zur Verifizierung der differentiell exprimierten Fragmente aus den DD-Gelen RT-PCRs durchgeführt. Damit lassen sich allerdings falschpositive DNA-Fragmente nur selten detektieren. Auch die Durchführung von Northern-Blots führte in beiden Studien aufgrund der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials nicht zum gewünschten Erfolg. Mit der Methode des SSCP stand im Gegensatz dazu in der vorliegenden Arbeit aus den oben erwähnten Gründen (s. 4.1) ein geeignetes Werkzeug zur Verifizierung differentiell exprimierter Gene zur Verfügung.

## 4.2 Genexpression in Hämocyten nichtinfizierter Biomphalarien ( $R_{ni}$ vs. $S_{ni}$ )

Die beiden in ihrer heutigen Form existierenden Schneckenstämme bildeten vor etwa 30 Jahren noch einen gemeinsamen Stamm. Sie wurden dann aufgrund der Merkmale Resistenz und Empfänglichkeit voneinander getrennt und regelmäßig selektiert. In den Differential Display-Gelen waren nur wenige Unterschiede zwischen den resistenten und den suszeptiblen Biomphalarien erkennbar, die Phänotypen zeigten sehr ähnliche Expressionsmuster. Es kann deshalb angenommen werden, dass die auftretenden Unterschiede im Expressionsmuster im Zusammenhang mit der Resistenz bzw. der Empfänglichkeit der Schnecken gegenüber dem Parasiten stehen. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, Unterschiede im Genom der beiden Biomphalarien-Phänotypen bezüglich dieser Merkmale nachzuweisen.

Im Vergleich der Expressionsprofile der Hämocyten aus nichtinfizierten resistenten ( $R_{ni}$ ) und suszeptiblen ( $S_{ni}$ ) Zwischenwirtschnecken konnten durch die Kombination der beiden Methoden des Differential Display und der SSCP-Analyse insgesamt 59 DNA-Fragmente identifiziert werden, die nur in jeweils einem der beiden Phänotypen auftraten, das heißt, die differentiell exprimiert wurden. Von diesen 59 DNA-Fragmenten konnten 31 dem resistenten und 28 dem suszeptiblen Schnecken-Phänotyp zugeordnet werden. Für 7 dieser Genabschnitte konnten in den verschiedenen Datenbanken Homologien zu bekannten Sequenzen ermittelt werden. Diese werden nachfolgend im einzelnen ausführlich diskutiert (s. 4.5).

Es wurden 7 weitere DNA-Transkripte analysiert, die nach der SSCP-Analyse zwar in beiden Schnecken-Phänotypen nachgewiesen werden konnten, die sich allerdings in der Stärke ihrer Genexpression deutlich voneinander unterschieden. Fünf dieser DNA-Fragmente stammten vom resistenten Phänotyp, während von den empfänglichen Schnecken zwei Fragmente analysiert wurden. DNA-Transkripte mit unterschiedlicher Stärke in der Genregulation sind in den Differential Display-Gelen mehrfach aufgetreten. Es konnten für diese Genabschnitte keine Homologien zu bereits bekannten Sequenzen gefunden werden, so dass zur Zeit keine Aussage über deren Funktion gemacht werden kann. Die Frage, weshalb die Transkripte in den Abwehrzellen des einen Phänotyps stärker exprimiert werden als im anderen, und ob es sich dabei um Genprodukte handelt, die mit der Resistenz bzw. der Suszeptibilität der Biomphalarien gegenüber dem Parasiten *Schistosoma mansoni* korrelieren, bleibt daher zunächst unbeantwortet.

### 4.3 Genexpression in Hämocyten infizierter Biomphalarien ( $S_{inf}$ und $R_{inf}$ )

Mit der Untersuchung der Genexpression von Hämocyten aus naiven und infizierten Biomphalarien sollte gezeigt werden, welche Gene nach und während des Verlaufs einer Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* hoch- bzw. herunterreguliert werden. Gleichzeitig sollten Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen dem R- und S-Schnecken-Phänotyp dokumentiert werden.

#### 4.3.1 Suszeptible *Biomphalaria glabrata* ( $S_{ni}$ vs. $S_{inf}$ )

Bei dieser Versuchsanordnung wurden neben den nichtinfizierten Biomphalarien Hämocyten-Proben aus vier verschiedenen Infektionszeitpunkten (6, 12, 24 und 48 h p.i.) untersucht. Nach der DD- und der SSCP-Analyse wurden 23 DNA-Abschnitte isoliert und analysiert, wobei für 7 eine differentielle Genexpression nachweisbar war. Bei den anderen 16 untersuchten Fragmenten handelt es sich um Transkripte, die sowohl in den Hämocyten der nichtinfizierten als auch in denen der infizierten Biomphalarien exprimiert werden. Diese zeigen während der Parasiteninfektion Unterschiede in der Stärke ihrer Genregulation. Insgesamt erbrachte die Untersuchung der Genexpression der infizierten empfänglichen Biomphalarien, dass 14 DNA-Fragmente hoch- und 9 Transkripte herunterreguliert wurden. Die Expressionsprofile dieser Genabschnitte sind in der Tabelle 7 veranschaulicht.

Aufgrund der ausbleibenden Abwehrreaktion gegenüber dem Parasiten wäre zu erwarten, dass sich die Genexpression in den Hämocyten der empfänglichen Biomphalarien während einer Infektion nicht wesentlich verändert. Werden die Abwehrzellen von den Sporocysten beeinflusst bzw. in ihrer Genregulation moduliert, wie es die Interferenz-Theorie postuliert (Lie 1982), müsste sogar eher damit gerechnet werden, dass diese gedrosselt wird. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt allerdings ein anderes Bild, die Expression der Gene wird hochreguliert. Es wäre durchaus denkbar, dass unter dem Einfluss bestimmter Faktoren auf die Genregulation der Hämocyten, Gene exprimiert werden, welche die Abwehrreaktion behindern bzw. unterdrücken und somit als "Inhibitoren" fungieren. Da aber auch im suszeptiblen Phänotyp eine Fremderkennung stattfindet, könnten die hier gefundenen hochregulierten DNA-Fragmente auch in diesen Prozess involviert sein. Sequenzhomologien, die das bestätigen, wurden allerdings nicht gefunden.

**Tabelle 7:** Verlauf der Expressionsmuster der Hämocyten-Proben aus dem Vergleich der nichtinfizierten und infizierten suszeptiblen *Biomphalaria glabrata*. Dargestellt ist die Genregulation in den naiven Schnecken, sowie die 6, 12, 24 und 48 Stunden p.i..

Expressionsmuster $S_{inf}$ 0/6/12/24/48	Anzahl der DNA-Fragmente
H/L/L/L/L	6
H/H/L/L/L	3
L/H/H/H/H	14

L = Low (geringe Genexpression, herunterreguliert), H = High (hohe Genexpression, hochreguliert)

#### 4.3.2 Resistente *Biomphalaria glabrata* ( $R_{ni}$ vs. $R_{inf}$ )

Neben nichtinfizierten Biomphalarien wurden Proben aus sechs verschiedenen Infektionszeitpunkten (6, 12, 18, 24, 36 und 48 h p.i.) untersucht. Dabei zeigte sich, dass nach und während des Verlaufs der Infektion bei den resistenten Biomphalarien deutliche Unterschiede im Expressionsmuster der verschiedenen Hämocyten-Proben aufgetreten sind. Mit Hilfe der SSCP-Analyse wurde für 21 der 23 DNA-Fragmente eine differentielle Genexpression nachgewiesen. Lediglich bei 2 DNA-Fragmenten zeigte sich nach der Infektion mit *Schistosoma mansoni* ein Unterschied in der Stärke der Genregulation. Dabei wurde ein DNA-Transkript hochreguliert (#14.1, 12 h p.i.), während das andere im Verlauf der Infektion herunterreguliert wurde (#21.1, 6 h p.i.). Während des Infektionsverlaufs konnte beim resistenten Schneckenstamm beobachtet werden, dass von den 23 untersuchten DNA-Fragmenten insgesamt 18 Transkripte herunter- und nur 5 hochreguliert wurden. Die verschiedenen Expressionsprofile der analysierten Genabschnitte sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Bei einer Infektion mit Bakterien oder Parasiten setzt die Abwehrreaktion in Mollusken schon nach wenigen Stunden ein. Die Hämocyten werden aktiviert, und beginnen den eingedrungenen Fremdkörper einzukapseln und anschließend zu eliminieren (Adema et al. 1994, Hahn et al. 2001a/b). Erwartungsgemäß müsste die Genregulation in diesen Zellen hochgefahren werden, um die für die Abwehr benötigten Produkte bereitstellen zu können. Es müsste somit zu einer erhöhten Genexpression in den Hämocyten der Biomphalarien während einer Parasiteninfektion kommen. Das vorliegende Ergebnis deckt sich allerdings nicht mit dieser Annahme. Ein Grund dafür könnte sein, dass mit den hier verwendeten

Primerkombinationen vor allem Stoffwechselprodukte detektiert wurden, die während der Infektion zu Gunsten der immunologischen Abwehr heruntergefahren werden. Homologien dazu konnten allerdings nicht gefunden werden. Lediglich für zwei Fragmente ergaben sich Sequenzhomologien zu Produkten von abwehrrelevanten Genen, deren Expression während der Infektion herunterreguliert wurde. Möglicherweise kann auch die Genregulation in resistenten Schnecken von den Schistosomen moduliert werden, allerdings nicht in ausreichendem Maße, um die Abwehrreaktion vollständig zu unterdrücken.

**Tabelle 8:** Verlauf der Expressionsmuster der Hämocyten-Proben aus dem Vergleich der nichtinfizierten und infizierten resistenten *Biomphalaria glabrata*. Dargestellt ist die Genregulation in den naiven Schnecken, sowie die 6, 12, 18, 24, 36 und 48 Stunden p.i..

Expressionsmuster R <sub>inf</sub> 0/6/12/18/24/36/48	Anzahl der DNA-Fragmente
H/L/L/L/L/L/L	12
H/L/L/L/L/L/H	2
H/H/H/H/H/L/L	4
L/H/H/H/H/H/H	4
L/L/H/H/H/H/H	1

L = Low (geringe Genexpression, herunterreguliert), H = High (hohe Genexpression, hochreguliert)

#### 4.3.3 Unterschiede und Gemeinsamkeiten

Im allgemeinen konnte beobachtet werden, dass schon sechs Stunden nach der Infektion von *Biomphalaria glabrata* mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* Unterschiede im Expressionsmuster der Hämocyten-Proben aufgetreten sind. Dies trifft gleichermaßen sowohl beim resistenten als auch beim empfänglichen Schnecken-Phänotyp für insgesamt 38 DNA-Fragmente zu. Dies dokumentiert eine sehr schnelle Reaktion der Abwehrzellen auf den eingedrungenen Fremdkörper und lässt vermuten, dass es sich dabei um Gene handelt, deren Produkte in den Prozess der Fremderkennung und der Adhäsion involviert sind. Schon kurz nach einer Parasiteninfektion findet sowohl in den resistenten als auch in den empfänglichen Schnecken die Fremderkennung statt. Ein bis zwei Stunden p.i. lagern sich die Hämocyten an die Sporocysten an und bilden eine mehrschichtige Kapsel aus, wobei dies bei den suszeptiblen Biomphalarien nur *in vitro* erfolgt (Pan 1965, Hahn et al. 2001a).

In acht Fällen wurde eine Veränderung der Genexpression zu einem späteren Zeitpunkt festgestellt, wobei dies bei vier Fragmenten lediglich um sechs Stunden verzögert stattfindet. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion ist der Vorgang der Fremderkennung bereits abgeschlossen und die Abwehrreaktion in vollem Gange. Die Genregulation von vier weiteren Transkripten, die alle im resistenten Phänotyp exprimiert werden, wird 36 h nach der Infektion heruntergefahren. Auch dies könnte ein Hinweis auf eine Funktion dieser Genabschnitte im Abwehrmechanismus der Hämocyten sein. Hahn und Mitarbeiter konnten zeigen, dass 47 Stunden nach einer Schistosomeninfektion bereits über 80% der eingekapselten Sporocysten in resistenten Biomphalarien abgetötet sind und die Abwehrreaktion somit größtenteils abgeschlossen ist (Hahn et al. 2001a).

Anhand der Differential Display-Gele war zu erkennen, dass sich die beiden Biomphalarien-Phänotypen R und S genetisch sehr ähnlich sind. Die Unterschiede in den Expressionsmustern waren sehr gering. Es wäre deshalb zu erwarten gewesen, dass einige der DNA-Fragmente aus dem Vergleich der Genexpression der nichtinfizierten R- und S-Schnecken ( $R_{ni}$  vs.  $S_{ni}$ ) auch bei den Versuchsdurchführungen mit den infizierten Biomphalarien detektiert werden. Dies traf allerdings lediglich für ein DNA-Transkript zu. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass mit der Methode des DD immer nur relativ kurze Sequenzabschnitte analysiert werden können. Fragmente mit einer Größe von über 600 bis 700 bp werden in den Gelen nicht mehr scharf voneinander aufgetrennt. Möglicherweise sind einige der analysierten Genabschnitte aber doch auf ein und dieselbe mRNA zurückzuführen. Um diese Frage beantworten zu können, müssten allerdings mehr Sequenzinformationen über den untersuchten Organismus vorliegen. Dadurch würde es zu mehr Sequenzüberschneidungen der einzelnen Fragmente kommen, und es könnte dann gelingen, die hier gefundenen ESTs zu verlängern und zu vervollständigen. Somit wäre es zudem möglich, mehr über die Funktion dieser Genabschnitte bzw. deren Produkte zu erfahren.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei den resistenten Biomphalarien während der Infektion sehr viele qualitative Unterschiede in der Genexpression der Abwehrzellen aufgetreten sind, also eine differentielle Genexpression festgestellt werden konnte. Im suszeptiblen Schneckenstamm konnten dagegen mehr quantitative Unterschiede beobachtet werden. Ferner zeigte sich, dass unter einer Parasiteninfektion in den Hämocyten der

resistenten *Biomphalaria* mehr Genabschnitte herunterreguliert wurden und die Genregulation bei den empfänglichen Schnecken dagegen eher hochgefahren wurde.

#### 4.4 Homologiesuche

Die Suche nach Homologien in den verschiedenen Datenbanken führte bei den meisten analysierten DNA- und Aminosäuresequenzen zu keinen signifikanten Übereinstimmungen zu bereits bekannten Sequenzen von Genen oder Proteinen. Somit handelt es sich beim größten Teil der Fragmente um noch nicht identifizierte Transkripte aus dem Genom von *Biomphalaria glabrata*. Die Nukleotidsequenzen dieser Genabschnitte konnten deshalb als ESTs in die Datenbank des NCBI eingegeben werden.

Probleme bei der Suche nach Homologien ergeben sich vor allem daraus, dass zu wenig bekannte Sequenzen (Gene und Proteine) von *Biomphalaria glabrata* oder von verwandten Arten in den Datenbanken vorliegen. Es sind lediglich 1709 Nukleotid- (davon 1452 als ESTs) und 93 Proteinsequenzen in den Genbanken des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>) registriert, während im Vergleich dazu von *Homo sapiens* dort über 5 Mio. ESTs zu finden sind (Stand: 25. 07. 2003). Um mehr Informationen über Gensequenzen zu erhalten bzw. Gene identifizieren zu können, ist es dringend notwendig, diese Datenbanken zu erweitern. Aus diesem Grund werden neue Genomprojekte angestrebt, wie bspw. die Konstruktion einer BAC-Library (am Arizona Genomics Institute gefördert durch das National Institute of Health, NIH) oder ein EST-Projekt mit *Biomphalaria glabrata* (Catherine Jones et al., University of Aberdeen).

EST-Daten werden vor allem dazu verwendet, um unbekannte Gene zu identifizieren, physikalische Karten zu konstruieren, oder genomische Sequenzen zu klassifizieren (Marra et al. 1998). So konnte bspw. mit Hilfe von ESTs eine katalytische Untereinheit der humanen Telomerase identifiziert werden (Nakamura et al. 1998). Medzhitov und Mitarbeitern (1997) gelang es, durch EST-Sequenzen ein in seiner Funktion dem TOLL Protein aus *Drosophila melanogaster* homologes Protein im Menschen zu charakterisieren.

## 4.5 Homologien

Insgesamt konnten für 14 von den insgesamt 112 untersuchten DNA-Fragmenten signifikante Homologien zu Nukleotid- und Aminosäuresequenzen in den verschiedenen Datenbanken festgestellt werden. Im folgenden soll darauf eingegangen und die Funktion der Proteine, für die diese Genabschnitte kodieren erläutert werden.

Ribosomale RNA wird bei der Methode des Differential Display sehr häufig mitisoliert und amplifiziert, was darauf zurückzuführen ist, dass aus den Hämocyten der Zwischenwirtschnecken die Gesamt-RNA extrahiert wird, und als Ausgangsmaterial für die Durchführung der Experimente dient. Diese beinhaltet neben der transfer und der messenger RNA auch die ribosomale RNA. Obwohl bei der Reversen Transkription ein Ankerprimer mit einem Thymidin-Schwanz (T<sub>11</sub>), der an das 3'-Ende der polyadenylierten mRNA binden soll, verwendet wird, kommt es dabei auch häufig zu einer Bindung an die ribosomale RNA, die dann in der anschließenden PCR amplifiziert und auf den DD-Gelen detektiert wird.

Eine Probe aus dem Vergleich der Genexpression von infizierten suszeptiblen Biomphalarien zeigt Übereinstimmungen zu dem 60S Ribosomalen Protein L23 (RPL23) aus verschiedenen Organismen, wie *Anopheles gambiae* (EAA11004), *Drosophila melanogaster* (Q9W08) oder *Homo sapiens* (P29316). Dieser Genabschnitt wurde zwölf Stunden nach der Parasiteninfektion herunterreguliert. RPL23 ist an der großen Untereinheit der Ribosomen lokalisiert und ermöglicht den Chaperonen die Bindung an den neu entstehenden Polypeptidketten. Es ist damit indirekt am Kontrollprozess der Faltung von Proteinen beteiligt. Kramer und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass durch eine Mutation an RPL23 in *Escherichia coli* die Interaktion zwischen dem Trigger-Faktor (Chaperon) und der wachsenden Polypeptidkette verhindert wird. Durch die fehlende Funktion des Reparaturmechanismus der Chaperone kommt es dabei zur Bildung von Proteinaggregaten und letztlich zum Absterben der Zellen (Kramer et al. 2002). Denkbar wäre auch hier eine Modulation dieses Gens durch Faktoren, die von den Sporocysten ausgehen und diese so vor einer Abwehrreaktion durch die Hämocyten schützen.

Ein Fragment, das sowohl in den Hämocyten der resistenten als auch in denen des suszeptiblen Schnecken-Phänotyps nachzuweisen ist, weist Homologien zum Elongationsfaktor 1-beta' aus *Bombyx mori* (P29522) und *Drosophila melanogaster*

(O96827) auf. Interessant ist, dass dieses Gen während der Parasiteninfektion bei den resistenten Schnecken herunter- und bei den empfänglichen hochreguliert wird. Es handelt sich dabei um ein Nukleotid-bindendes Protein, welches während der Translation die Bindung der Aminoacyl-tRNAs an die große Untereinheit der Ribosomen vermittelt, und somit wesentlich für die korrekte Elongation der Polypeptidketten verantwortlich ist. Die Ergebnisse einiger Mutationsversuche lassen darauf schließen, dass der Elongationsfaktor 1 auch mit den Vorgängen beim Alterungsprozess von Zellen sowie mit denen der Apoptose in Verbindung steht (Silar et al. 1994, Duttaroy et al. 1998). Auch der Oxidative Burst führt bei phagozytierenden Zellen wie den Hämocyten oder den Neutrophilen/Makrophagen aufgrund der Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROS) zu einer gesteigerten Apoptose (Zhang et al. 2003, Dat et al. 2003).

Homologien zu einer Sequenz aus *Biomphalaria glabrata* (AAN85870), sowie aus *Xenopus laevis* (Q9PUM9) und *Homo sapiens* (Q9UBB5) ergeben sich für einen DNA-Abschnitt aus den Hämocyten-Proben empfänglicher Zwischenwirtschnecken. Dabei handelt es sich um das Methyl-CpG-bindende Protein, welches bei Methylierungsprozessen eine wichtige Rolle spielt. Die Transkription in Zellen kann durch eine Methylierung der DNA inhibiert werden (Nan et al. 1997, Kaludov & Wolffe 2000). Dieser Vorgang verläuft über ein Methyl-CpG-bindendes Protein (Boyes & Bird 1991, Fujita et al. 1999). Durch diesen Prozess werden Gene inaktiviert und nicht in ihre Produkte umgeschrieben, man spricht auch vom "Gene silencing".

Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis darauf, wie Schistosomen die Genregulation in den Abwehrzellen der Biomphalarien beeinflussen können. Möglicherweise besitzen diese die Fähigkeit, einen solchen Methylierungsprozess zu induzieren und so die Transkription von Genen zu unterdrücken. Dieses "Gene silencing" würde den Parasiten einen erheblichen Vorteil hinsichtlich ihrer weiteren Entwicklung im Zwischenwirt verschaffen.

#### 4.5.1 Cluster 1: Stoffwechselmetabolite

Eine signifikante Übereinstimmung eines DNA-Fragments aus den resistenten Biomphalarien bezieht sich auf die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase. Es wird bei dieser zwischen einer cytosolischen (cGPDH, EC 1.1.1.8) und einer mitochondrialen Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (mGPDH, EC 1.1.99.5) unterschieden, ein Enzym, welches im Glukose- und

Energiestoffwechsel vieler Organismen wie bspw. auch bei *Drosophila melanogaster* (Q9GS33), *Ceratitidis capitata* (O02625), *Apis mellifera* (O61368) und *Locusta migratoria* (O96558) eine sehr wichtige Rolle spielt. Mit Hilfe der GPDH wird NADH zum NAD<sup>+</sup> oxidiert und anschließend über den Glycerolphosphat-Shuttle der Atmungskette in den Mitochondrien zugeführt.

Der Vergleich der Proteinsequenzen ergab für eine Probe aus den Abwehrzellen der empfänglichen Schnecken eine signifikante Homologie zu dem Enzym Acetat-Kinase (AK, EC 2.7.2.1), welches im Energiestoffwechsel verschiedener Bakterienarten, wie bei *Thermotoga maritima* (Q9WYB1) oder *Clostridium perfringens* (Q8XJN2) von Bedeutung ist. Das Enzym katalysiert die Dephosphorylierung von Acetylphosphat und ist somit verantwortlich für die Produktion von Acetat und ATP.

Es wäre durchaus denkbar, dass es sich dabei um Bakterien handelt, die symbiontisch in den Zwischenwirtschnecken vorkommen. Hertel und Mitarbeiter (2002) stießen bei ihren Untersuchungen über die Resistenz bei verschiedenen Biomphalarienarten auf einen eukaryontischen Symbionten, *Capsaspora owczarzaki*, welcher in der Hämolymphe der Schnecken vorkommt. Dabei fiel auf, dass dieser signifikant häufiger in resistenten Schneckenstämmen als im suszeptiblen Phänotyp (M-line) nachzuweisen ist und die Fähigkeit besitzt, Trematodenlarven abzutöten. Ob diesem Organismus aber eine Rolle bei den Resistenzmechanismen der Biomphalarien gegenüber *Schistosoma mansoni* zukommt bleibt noch zu untersuchen.

#### 4.5.2 Cluster 2: Abwehrrelevante Gene

Die Suche nach Homologien erbrachte für eine Probe aus den infizierten resistenten Zwischenwirtschnecken (R<sub>inf</sub>) signifikante Übereinstimmungen zum 60S Ribosomalen Protein L29 (RPL29) verschiedener Organismen (*Ictalurus punctatus*, Q90YT8 und *Mus musculus*, AAH02062). RPL29 weist gleichzeitig eine sehr große Ähnlichkeit zu einem Heparin/Heparan-Sulfat bindenden Oberflächenmolekül auf humanen Epithelzellen auf (Liu et al. 1996, Law et al. 1996). Das Expressionsprofil dieses Proteins zeigt bis 24 Stunden nach der Infektion mit dem Parasiten eine erhöhte Genregulation und wird dann, 36 Stunden p.i. wieder herunterreguliert. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein Adhäsionsmolekül auf der Oberfläche der Hämocyten von resistenten Biomphalarien, welches den Kontakt zwischen

diesen und dem abzuwehrenden Fremdkörper vermittelt. Die Tatsache, dass dieses Transkript aus den Proben der resistenten Biomphalarien isoliert werden konnte, und dass es zudem über einen sehr langen Zeitraum der Infektion hochreguliert ist, stützt diese Vermutung.

Eine weitere Homologie zu Proteinen, die in den Abwehrprozess involviert sein könnten, wurde für einen Genabschnitt aus den Hämocyten der infizierten suszeptiblen Biomphalarien ( $S_{inf}$ ) nachgewiesen. Dabei handelt es sich um das Protein c20orf178 aus *Homo sapiens* (Q9H444) und *Mus musculus* (Q9D8B3), ein Abschnitt des SNF7-Gens, einem Vacuolar Protein Sorting (VPS)-Gen der Klasse E (Odorizzi et al. 2003). Diese sind Teil eines Proteinkomplexes, der an Endosomen gekoppelt ist und wichtige Funktionen bei der Sortierung von Proteinen und deren Transport vom Endosom zu den Vakuolen bzw. zu den Lysosomen übernimmt (Kranz et al. 2001, Babst et al. 2002).

Dieses Gen wird bereits wenige Stunden nach der Infektion mit *Schistosoma mansoni* in den Abwehrzellen hochreguliert. Dass es sich dabei um ein Fragment aus den empfänglichen Biomphalarien handelt, zeigt, dass auch in diesem Phänotyp ein gut ausgebildetes und funktionierendes Abwehrsystem in Form der Phagocytosefähigkeit angelegt ist. Die Sporocysten der Schistosomen sind für eine Phagocytose durch die Hämocyten der Biomphalarien allerdings zu groß und müssen erst eingekapselt und lysiert werden. Diesen Vorgang können die Schistosomen in den empfänglichen Schnecken aber anscheinend umgehen bzw. unterdrücken.

Signifikante Homologien zu weiteren abwehrelevanten Genen aus *Biomphalaria glabrata* ergaben sich für mehrere DNA-Transkripte. Diese Genabschnitte kodieren für die Familie der Fibrinogen-verwandten Proteine (FREPs, AY028462), Hämolymp- Proteine der Biomphalarien, die zur Superfamilie der Immunglobuline (IgSF) gezählt werden und von denen bereits 13 Unterfamilien identifiziert werden konnten (Leonard et al. 2001, Zhang et al. 2001, Zhang & Loker 2003). FREPs binden und präzipitieren Parasitenantigene, sind also in den Prozess der Fremderkennung und der Adhäsion eingebunden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass deren Konzentration sowohl nach einer Infektion mit dem Trematoden *Echinostoma paraensei* als auch nach einer Bakterienexposition ansteigt (Adema et al. 1997 und 1999, Hertel et al. 1994). Die Übereinstimmungen zu diesen Proteinen wurden sowohl zu einem DNA-Fragment aus den infizierten suszeptiblen Biomphalarien ( $S_{inf}$ ) als auch zu einem Transkript aus den infizierten resistenten Schnecken ( $R_{inf}$ ) ermittelt. Beide Genabschnitte werden während der Infektion mit *Schistosoma mansoni* herunterreguliert. Dies ist bereits

sechs Stunden p.i. zu beobachten und hält während des gesamten weiteren Infektionsverlaufs an. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen, die in den oben erwähnten Studien nach einer Parasiten- bzw. Bakterieninfektion gemacht wurden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass diese Untersuchungen mit einem anderen Parasiten, nämlich mit *Echinostoma paraensei* durchgeführt wurden. *Schistosoma mansoni* scheint es dagegen zu gelingen, die Expression dieser für die Abwehr relevanten FREP-Gene zu beeinflussen und diese herunter zu regulieren.

Zur Abwehr von Fremdkörpern und Parasiten werden in den Abwehrzellen der befallenen Organismen reaktive Sauerstoffmetabolite gebildet (Bayne et al. 2001, Hahn et al. 2001a/b). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die am Auf- und Abbau des hochtoxischen Wasserstoffperoxids ( $H_2O_2$ ) beteiligten Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Catalase (CAT) in den Hämocyten von *Biomphalaria glabrata* nachzuweisen, und deren Expressionsprofile während einer Infektion mit *Schistosoma mansoni* darzustellen. Da mit der Methode des Differential Display immer nur ein breites Spektrum an verschiedenen mRNAs amplifiziert und detektiert werden kann, ist es damit nicht möglich, gezielt nach bestimmten Genen zu suchen. Aus diesem Grund wurde eine genspezifische OneStep RT-PCR mit den entsprechenden Primern, die anhand bekannter SOD- und Catalase-Sequenzen aus verschiedenen Organismen generiert wurden, durchgeführt.

### **Superoxid-Dismutase (EC 1.15.1.1)**

Das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert die Reduktion des Superoxids ( $O_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und ist durch die Bildung dieses hochtoxischen Sauerstoffmetabolits ein wichtiger Bestandteil in der oxidativen Abwehr von Pathogenen. Charakteristisch für die SOD ist ein Metallatom im aktiven Zentrum, anhand dessen die verschiedenen Enzyme unterschieden werden. Die Mangan-SOD (Mn-SOD) kommt ausschließlich in Mitochondrien vor, während die Kupfer/Zink-SOD (Cu/Zn-SOD) im Cytosol von Phagocyten/Hämocyten für die Detoxifizierung des zellschädigenden Superoxids sorgt. Dieses besitzt das Potential, Zellmembranen und Proteine zu schädigen und Nukleinsäuren zu degradieren und wird deshalb hinsichtlich des Alterungsprozesses und einiger schwerer Krankheiten verantwortlich gemacht (James 1994, Fridovich 1997, McCord 2002). Außerdem existiert in Prokaryonten eine eisenhaltige Fe-SOD.

Die Untersuchung der Expression der Cu/Zn-SOD in den Hämocyten von resistenten und suszeptiblen Biomphalarien nach einer Infektion mit *Schistosoma mansoni* liefert somit indirekt einen Hinweis auf die Produktion von Wasserstoffperoxid, welches die eingekapselten Sporocysten abtötet (Hahn et al. 2001a). Das Ergebnis der PCR zeigt im resistenten Schnecken-Phänotyp in allen untersuchten Zeitpunkten, auch bei der nichtinfizierten Probe, eine sehr hohe Expression der SOD, die sich auch während des gesamten Verlaufs der Infektion nicht ändert. Dagegen wird in den Abwehrzellen der empfänglichen Schnecken, die SOD-Expression erst nach der Infektion hochgefahren. Es besteht somit ein deutlicher Unterschied in der Stärke der SOD-Expression zwischen den nichtinfizierten Proben der beiden Phänotypen. Dies macht deutlich, dass die Produktion des  $H_2O_2$  in den Hämocyten der resistenten Schnecken von Anbeginn der Infektion erfolgt, und seine toxische Wirkung auf die Sporocysten ausüben kann. Im Gegensatz dazu ziehen die Schistosomen aus der verzögerten Abwehr der Hämocyten der suszeptiblen Biomphalarien möglicherweise einen Nutzen und können der Abwehrreaktion entgehen.

Dass es sich bei dem amplifzierten Fragment um die gesuchte SOD handelt, wurde durch eine Datenbankrecherche bestätigt. Diese ergab signifikante Übereinstimmungen zu Cu/Zn-Superoxid-Dismutasen diverser Organismen (*Aplysia californica*, Q8MUT8; *Mus musculus*, P08228; *Brugia pahangi*, P41962; *Acanthocheilonema viteae*, CAB46811; *Xenopus laevis*, P13926; *Onchocercus volvulus*, P24706).

### **Catalase (EC 1.11.1.6)**

Weil Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) mit Superoxid ( $O_2^-$ ) zu dem hochreaktiven und cytotoxischen Hydroxylradikal  $HO\cdot$  reagieren kann, wird das  $H_2O_2$  wieder enzymatisch abgebaut. Dies geschieht durch die Umwandlung in Sauerstoff und  $H_2O$ , was neben der Glutathion-Peroxidase (GPX) und der Thioredoxin-Peroxidase (TPX) auch durch das Enzym Catalase (CAT) katalysiert wird.

Durch die Untersuchung der Expression des Catalase-Gens in infizierten Biomphalarien können Rückschlüsse auf den Abbau von Wasserstoffperoxid und somit auch auf die Abwehrreaktion der Hämocyten geschlossen werden. Das Ergebnis der OneStep RT-PCR zeigt, dass in den Abwehrzellen der resistenten Schnecken die Expression der Catalase langsam ansteigt und seinen Gipfel 48 Stunden nach der Parasiteninfektion erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist die Abwehrreaktion bereits abgeschlossen, das restliche Wasserstoffperoxid wird abgebaut und somit eine Zellschädigung verhindert. In den

Hämocyten der empfänglichen Schnecken dagegen bewegt sich die Genexpression des Enzyms auf einem stets gleichbleibend hohen Level. Auffällig ist auch hier der große Expressionsunterschied zwischen den nichtinfizierten Proben der beiden Phänotypen. Die sehr hohe Catalase-Expression bei den S-Schnecken deutet darauf hin, dass bereits zu Beginn der Infektion das gebildete Wasserstoffperoxid wieder abgebaut und dem System entzogen wird. Daraus kann geschlossen werden, dass die Konzentration an  $H_2O_2$  dadurch stets zu gering ist, um eine erfolgreiche Abwehr gegenüber den Schistosomen auszuüben. Sowohl bei der SOD-PCR als auch bei dieser Versuchsanordnung ist es denkbar, dass diese Vorgänge von Faktoren der Parasiten beeinflusst und die SOD und CAT-Gene moduliert werden.

Der Nachweis, dass das richtige Enzym amplifiziert wurde erbrachten signifikante Sequenz-Homologien zu Catalasen aus anderen Organismen (*Bacteroides fragilis*, P45737; *Streptomyces coelicolor*, Q9RJK9; *Pseudomans aeruginosa*, O52762; *Vibrio fischeri*, O68146).

#### 4.5.3 Cluster 3: Zellteilung und Signaltransduktion

Bei einem DNA-Abschnitt aus den Hämocyten der empfänglichen Biomphalarien konnte eine sehr große Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zu Septin bzw. Septin-ähnlichen Proteinen aus *Homo sapiens*, (AAO13878) und *Mus musculus* (Q9ESF7) festgestellt werden. Bei der Proteinfamilie der Septine handelt es sich um GTP-bindende Proteine, denen bei der Cytokinese, speziell bei der Organisation des Zellcortexes eine wichtige Rolle zufällt (Trimble 1999, Field & Kellogg 1999). Dabei wird eine Interaktion der Septine mit Aktin bzw. Aktin-bindenden Proteinen vermutet (Kinoshita & Noda 2001). In *Drosophila melanogaster* konnten die Proteine an den Furchungsspalten sich teilender Zellen lokalisiert werden (Fares et al 1995). Wie auch die bereits erwähnten VPS-Gene scheinen Septine darüber hinaus in den Prozess des Vesikeltransports durch Phagozytose/Exocytose involviert zu sein (Kartmann & Roth 2001).

Ein weiteres Fragment aus dem suszeptiblen Schnecken-Phänotyp weist signifikante Homologien zu der Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (GPAT, EC 2.4.2.14) aus verschiedenen Organismen wie *Drosophila melanogaster*, (Q27601), *Mus musculus* (Q8CIH9), *Gallus gallus* (P28173) auf. GPAT ist am Prozess der Nukleotidsynthese, im speziellen an der *de novo* Biosynthese von Purinen beteiligt. Es

katalysiert hierbei den ersten von mehreren Reaktionsschritten und kann deshalb als der Mengen-bestimmende Faktor dieses Syntheseweges angesehen werden (Zalkin & Dixon 1992). Aus den neu gebildeten Purinringsystemen geht das Inosin-5'-Monophosphat (IMP) hervor, welches anschließend in AMP und GMP umgesetzt wird. In den nachfolgenden Reaktionen der Nukleotidbiosynthese werden diese zu ATP und GTP phosphoryliert, die Grundbausteine für die DNA und RNA. Diese werden in der Zelle vor allem dann benötigt, wenn DNA repliziert wird, also eine Zellteilung durchgeführt wird. Der Metabolismus in der Zelle wird daraufhin hochgefahren. Eine weitere sehr wichtige Rolle erfüllen Purine in der Bildung von Coenzymen, wie CoA, FAD oder auch NADP. Des Weiteren werden sie als spezifische Signalmoleküle in der Zelle benötigt (cyclisches AMP, cAMP) und stellen darüber hinaus die chemische Energie in Form von ATP für sämtliche chemischen Reaktionen in der Zelle zur Verfügung.

Durch diese beiden Genabschnitte und deren beschriebener Homologien zu Proteinen, die unter anderem auch eine Funktion bei der Zellteilung einnehmen, kann gemutmaßt werden, ob Hämocyten von *Biomphalaria glabrata* das Potential besitzen, sich zu teilen. Einen weiteren Anhaltspunkt darauf liefert die Homologie eines Fragmentes aus dem suszeptiblen Schnecken-Phänotyp, die zu Polo-like Kinasen aus verschiedenen Organismen, wie *Homo sapiens* (P53350), *Mus musculus* (Q07832), *Hemicentrotus pulcherrimus* (Q9GRB7), *Drosophila melanogaster* (P52304), *Xenopus laevis* (BC046839) oder *Caenorhabditis elegans* (Q9N2L7) besteht.

### **Polo-like Kinasen**

Die Familie der Polo-like Kinasen (PIKs) gehört zu den Serin/Threonin Kinasen. Sie setzen sich aus einer N-terminalen Kinase-Domäne und einer regulatorischen C-terminalen Domäne zusammen. Letztere beinhaltet eine aus 30 Aminosäuren bestehende Sequenz, die sogenannte Polo-Box (Golsteyn et al. 1996, Nigg et al. 1998). Den PIKs fällt eine wichtige Funktionen im Ablauf des Zellzyklus zu. So sind sie in den Prozess der Regulation der Spindel bei der Mitose involviert, wobei während der M-Phase auch das Aktivitätsmaximum der Kinasen erreicht wird (Lake & Jelinek 1993, Smith et al. 1997, Donaldson et al. 2001). Ferner spielen die Polo-like Kinasen bei der abschließenden Cytokinese eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass PIKs während der Zellteilung mit einem Protein assoziiert sind, welches für die Organisation der zentralen Spindel und der Bildung des kontraktiven Rings

verantwortlich ist (Adams et al. 1998). Mutationen im Polo-Gen führen zu einem unkontrollierten Ablauf der Mitose in *Drosophila melanogaster* (Llamazares et al. 1991).

Die Bildung der Hämocyten von *Biomphalaria glabrata* erfolgt im Amoebocyte-Producing-Organ (APO), in der Herzregion der Schnecke (Lie et al. 1975, Jeong et al. 1983, Rashed et al. 1996). Bei einer Infektion oder bei Verletzungen ist zu beobachten, dass die Aktivität im APO stark zunimmt, das heißt, dass eine verstärkte Produktion von Hämocyten stattfindet (van der Knaap et al. 1987). Eine Teilung der Abwehrzellen konnte bisher nicht beobachtet und beschrieben werden.

In den durchgeführten Versuchen konnten mehrere Hinweise gefunden werden, die darauf hindeuten, dass die Abwehrzellen der Biomphalarien das Potential besitzen, sich zu teilen. Es konnten mehrere Genabschnitte identifiziert werden, die für Proteine kodieren, denen unter anderem auch eine Funktion bei der Teilung von Zellen zukommt. Zum einen trifft dies für die Polo-like Kinasen zu, als auch für die Septine, die im Prozess der Cytokinese eine wichtige Rolle spielen. Des Weiteren katalysiert die Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase die Biosynthese von Purinen, die unter anderem bei der Replikation der DNA benötigt werden. All diese Hinweise könnten den Schluss zulassen, dass Hämocyten aus *Biomphalaria glabrata* dazu befähigt sind, eine Zellteilung durchzuführen.

### **Serin/Threonin Proteinkinasen**

Neben den Funktionen als Polo-like Kinasen sind Serin/Threonin Proteinkinasen wichtiger Bestandteil im Prozess der Signaltransduktion. Dabei wird ein extrazelluläres Signal von einem integralen Membranprotein in das Zellinnere übertragen und weitergeleitet. Signalmoleküle (Hormone, Wachstumsfaktoren) werden von dem spezifischen Oberflächenrezeptor an der Außenseite der Zielzelle gebunden, was eine Änderung der räumlichen Struktur des Rezeptors zur Folge hat. Dadurch werden an der Innenseite des Rezeptors neue Signale ausgelöst. Diese second messenger bestimmen schließlich das weitere Verhalten der Zelle. Es wird zwischen drei verschiedenen Rezeptortypen unterschieden.

Beim Ionenkanal-gekoppelten Rezeptor führt die Bindung von Signalmolekülen zu einer raschen Öffnung für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und somit zu Veränderungen der Ionenkonzentration. Durch die Bindung an Calmodulin können anschließend zahlreiche Proteine moduliert werden.

Die Signalübertragung erfolgt beim zweiten Rezeptortyp mit Hilfe von GTP-bindenden-Proteinen. Dabei führt die Bindung eines Liganden zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch an der Innenseite der Membran ein G-Protein gebunden werden kann.

Die Aktivierung dieses Proteins führt zu dessen Abspaltung vom Rezeptor und zum Zerfall in drei Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins bindet und aktiviert ihrerseits wiederum bestimmte Enzyme, wodurch es zur Bildung von second messengern wie cAMP oder cGMP kommt.

Beim katalytischen Rezeptor werden durch die Bindung von Signalstoffen (häufig Wachstumsfaktoren wie EGF oder PDGF) Enzyme aktiviert, welche im Zellinnern spezifische Proteine phosphorylieren. Meist wird dabei über eine Tyrosin-Proteinkinase die Phospholipase C aktiviert, worauf die second messenger Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol freigesetzt werden. Letzterer wiederum aktiviert die Serin/Threonine Kinase, eine Proteinkinase C (PKC). Der Nachweis eines intrazellulären Rezeptors für aktivierte Proteinkinase C (RACK) konnte im Cytoplasma der Hämocyten von *Biomphalaria glabrata* erbracht werden (Lardans et al. 1998).

Aber auch der MAPK-Weg (Mitogen Aktivierte Protein Kinase) folgt diesem Muster. An dessen Ende steht nach einer langen Enzymkaskade, die unter anderem über Ras-Proteine und Serin/Threonin Proteinkinasen verläuft, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die auf die Genexpression von Zellen einwirken. Humphries und Mitarbeitern gelang der Nachweis eines MAPK-ähnlichen immunoreaktiven Proteins in *Biomphalaria glabrata*. Die Ergebnisse der Untersuchung lassen den Schluss zu, dass eine Proteinkinase C (PKC), Ras-Proteine und die MAPK Kinase bei der Signaltransduktion in Biomphalarien eine wesentliche Rolle spielen. (Humphries et al. 2001, Yoshino et al. 2001). Generell können Sauerstoffmetabolite, wie das Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikale solche Signaltransduktionswege auslösen (Suzuki et al. 1997, Finkel 2001). Für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Aktivierung der MAPK nachgewiesen (Guyton et al. 1995, Carter et al. 2002). Ein weiteres Signalmolekül, dessen Aktivität auch in Mollusken dokumentiert werden konnte stellt das Stickoxid NO dar, welches durch Zellmembranen hindurch diffundiert und intrazellulär zur Synthese von cGMP beiträgt (Moroz & Gillette 1995).

Ausschlaggebende Faktoren für eine unterschiedliche Signaltransduktion bei resistenten und suszeptiblen *Biomphalaria glabrata* können zum einen die Rezeptordichte und zum anderen der Typus des Rezeptors sein. Werden mehr Rezeptoren an der Oberfläche der Hämocyten aktiviert, kann das zu einer schnelleren bzw. anderen Zellantwort führen, wie wenn nur sehr wenige Rezeptoren an der Weiterleitung des Signals beteiligt sind. Dasselbe gilt, wenn sich unterschiedliche Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Abwehrzellen befinden, was in der

Literatur bisher allerdings noch nicht beschrieben werden konnte. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, können die in ihren Wirt eingedrungenen Schistosomen die Genregulation der Biomphalarien modulieren. Möglicherweise werden von den Sporocysten Faktoren synthetisiert, welche die oben beschriebenen Signaltransduktionswege beschreiten.

#### 4.6 Ausblick

Die Nukleotidsequenzen der in dieser Arbeit identifizierten DNA-Fragmente werden in ein geplantes erstes EST-Microarray-Projekt mit *Biomphalaria glabrata* einfließen (Catherine Jones et al., University of Aberdeen). Damit sollen die Genexpressionsmuster der Hämocyten untersucht und genetische Marker (Resistenzmarker) identifiziert werden. Da zur Durchführung von Microarrays möglichst viele Hämocyten-Sequenzen vorliegen sollten, können zudem Klone, aus der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Hämocyten cDNA-Genbank bereitgestellt werden. Mit dieser Technik wurden bspw. Veränderungen im Genexpressionsmuster in *Anopheles gambiae* nach Infektionen, oxidativem Stress oder nach einer Verletzung untersucht (Dimopoulos et al. 2002).

Durch Sequenzen, die mit der Resistenz in Verbindung gebracht werden, könnte ein Mapping, d.h. eine lokale Gen-Kartierung vorgenommen werden. Mit Hilfe spezifischer PCR-Untersuchungen oder durch einen einfachen Dot-blot vor Ort, welche diese Resistenzmarker detektieren, könnte ein solches Vorhaben realisiert werden (Rollinson et al. 1998). In den letzten Jahren avancierten Mikrosatelliten zu den wichtigsten genetischen Markern zur Untersuchung verschiedener Organismen. Dadurch wurde es möglich, die Strukturen von Populationen zu analysieren und Populationsgenetik zu betreiben (Jones et al. 1999, Rodrigues et al. 2002).

Bei der Untersuchung der Genexpression in den Hämocyten *Schistosoma mansoni*-infizierter Biomphalarien konnten einige DNA-Transkripte identifiziert werden, deren Genregulation durch die Infektion verändert wird. Möglicherweise handelt es sich dabei um Fragmente, die mit der Resistenz bzw. der Suszeptibilität der Zwischenwirtschnecke in Verbindung stehen. Um das Abwehrverhalten der Hämocyten gegenüber dem Parasiten zu verstehen, wäre es sehr wichtig, diese näher zu charakterisieren und deren Funktion während der Wirt-Parasit-Interaktion zu untersuchen. Dazu müssten die Sequenzen dieser Fragmente verlängert und

vervollständigt werden. Zum einen kann dies mit der Durchführung einer RACE-PCR oder durch das Screening von cDNA-Genbanken erfolgen.

Über EST-Projekte und durch den Aufbau einer BAC-Library, wie für *Schistosoma mansoni* bereits eine konstruiert und charakterisiert wurde (Le Paslier et al. 2000), sollte es gelingen, möglichst viele Sequenzinformationen über *Biomphalaria glabrata* zu sammeln. Stehen diese zur Verfügung, könnten darüber neue Gene identifiziert werden. Je mehr Sequenzen vorliegen desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, die hier gefundenen Transkripte näher zu analysieren und zu charakterisieren.

Basierend auf die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Nukleotidsequenzen der antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Catalase (CAT) können genspezifische Primer generiert werden, mit denen es gelingen sollte, diese Sequenzen durch PCR-Reaktionen zu verlängern und zu vervollständigen. Durch die Entwicklung spezifischer Antikörper können die Enzyme dann genauer charakterisiert und ihre Rolle im Abwehrverhalten der Hämocyten gegenüber Parasiten näher untersucht werden. Projekte dieser Art werden mit den Molluskenarten *Biomphalaria glabrata* und *Lymnaea stagnalis* am Institut für Tropenmedizin in Tübingen bereits weitergeführt.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung der differentiellen Genexpression in den Hämocyten der Zwischenwirtschnecke *Biomphalaria glabrata* hat sich die Kombination der Methoden des Differential Display und des Single Strand Conformation Polymorphismus (SSCP) als sehr erfolgreich erwiesen. Es konnten damit sowohl genetische Unterschiede zwischen den beiden Phänotypen R und S, als auch der Verlauf der Genregulation in den Abwehrzellen nach einer Infektion mit dem Parasiten *Schistosoma mansoni* dargestellt werden. Insgesamt wurden 112 DNA-Transkripte analysiert, von denen für 14 Fragmente Homologien zu bekannten Genen bzw. Proteinen nachgewiesen werden konnten (12.5%). Die Sequenzen aller anderen DNA-Fragmente wurden als neue Genabschnitte in eine EST-Datenbank eingegeben.

Beim Vergleich der differentiellen Genexpression in den Hämocyten von resistenten und suszeptiblen Biomphalarien konnte für 59 DNA-Transkripte eine solche festgestellt werden. Für sieben dieser Fragmente wurden Homologien zu bereits bekannten Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen in den verschiedenen Datenbanken gefunden. Dabei handelt es sich um einen Stoffwechselmetabolit (Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase), welcher dem resistenten Phänotyp zuzuordnen ist, und um sechs weitere Transkripte aus den Abwehrzellen der empfänglichen Schnecken. Diese kodieren für Proteine, denen Funktionen bei der Signaltransduktion (Serin/Threonin Kinase), im Zellzyklus (Polo-like Kinase, Septin und Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase) und beim "Gene silencing" (Methyl-CpG-bindendes Protein) zukommen. Außerdem konnten Homologien zu einem abwehrrelevanten Gen (Fibrinogen-verwandte Proteine) und zu einem weiteren Stoffwechselprodukt (Acetat-Kinase) ermittelt werden.

Die Untersuchung der unterschiedlichen Genregulation in den Hämocyten der infizierten resistenten Biomphalarien zeigte, dass während der Parasiteninfektion sehr viele qualitative Unterschiede auftreten, 90% der analysierten DNA-Fragmente sind differentiell exprimiert. Ferner wurde beobachtet, dass während des Verlaufs einer Parasiteninfektion in den Hämocyten der Zwischenwirtschnecken mehr Genabschnitte herunter- als hochreguliert werden. Sequenzhomologien konnten zu zwei Genen (Fibrinogen-verwandte Proteine, Ribosomales Protein L29), die bei Abwehrreaktionen gegenüber Fremdkörpern eine wichtige Rolle spielen, sowie zu dem Elongationsfaktor 1-beta' gefunden werden.

Dagegen wurden bei den infizierten suszeptiblen Biomphalarien mehr quantitative Unterschiede nachgewiesen, d.h., die DNA-Transkripte sind zu allen Infektionszeitpunkten nachweisbar, unterscheiden sich aber in der Stärke ihrer Genregulation. Unter der Infektion mit *Schistosoma mansoni* konnte zudem beobachtet werden, dass die Genregulation in den Hämocyten eher hochgefahren wird. Es konnten mehr hoch- als herunterregulierte Gene dokumentiert werden. Sequenzhomologien der untersuchten Transkripte bestehen auch bei diesem Phänotyp zu abwehrrlevanten Genen (Fibrinogen-verwandte Proteine, SNF7/VPS-Proteine). Des Weiteren zu einem Ribosomalen Protein (RPL23), sowie zu dem Elongationsfaktor 1-beta', der auch in den Hämocyten der resistenten Biomphalarien während der Parasiteninfektion nachgewiesen werden konnte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Potential zur Abwehr von eingedrungenen Schistosomen nicht nur in den resistenten sondern auch in den suszeptiblen Biomphalarien vorhanden ist. Es kann vermutet werden, dass das Ausbleiben einer Abwehrreaktion auf Faktoren der Parasiten zurückzuführen ist, die im Wechselspiel mit den Hämocyten der empfänglichen Schnecken stehen und diese in ihrer Genregulation modulieren und somit in ihrem Abwehrverhalten beeinflussen.

Zur Abwehr von Fremdkörpern und Parasiten werden in den Hämocyten der Biomphalarien Sauerstoffmetabolite (ROS) generiert, wobei dem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) hinsichtlich des Killings eine entscheidende Rolle zufällt. Für den Auf- und Abbau von  $H_2O_2$  sind die antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Catalase (CAT) verantwortlich.

Mit Hilfe der OneStep RT-PCR konnte die Expression dieser Enzyme sowohl in den Hämocyten der resistenten als auch in denen der suszeptiblen Biomphalarien nachgewiesen werden. Während der Infektion mit *Schistosoma mansoni* zeigte sich, dass die SOD-Expression in den resistenten Biomphalarien zu einem früheren Zeitpunkt einsetzt als in den Hämocyten der empfänglichen Schnecken.  $H_2O_2$  wird schneller produziert, wodurch die Abwehrreaktion auch schneller einsetzen kann. Bei der Untersuchung der Catalase-Expression konnte beobachtet werden, dass  $H_2O_2$  in den Abwehrzellen der R-Schnecken im Verlauf der Infektion nur sehr langsam wieder degeneriert wird, während dies dagegen in den empfänglichen Biomphalarien von Anbeginn der Infektion in hohem Maße geschieht. Möglicherweise ist dadurch die  $H_2O_2$ -Konzentration stets zu gering, um eine erfolgreiche Abwehr gegenüber den Schistosomen auszuüben.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aasheim HC, Deggerdal A, Smeland EB, Hornes E (1994): A simple subtraction method for the isolation of cell-specific genes using magnetic monodisperse polymer particles  
BioTechniques 16(4): 716-721
- Adams RR, Tavares AA, Salzberg A, Bellen HJ, Glover DM (1998): Pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis  
Genes Dev 12: 1483-1494
- Adema CM, Hertel LA, Loker ES (1999): Evidence from two planorbid snails of a complex and dedicated response to digenean (echinostome) infection  
Parasitology 119: 395-404
- Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES (1997): A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection  
Proc Natl Acad Sci USA 94(16): 8691-8696
- Adema CM, van Deutekom-Mulder EC, van der Knaap WP, Sminia T (1993): NADPH-oxidase activity: the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod *Lymnaea stagnalis*  
J Leukoc Biol 54(5): 379-383
- Adema CM, van Deutekom-Mulder EC, van der Knaap WP, Sminia T (1994): Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* hemocytes: the role of oxygen radicals  
Parasitology 109: 479-485
- Adema CM, van Deutekom-Mulder EC, van der Knaap WP, Meuleman EA, Sminia T (1991): Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis  
Dev Comp Immunol 15(1-2): 17-26
- Agner AE, Granath WO (1995): Hemocytes of schistosome-resistant and -susceptible *Biomphalaria glabrata* recognize different antigens on the surface of *Schistosoma mansoni* sporocysts  
J Parasitol 81(2): 179-186
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990): Basic local alignment search tool  
J Mol Biol 215: 403-410
- Andrews P, Thyssen J, Lorke D (1983): The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide  
Pharmacol Ther 19: 245-295
- Araujo N, Kohn A, Katz N (1999): Therapeutic evaluation of artesunate in experimental *Schistosoma mansoni* infection  
Rev Soc Bras Med Trop 32(1): 7-12

Asling B, Dushay MS, Hultmark D (1995): Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins  
Insect Biochem Mol Biol 25: 511-518

Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD (2002): Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting  
Dev Cell 3(2): 271-282

Basch PF (1976): Parasitological review: intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*  
Exp Parasitol 39: 150-169

Bayne CJ, Boswell CA, Loker ES, Yui MA (1985): Plasma components which mediate cellular defenses in the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*  
Dev Comp Immunol 9: 523-530

Bayne CJ, Buckley PM, Dewan PC (1980): *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*  
Exp Parasitol 50: 409-416

Bayne CJ, Hahn UK, Bender RC (2001): Mechanism of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival  
Parasitology 123: 159-167

Bayne CJ, Loker ES, Yui MA (1986): Interactions between the plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) and the sporocyst tegument of *Schistosoma mansoni* (Trematoda)  
Parasitology 92: 653-664

Bayne CJ, Yoshino TP (1989): Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism  
Am Zool 29: 399-407

Bender RC, Bayne CJ (1996): Purification and characterization of a tetrameric alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*  
Biochem J 316: 893-900

Bender RC, Fryer SE, Bayne CJ (1992): Proteinase inhibitory activity in the plasma of a mollusc: evidence for the presence of alpha-macroglobulin in *Biomphalaria glabrata*  
Comp Biochem Physiol B 102(4): 821-824

Bezerra FS, Nogueira-Machado JA, Chaves MM, Martins RL, Coelho PM (1997): Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*  
Rev Inst Med Trop Sao Paulo 39(4): 197-201

- Boyes J, Bird A (1991): DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein  
Cell 64(6): 1123-1134
- Brindley PJ, Kalinna BH, Wong JY, Bogitsch BJ, King LT, Smyth DJ, Verity CK, Abbenante G, Brinkworth RI, Fairlie DP, Smythe ML, Milburn PJ, Bielefeldt-Ohmann H, Zheng Y, McManus DP (2001): Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D  
Mol Biochem Parasitol 112(1): 103-112
- Carter LA, Tabor MB, Bonner JC, Bonner LA (2002): Mitogen-activated protein kinase activation by oxidative and bacterial stress in an amphibian cell culture model  
Environ Health Perspect 110(7): 641-645
- Chang GW, Kam PC (1999): The physiological and pharmacological roles of cytochrome p450 isoenzymes  
Anaesthesia 54: 42-50
- Chappell CL, Dresden MH (1986): *Schistosoma mansoni*: proteinase activity of "hemoglobinase" from the digestive tract of adult worms  
Exp Parasitol 61(2): 160-167
- Chen JJ, Peck K (1995): Non-radioisotopic differential display method to directly visualize and amplify differential bands on nylon membrane  
Nucleic Acid Res 24: 793-794
- Cheng TC, Dougherty WJ (1989): Ultrastructural evidence for the destruction of *Schistosoma mansoni* sporocysts associated with elevated lysosomal enzyme levels in *Biomphalaria glabrata*  
J Parasitol 75(6): 928-941
- Cioli D (1998): Chemotherapy of schistosomiasis: an update  
Parasitol Today 14(10): 418-422
- Connors VA, de Buron I, Granath WO (1995): *Schistosoma mansoni*: interleukin-1 increases phagocytosis and superoxide production by hemocytes and decreases output of cercariae in schistosome-susceptible *Biomphalaria glabrata*  
Exp Parasitol 80(1): 139-148
- Connors VA, de Buron I, Jourdane J, Theron A, Agner A, Granath WO (1998): Recombinant human interleukin-1 mediated killing of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts in *Biomphalaria glabrata*  
J Parasitol 84(5): 920-926
- Connors VA, Lodes MJ, Yoshino TP (1991): Identification of a *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory-secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes  
J Invertebr Pathol 58(3): 387-395

- Connors VA, Yoshino TP (1990): *In vitro* effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes of *Biomphalaria glabrata*  
J Parasitol 76(6): 895-902
- Corona M, Estrada E, Zurita M (1999): Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*  
J Exp Biol 202: 929-938
- Coustau C, Yoshino TP (1994): Surface membrane polypeptides associated with hemocytes from *Schistosoma mansoni* susceptible and resistant snails of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda)  
J Invertebr Pathol 63(1): 82-89
- Dat JF, Pellinen R, van de Cotte B, Langebartels C, Kangasjarvi J, Inze D, van Breusegem F (2003): Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco  
Plant J 33(4): 621-632
- Davids BJ, Yoshino TP (1995): *Schistosoma mansoni*: excretory-secretory polypeptides exhibit selective binding to plasma components of the snail *Biomphalaria glabrata*  
Exp Parasitol 81(3): 292-301
- Davids BJ, Yoshino TP (1998): Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes  
Dev Comp Immunol 22(1): 39-53
- De Bont J, Vercruyse J (1997): Epidemiology and control of cattle schistosomiasis  
Parasitol Today 13: 255-262
- De Clerq D, Vercruyse J, Kongs A, Verle P, Dompnier JP, Faye PC (2002): Efficacy of artesunate and praziquantel in *Schistosoma haematobium* infected schoolchildren  
Acta Trop 82(1): 61-66
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996): Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries  
Proc Natl Acad Sci USA 93(12): 6025-6030
- Dikkeboom R, Bayne CJ, van der Knaap WP, Tijnagel JM, (1988a): Possible role of reactive forms of oxygen in *in vitro* killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*  
Parasitol Res 75: 148-154
- Dikkeboom R, van der Knaap WP, van den Bovenkamp W, Tijnagel JM, Bayne CJ (1988b): The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species  
Dev Comp Immunol 12(3): 509-520

- Dilks DW, Ring RH, Khawaja XZ, Novak TJ, Aston C (2003): High-throughput confirmation of differential display PCR results using reverse northern blotting  
J Neurosci Methods 123: 47-54
- Dimopoulos G, Chritophides GK, Meister S, Schultz J, White KP, Barillas-Mury C, Kafatos FC (2002): Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection  
Proc Natl Acad Sci USA 99(13): 8814-8819
- Dönges J (1966): The serological demonstration of *Schistosoma* infections by means of cercariae of *Posthodiplostotum brevicaudatum*. A modification of the cercarial membrane reaction of Vogel and Minning  
Z Tropenmed Parasitol 17(4): 413-426
- Dönges J (1967): The miracidia hatching test in bilharziasis  
Ger Med Mon 12(3): 116-117
- Dönges J (1988): Parasitologie - Mit besonderer Berücksichtigung humanpathogener Formen. 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Donaldson MM, Tavares AA, Hagan IM, Nigg EA, Glover DM (2001): The mitotic roles of polo-like kinase  
J Cell Sci 114(13): 2357-2358
- Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Bilderback AL, Berger EM (2000): The isolation of two juvenile hormone-inducible genes in *Drosophila melanogaster*  
Dev Biol 224: 486-495
- Duttaroy A, Bourbeau D, Wang XL, Wang E (1998): Apoptosis can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1-alpha  
Exp Cell Res 10: 168-176
- El-Kadi AO, Maurice H, Ong H, du Souich P (1997): Down regulation of the hepatic cytochrome p450 by an acute inflammatory reaction: implication of mediators in human and animal serum and in the liver  
Br J Pharmacol 121(6): 1164-1170
- Fares H, Peifer M, Pringle JR (1995): Localization and possible function of *Drosophila* septins  
Mol Biol Cell 6(12): 1843-1859
- Feinberg AP, Vogelstein B (1984): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity  
Anal Biochem 137: 266-267
- Field CM, Kellogg D (1999): Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases?  
Trends Cell Biol 9: 387-394

- Finkel T (2001): Reactive oxygen species and signal transduction  
IUBMB Life 52: 3-6
- Franz O, Bruchhaus I, Roeder T (1999): Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting  
Nucleic Acid Res 27(11): e3
- Fridovich I (1997): Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases and related matters  
J Biol Chem 272(30): 18515-18517
- Frohman MA (1993): Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE  
Methods Enzymol 218: 340-356
- Fryer SE, Bayne CJ (1989): Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata*: a strain-specific, time-dependent process  
Parasite Immunol 11: 269-278
- Fryer SE, Bayne CJ (1996): Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components  
Dev Comp Immunol 20(1): 23-37
- Fryer SE, Bender RC, Bayne CJ (1996): Inhibition of cysteine proteinase from *Schistosoma mansoni* larvae by alpha-macroglobulin from the plasma of *Biomphalaria glabrata*  
J Parasitol 82(2): 343-347
- Fryer SE, Hull CA, Bayne CJ (1989): Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate specificity of hemocyte receptors and a plasma opsonin  
Dev Comp Immunol 13: 9-26
- Fujita N, Takebayashi S, Okumura K, Kudo S, Chiba T, Saya H, Nakao M (1999): Methylation-mediated transcriptional silencing in euchromatin by methyl-CpG-binding protein MBD1 isoforms  
Mol Cell Biol 19(9): 6415-6426
- Fulford AJ, Ouma JH, Kariuki HC, Thiongo FW, Klumpp R, Kloos H, Sturrock RF, Butterworth AE (1996): Water-contact observations in Kenya communities endemic for schistosomiasis: methodology and patterns of behaviour  
Parasitology 113: 223-241
- Gao Y, Hernandez VP, Fallon AM (1999): Immunity proteins from mosquito cell lines include three defensin A isoforms from *Aedes aegypti* and a defensin D from *Aedes albopictus*  
Insect Mol Biol 8: 311-318
- Giboda M, Ditrich O, Scholz T, Viengsay T, Bouaphanh S (1991): Current status of food-borne parasitic zoonoses in Laos  
Southeast Asian J Trop Med Public Health 22: 56-61

- Giboda M, Malek EA, correa R (1997): Human schistosomiasis in Puerto Rico: reduced prevalence rate and absence of *Biomphalaria glabrata*  
Am J Trop Med Hyg 57(5): 564-568
- Golsteyn RM, Lane HA, Mundt KE, Arnaud L, Nigg EA (1996). The family of polo-like kinases  
Prog Cell Cycle Res 2: 107-114
- Granath WO, Yoshino TP (1983): Lysosomal enzyme activities in susceptible and refractory strains of *Biomphalaria glabrata* during the course of infection with *Schistosoma mansoni*  
J Parasitol 69(6): 1018-1026
- Guisse F, Polman K, Stelma FF, Mbaye A, Talla I, Niang M, Deelder AM, Ndir O, Gryseels B (1997): Therapeutic evaluation of two different dose regimens of praziquantel in a recent *Schistosoma mansoni* focus in Northern Senegal  
Am J Trop Med Hyg 56(5): 511-514
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ (1995): Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
J Biol Chem 271: 4138-4142
- Haas W, Grabe K, Geis C, Pach T, Stoll K, Fuchs M, Haberl B, Loy C (2002): Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key-role of L-arginine  
Parasitology 124: 153-164
- Haas W, Haberl B, Kalbe M, Koerner M (1995): Snail-host-finding by miracidia and cercariae: chemical host cues  
Parasitol Today 11: 468-472
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ (2000): Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation  
Dev Comp Immunol 24(6-7): 531-541
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ (2001a): Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species  
J Parasitol 87(2): 292-299
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ (2001b): Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*  
J Parasitol 87(4): 778-785
- Hanelt B, Adema CM, Mansour MH, Loker ES (1997): Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* using nested PCR  
J Parasitol 83(3): 387-394
- Hara E, Kato T, Nakada S, Sekiya S, Oda K (1991): Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)<sub>30</sub>-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells  
Nucleic Acid Res 19: 7097-7104

- Hayashi K (1991): PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations  
PCR Methods Appl 1: 34-38
- Hertel LA, Bayne CJ, Loker ES (2002): The symbiont *Capsaspora owczarzaki*, nov. gen. nov. sp., isolated from three strains of the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata* is related to members of the Mesomycetozoa  
Int J Parasitol 32(9): 1183-1191
- Hertel LA, Stricker SA, Loker ES (2000): Calcium dynamics of hemocytes of the gastropod *Biomphalaria glabrata*: effects of digenetic trematodes and selected bioactive compounds  
Invertebr Biol 119: 27-37
- Hertel LA, Stricker SA, Monroy FP, Wilson WD, Loker ES (1994): *Biomphalaria glabrata* hemolymph lectins: binding to bacteria, mammalian erythrocytes and to sporocysts and rediae of *Echinostoma paraensei*  
J Invertebr Pathol 64(1): 52-61
- Huang Y, Manderson L (1992): Schistosomiasis and the social patterning of infection  
Acta Trop 51: 75-194
- Humphries JE, Elizondo L, Yoshino TP (2001): Protein kinase C regulation of cell spreading in the molluscan *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line  
Biochim Biophys Acta 1540(3): 243-252
- Hung HL, Song F, Gewirtz A (1999): A method for identifying differentially expressed genes in rare populations of primary human hematopoietic cells  
Leukemia 13(2): 295-297
- Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF, Day TA, Bennett JL (1999): Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers  
Am J Trop Med Hyg 60(6): 932-935
- James ER (1994): Superoxide Dismutase  
Parasitol Today 10(12): 481-484
- Jeong KH, Lie KJ, Heynemann D (1983): The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*  
Dev Comp Immunol 7: 217-228
- Jobin WR, Brown RA, Velez SP, Ferguson FF (1977): Biological control of *Biomphalaria glabrata* in major reservoirs of Puerto Rico  
Am J Trop Med Hyg 26: 1018-1024
- Johnston LA, Yoshino TP (1996): Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*  
Parasitology 112: 469-479

- Johnston LA, Yoshino TP (2001): Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* via surface carbohydrate binding receptors  
J Parasitol 87(4): 786-793
- Jones CS, Lockyer AE, Rollinson D, Piertney SB, Noble LR (1999): Isolation and characterization of microsatellite loci in the freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*  
Mol Ecol 8(12): 2149-2151
- Kaludov NK, Wolffe AP (2000): MeCP2 driven transcriptional repression *in vitro*: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery  
Nucl Acids Res 28(9): 1921-1928
- Kartmann B, Roth D (2001): Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis  
J Cell Sci 114: 839-844
- Kinoshita M, Noda M (2001): Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery  
Cell Struct Funct 26: 667-670
- Kloos H, McCullough FS (1987)  
In: Plant Molluscicides, Ed.: Mott KE, John Wiley: 45-108
- Kramer G, Rauch T, Rist W, Vorderwülbecke S, Patzelt H, Schulze-Specking A, Ban N, Deuerling E, Bukau B (2002): L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome  
Nature 419(6903): 171-174
- Kranz A, Kinner A, Kolling R (2001): A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in yeast  
Mol Biol Cell 12(3): 711-723
- Lake RJ, Jelinek WR (1993): Cell cycle and terminal differentiation-associated regulation of the mouse mRNA encoding a conserved mitotic protein kinase  
Mol Cell Biol 13: 7793-7801
- Lardans V, Serra E, Capron A, Dissous C (1998): Characterization of an intracellular receptor for activated protein kinase C (RACK) from the mollusc *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host for *Schistosoma mansoni*  
Exp Parasitol 88(3): 194-199
- Lau AO, Sacci JB, Azad AF (2000): Retrieving parasite specific liver stage gene products in *Plasmodium yoelii* infected livers using differential display  
Mol Biochem Parasitol 111: 143-151
- Lavery WL, Goyns MH (2002): Increased expression of the S25 ribosomal protein gene occurs during ageing of the rat liver  
Gerontology 48(6): 369-373

- Law PT, Tsui SK, Lam WY, Luk SC, Hwaang DM, Liew CC, Lee CY, Fung KP, Waye MM (1996): A novel cDNA encoding a human homologue of ribosomal protein L29  
*Biochim Biophys Acta* 1305: 105-108
- Leonard PM, Adema CM, Zhang SM, Loker ES (2001): Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*  
*Gene* 269(1-2): 155-165
- Le Paslier MC, Pierce RJ, Merlin F, Hirai H, Wu W, Williams DL, Johnston D, LoVerde PT, Le Paslier D (2000): Construction and characterization of a *Schistosoma mansoni* bacterial artificial chromosome library  
*Genomics* 65(2): 87-94
- Liang P, Pardee AB (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction  
*Science* 257(5072): 967-971
- Liang P, Pardee AB (1995): Recent advances in differential display  
*Current opinion in Immunology* 7: 274-280
- Lie KJ (1982): Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in the snail *Biomphalaria glabrata*: a discussion of the interference theory  
*Trop Geogr Med* 34: 111-122
- Lie KJ, Heynemann D, Yau P (1975): The origin of amoebocytes in *Biomphalaria glabrata*  
*J Parasitol* 61: 574-576
- Lie KJ, Jeong KH, Heynemann D (1980): Inducement of miracidia-immobilizing substance in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*  
*Int J Parasitol* 10:183-188
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M (1993): Cloning of differences between two complex genomes  
*Science* 259(5097): 946-951
- Liu S, Smith SE, Julian J, Rohde LH, Karin NJ, Carson DD (1996): cDNA cloning and expression of HIP, a novel cell surface heparan sulfate/heparin-binding protein of human uterine epithelial cells and cell lines  
*J Biol Chem* 271: 11817-11823
- Llamazares S, Moreira A, Tavares A, Girdham C, Spruce BA, Gonzalez C, Karess RE, Glover DM, Sunkel CE (1991): Polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*  
*Genes Dev* 5: 2153-2165

- Lockyer AE, Jones CS, Noble LR, Rollinson D (2000): Use of differential display to detect changes in gene expression in the intermediate host *Biomphalaria glabrata* upon infection with *Schistosoma mansoni*  
Parasitology 120: 399-407
- Lodes MJ, Yoshino TP (1990): The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility  
J Invertebr Pathol 56: 75-85
- Loker ES, Cimino DF, Hertel LA (1992): Excretory-secretory products of *Echinostoma paraensei* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions  
J Parasitol 78: 104-115
- Marra MA, Hillier L, Waterston RH (1998): Expressed sequence tags- ESTablishing bridges between genomes  
Trends Genet 14: 4-7
- Mathieu-Daude F, Cheng R, Welsh J, T, McClelland M (1996a): Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrary primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism (SSCP) gels  
Nucleic Acid Res 24: 1504-1507
- Mathieu-Daude F, Welsh J, Vogt T, McClelland M (1996b): DNA rehybridization during PCR: the 'Cot effect' and its consequences  
Nucleic Acid Res 24(11): 2080-2086
- Matricon-Gondran M, Letocart M (1999): Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*  
J Invertebr Pathol 74(3): 224-234
- Matsuda K, Masaki T, Ishii S, Yamashita H, Watanabe T, Nagawa H, Muto T, Hirata Y, Kimura K, Kojima S (1999): Possible associations on rectal carcinoma with *Schistosoma japonicum* infection and membranous nephropathy: a case report with a review  
Jpn J Clin Oncol 29: 576-581
- McCord JM (2002): Superoxide Dismutase in aging and disease  
In: Meth Enzymol 349: 331-341 Ed.: Parker L, Elsevier Science (USA)
- McKerrow JH, Jeong KH, Beckstead JH (1985): Enzyme histochemical comparison of *Biomphalaria glabrata* amebocytes with human granuloma macrophages  
J Leukoc Biol 37(3): 341-347
- McLaren DJ (1984): Disguise as an evasive strategem of parasitic organisms  
Parasitology 88: 597-611
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997): A human homologue of the *Drosophila* TOLL protein signals activation of adaptive immunity  
Nature 388(6640): 394-397

- Mei H, LoVerde PT (1997): *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes  
Exp Parasitol 86(1): 69-78
- Miller AN, Ofori K, Lewis FA, Knight M (1996): *Schistosoma mansoni*: use of a subtractive cloning strategy to search for RFLPs in parasite-resistant *Biomphalaria glabrata*  
Exp Parasitol. 84: 420-428
- Miller AN, Raghavan N, Fitzgerald PC, Lewis FA, Knight M (2001): Differential gene expression in hemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infections  
Int J Parasitol 31(7): 687-696
- Milner JD, Hajduk SL (1999): Expression and localization of serum resistance associated protein in *Trypanosoma brucei rhodesiense*  
Mol Biochem Parasitol 104: 271-283
- Miura T, Kamikouchi A, Sawata M, Takeuchi H, Natori S, Kubo T, Matsumoto T (1999): Soldier caste-specific gene expression in the mandibular glands of *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae)  
Proc Natl Acad Sci USA 96: 13874-13879
- Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, Roch P (1999): Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge  
J Cell Sci 112: 4233-4242
- Mohamed AH (1998): Characterization of hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) in interaction with two strains of *Schistosoma mansoni* (Sambon 1907)  
Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Modha J; Lambertucci JR, Doenhoff MJ, McLaren DJ (1990): Immune dependence of schistosomicidal chemotherapy: an ultrastructural study of *Schistosoma mansoni* adult worms exposed to praziquantel and immune serum *in vivo*  
Parasite Immunol 12(3): 321-334
- Moroz LL, Gillette R (1995): From Polyplacophora to Cephalopoda: comparative analysis of nitric oxide signalling in mollusca  
Acta Biol Hung 46: 169-182
- Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ (1999): Relationship between Schistosomiasis and bladder cancer  
Clin Microbiol Rev 12(1): 97-111
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KP, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR (1997): Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human  
Science 277(5328): 955-959

- Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997): MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin  
Cell 88(4): 471-481
- Nare B, Smith JM, Prichard RK (1990): *Schistosoma mansoni*: levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development  
Exp Parasitol 70: 389-397
- Nguma JF, McCullough FS, Masha E (1982): Elimination of *Biomphalaria pfeifferi*, *Bulinus tropicus* and *Lymnaea natalensis* by the ampullarid snail, *Marisa cornuarietis*, in a man-made dam in northern Tanzania  
Acta Trop 39(1): 85-90
- Nigg EA (1998): Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish  
Curr Opin Cell Biol 10: 776-783
- Odorizzi G, Katzmann DJ, Babst M, Audhya A, Emr SD (2003): Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*  
J Cell Sci 116: 1893-1903
- Pan CT(1965): Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*  
Am J Trop Med Hyg 14: 931-976
- Pearson WR, Lipman DJ (1988): Improved tools for biological comparison  
Proc Natl Acad Sci USA 85: 2444-2448
- Picquet M, Ernould JC, Vercruyse J, Southgate VR, Mbaye A, Sambou B, Niang M, Rollinson D (1996): The epidemiology of human schistosomiasis in the senegal river basin  
Trans R Soc Med Hyg 90: 340-346
- Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A (2002): Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces  
Am J Trop Med Hyg 66(2): 157-162
- Raghavan N, Miller AN, Gardner M, FitzGerald PC, Kerlavage AR, Johnston DA, Lewis FA, Knight M (2003): Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*  
Mol Biochem Parasitol 126: 181-191
- Rashed AA, James BL, Shehata KK, Sabry AH, Habib KS, el Sharkawy IM, Morsy TA (1996): Studies on the sacculant portion of the kidney of *Biomphalaria glabrata* Say (1818) as a haemopoetic organ  
J Egypt Soc Parasitol 26(2): 401-421
- Richards CS (1975): Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different strains of *Schistosoma mansoni*  
Parasitology 70:231-241

- Rios M, Ojeda S, Velasquez LA, Maisey K, Croxatto HB (2001): A segment and epithelium specific messenger ribonucleic acid fragment up-regulated by estradiol in the rat oviduct  
Biol Res 34: 15-21
- Rodrigues NB, LoVerde PT, Romanha AJ, Oliveira G (2002): Characterization of new *Schistosoma mansoni* microsatellite loci in sequences obtained from public DNA databases and microsatellite enriched genomic libraries  
Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 71-75
- Rollinson D, Stothard JR, Jones CS, Lockyer AE, de Souza CP, Noble LR (1998): Molecular characterisation of intermediate snail hosts and the search for resistance genes  
Mem Inst Oswaldo Cruz 93: 111-116
- Ross AG, Li YS, Davis GM, Sleigh AC, Williams GM, Hartel GF, Forsyth SJ, Li Y, McManus DP (1998): Activity diaries to asses human water contact patterns for schistosomiasis japonica in the Dongting lake region in China  
Acta Trop 71: 213-228
- Ross AG, Sleigh AC, Li YS, Davis GM, Williams GM, Zheng J, Zheng F, McManus DP (2001): Schistosomiasis control in the people's republic of china: Prospects and challenges for the 21<sup>st</sup> century  
Clin Microbiol Rev 14(2): 270-295
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molecular cloning. A laboratory manual  
Second edition, Cold spring harbor laboratory press, Cold spring harbor, NY
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors  
Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467
- Satarug S, Lang MA, Yongvanit P, Sitihithawron P, Mairiang P, Pelkonen P, Bartsch H, Haswell-Elkins MR (1996): Induction of cytochrome p450 2A6 expression in humans by the carcinogenic parasitic infection, *Opisthorchiasis viverrini*  
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 5(10): 795-800
- Schall VT, Vasconcellos MC, Souza CP, Baptista DF (1998): The molluscicidal activity of 'crown to christ' (*Euphorbia splendens* var. *hislopiae*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*  
Am J Trop Med Hyg 58(1): 7-10
- Schall VT, Vasconcellos MC, Rocha RS, Souza CP, Mendes NM (2001): The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopiae* (syn *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in brazil  
Acta Trop 79: 165-170
- Schneider O (1998): Herstellung und Charakterisierung einer Subtraktionsgenbank aus *Entamoeba histolytica*-Leberstadien und *Entamoeba histolytica*-Kulturtrophozoiten  
Diplomarbeit Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Schneider O, Zelck UE (2001): Differential display analysis of hemocytes from schistosome-resistant and schistosome-susceptible intermediate hosts  
Parasitol Res 87(6): 489-491

Scrimgeour EM, Koul R, Sallam J, Idris MA (2001): Resurgence of schistosomiasis mansoni in Oman  
Trop Doct 31(3): 185-186

Serrano DR, Zanotti-Magalhaes EM, Magalhaes LA, Carvalho JF (2002): The influence of hydrocortisone on cellular defence mechanisms of *Biomphalaria glabrata*  
Mem Inst Oswaldo Cruz 97(6): 881-885

Sheweita SA, Mubark J, Doenhoff MJ, Mostafa MH, Margison GP, O'Connor PJ, Elder RH (2002): Changes in the expression of cytochrome P450 isozymes and related carcinogen metabolizing enzyme activities in *Schistosoma mansoni*-infected mice  
J Helminthol 76(1): 71-78

Shozawa A, Suto C, Kumada N (1989): Superoxide production by the hemocytes of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*, stimulated by miracidia of *Schistosoma mansoni*  
Zool Sci 6: 1019-1022

Silar P, Picard M (1994): Increased longevity of EF-1 alpha high-fidelity mutants in *Podospora anserina*  
J Mol Biol 7: 231-236

Silva FP Jr, Ribeiro F, Katz N, Giovanni-De-Simone S (2002): Exploring the subsite specificity of *Schistosoma mansoni* aspartyl hemoglobinase through comparative molecular modelling  
FEBS Lett 514(2-3): 141-148

Simurda MC, van Keulen H, Rekosh DM, LoVerde PT (1988): *Schistosoma mansoni*: identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn)  
Exp Parasitol 67(1): 73-84

Sminia T, van der Knaap WP (1986): Immunorecognition in invertebrates with special reference to molluscs  
Immunity in Invertebrates, Brehelin M, Springer-Verlag, Berlin: 112-124

Smith MR, Wilson ML, Hamanaka R, Chase D, Kung HF, Longo DL, Ferris DK (1997): Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase  
Biochem Biophys Res Commun 234: 397-405

Standen OD (1951): Some observations upon the maintenance of *Australorbis glabratus* in the laboratory  
Ann Trop Med Parasitol 45: 80-83

Sullivan JT, Spence JV, Nunez JK (1995): Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts in *Biomphalaria glabrata* implanted with amoebocyte-producing organ allografts from resistant snails  
J Parasitol 81(5): 829-833

Suzuki MT, Giovannoni SJ (1996): Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR  
Appl Environ Microbiol 62(2): 625-630

Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A (1997): Oxidants as stimulators of signal transduction  
Free Radic Biol Med 22: 269-285

Thomas PS (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose  
Proc Natl Acad Sci USA 77: 5201-5205

Trentmann SM, van der Knaap E, Kende H (1995): Alternatives to  $^{35}\text{S}$  as a label for differential display to eukaryotic messenger RNA  
Science 267: 1186-1187

Trimble WS (1999): Septins: a highly conserved family of membrane-associated GTPases with functions in cell division and beyond  
J Membr Bio, 169: 75-81

Uchikawa R, Loker ES (1992): *Echinostoma paraensei* and *Schistosoma mansoni*: adherence of unaltered or modified latex beads to hemocytes of the host snail *Biomphalaria glabrata*  
Exp Parasitol 75(2): 223-232

Utzing J, Chollet J, You J, Mei J, Tanner M, Xiao S (2001): Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals  
Acta Trop 80(1): 9-18

Utzing J, N'Goran E, N'Dri A, Lengeler C, Xiao S, Tanner M (2000): Randomized controlled trial of oral artemether for the prevention of *Schistosoma mansoni* infection  
Lancet 355: 1320-1325

van der Knaap WP, Loker ES (1990): Immune mechanisms in trematode-snail-interactions  
Parasitol Today 6: 175-182

van der Knaap WP, Meuleman EA, Sminia T (1987): Alterations in the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*  
Parasitol Res 73: 57-65

van der Knaap WP, Sminia T, Schutte R, Boerrigter-Barendsen LH (1983): Cytophilic receptors for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leukocytes: *in vitro* phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnaea stagnalis*  
Immunol 48: 377-383

- Vasquez RE, Sullivan JT (2001): Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*  
Dev Comp Immunol 25(7): 561-564
- Vila-Ortiz GJ, Radrizzani M, Carminatti H, Idoyaga-Vargas VP, Santa-Coloma TA (2001): Single strand mRNA differential display (SSDD) applied to the identification of serine/threonine phosphatases regulated during cerebellar development  
J Neurosci methods 105: 87-94
- Wadhwa R, Duncan E, Kaul SC, Reddel RR (1996): An effective elimination of false positive isolated from differential display of mRNAs  
Mol Biotechnol 6(2): 213-217
- Warren KS (1973): The pathology of schistosome infections  
Helminthol Abstr Ser A 42: 590-633
- Webster JP (2001): Compatibility and sex in a snail-schistosome system  
Parasitology 122: 423-432
- Wilson RA, Coulson PS (1986): *Schistosoma mansoni*: dynamics of migration through the vascular system of the mouse  
Parasitology 92: 83-100
- World Health Organization (1996)  
WHO Fact Sheets 115
- Xiao SH, Chollet J, Weiss NA, Bergquist RN, Tanner M (2000): Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*  
Int J Parasitol 49: 19-24
- Xiao SH, Shen BG (1995): Scanning electron microscope observation on tegumental damage of 21-d-old *Schistosoma japonicum* induced by praziquantel  
Zhongguo Yao Li Xue Bao 16(3): 273-275
- Yeaton RW (1981a): Invertebrate lectins: I. Occurrence  
Dev Comp Immunol 5(3): 391-402
- Yeaton RW (1981b): Invertebrate lectins: II. Diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition  
Dev Comp Immunol 5(4): 535-545
- Yoshino TP (1983): Lectins and antibodies as molecular probes of molluscan hemocyte surface membranes  
Dev Comp Immunol 7: 641-644
- Yoshino TP (1988): Phospholipase C-like activity in phagocytic cells of asian clam, *Corbicula fluminea*, and its possible role in cell-mediated cytolytic reactions  
J Invertebr Pathol 51: 32-

- Yoshino TP, Bayne CJ (1983): Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*  
Parasite Immunol 5: 317-328
- Yoshino TP, Boyle JP, Humphries JE (2001): Receptor-ligand interactions and cellular signalling at the host-parasite interface  
Parasitology 123: 143-157
- Yoshino TP, Cheng TC (1978): Snail host-like antigens associated with the surface membranes of *Schistosoma mansoni*  
J Parasitol 64: 752-754
- Zalkin H, Dixon JE (1992): *De novo* purine nucleotide biosynthesis  
Prog Nucleic Acids Res Molec Biol 42: 259-287
- Zelck UE (1999): Glycosidase activities in plasma of naïve and schistosome-infected *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda)  
Parasitology 119: 563-568
- Zelck UE, Becker W (1992): *Biomphalaria glabrata*: influence of calcium, lectins and plasma factors on *in vitro* phagocytic behaviour of hemocytes of noninfected or *Schistosoma mansoni*-infected snails  
Exp Parasitol 75(1): 126-136
- Zelck UE, Becker W, Bayne CJ (1995): The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*  
Dev Comp Immunol 19: 181-194
- Zelck UE, von Janowsky B (2003): Antioxidant enzymes in intramolluscan *Schistosoma mansoni* and ROS induced changes in expression (eingereicht)
- Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN (2003): Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation  
J Biol Chem 278(31): 28443-28454
- Zhang SM, Leonard PM, Adema CM, Loker ES (2001): Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata* : characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain  
Immunogenetics 53(8): 684-694
- Zhang SM, Loker ES (2003): The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. Fibrinogen-related proteins  
Dev Comp Immunol 27(3): 175-187
- Zussmann RA, Baumann PM, Petruska JC (1970): The role of ingested hemoglobin in the nutrition of *Schistosoma mansoni*  
J Parasitol 56(1): 75-79

## 7. ANHANG

### 7.1 RNA-Gehalt der verwendeten Proben

**Tabelle 9:** Photometrisch bestimmter RNA-Gehalt der verwendeten Proben beim Vergleich der Genexpression von Hämocyten resistenter (R1-R3) und suszeptibler (S3-S5) Schnecken

Probe	RNA-Gehalt (ng/μl)	Gesamtmenge (ng)
R1	20.0	1160
R2	29.5	1711
R3	42.5	2465
S3	24.4	1415
S4	17.1	992
S5	12.1	702

**Tabelle 10:** Photometrisch bestimmter RNA-Gehalt der verwendeten Proben beim Vergleich der Genexpression von Hämocyten nichtinfizierter (R0.3-R0.5) und infizierter (R6.1-R48.5) resistenter Schnecken

Probe	RNA-Gehalt (ng/μl)	Gesamtmenge (ng)
R0.3	25.7	1490
R0.4	31.0	1798
R0.5	24.8	1438
R6.1	17.5	1015
R6.2	15.5	899
R6.3	37.1	2152
R12.3	16.2	940
R12.4	28.3	1641
R12.5	19.8	1148
R18.1	17.5	1015
R18.2	8.8	510
R18.3	14.3	830
R24.1	18.0	1044
R24.3	24.9	1444
R24.5	24.9	1444
R36.1	12.4	719
R36.2	9.5	551
R36.3	11.1	644
R48.1	23.9	1386
R48.3	23.6	1369
R48.5	21.6	1253

**Tabelle 11:** Photometrisch bestimmter RNA-Gehalt der verwendeten Proben beim Vergleich der Genexpression von Hämocyten nichtinfizierter (S0.1-S0.3) und infizierter (S6.2-S48.4) suszeptibler Schnecken

Probe	RNA-Gehalt (ng/μl)	Gesamtmenge (ng)
S0.1	23.9	1386
S0.2	21.2	1230
S0.3	27.1	1572
S6.2	11.2	650
S6.4	11.2	650
S6.5	25.0	1450
S12.1	12.2	708
S12.3	32.4	1880
S12.4	15.9	922
S24.2	13.4	777
S24.3	13.9	806
S24.4	16.8	974
S48.1	13.2	766
S48.2	19.3	1120
S48.4	22.0	1276

## 7.2 Websites

<http://www.who.int/ctd/schisto/index.html>

<http://www.genomesize.com/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>

<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>

<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html>

<http://www.expasy.org/tools/dna.html>

<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam.html>

<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

## 7.3 Vergleich der homologen AS-Sequenzen

## 21.1: Elongationsfaktor 1-beta'

	Query	100.0%	1[ . . . . . ]92
			<b>SLIAKSSVLLDVKPWDEETDMAEMERRVRAIEQDGLVWGASKLVEVGYGIKKLTI</b> MCVVEDDKVSIEDLSEKIXGENEDLVQSVDAIAAFNKI
1	SWALL: <a href="#">EF1B_DROME</a>	80.4%	<b>ALIAKSSVLLDVKPWDEETDMKEMENNVRTIEMDGLLWGASKLVPVGYGINKLQIMCVIEDDKVSI</b> DLLQEKIE-EFEDFVQSVDAIAAFNKI
2	SWALL: <a href="#">AAD46929</a>	80.4%	<b>ALIAKSSVLLDVKPWDEETDMKEMENNVRTIEMDGLLWGASKLVPVGYGINKLQIMCVIEDDKVSI</b> DLLQEKIE-EFEDFVQSVDAIAAFNKI
3	SWALL: <a href="#">EF1B_ARTSA</a>	72.8%	<b>AIVAKSSVILDIKPWDEETDMAEMEKLVR</b> SVQMDGLVWGAAKLIPLAYGIKKLSIMCVVEDDKVSI <b>DELQEKI</b> -SEFEDFVQSVDAIAAFNKV
4	SWALL: <a href="#">EF1B_BOMMO</a>	77.2%	<b>ALIAKSSILLDVKPWDEETDMKEMENQVRTIEMEGLLWGASKLVPVGYGINKLQIMCVIEDDKVSI</b> VDLLTEKIQ-EFEDFVQSVDAIAAFNKI
5	SWALL: <a href="#">EF1D_ARTSA</a>	71.7%	<b>TVIAKSSILLDIKPWDEETDMGAMEREVRSIAMDGLI</b> WGASKLVPVAFGVKKLQISCVVEDDKVSI <b>DELVEKIEAF</b> -EDYVQSVDAIAAFNKI
6	SWALL: <a href="#">EF1X_CAEEI</a>	70.7%	<b>GPIAKSSVILDVKPWDEETDLGEMEKLVR</b> SIEMDGLVWGGAKLIPIGYGIKKLQIITVIEDLKV <b>SVDLLIEKIT</b> GD <b>FEDHVQ</b> SVDIVAFNKI
7	SWALL: <a href="#">Q9U2H9</a>	70.7%	<b>GPIAKSSVILDVKPWDEETDLGEMEKLVR</b> SIEMDGLVWGGAKLIPIGYGIKKLQIITVIEDLKV <b>SVDLLIEKIT</b> GD <b>FEDHVQ</b> SVDIVAFNKI
8	SWALL: <a href="#">Q9GRF8</a>	73.9%	<b>TVIAKSSILLDVKPWDEETDMVELEKCVRSIEMDGLVWGASKLVA</b> VGYGIKKLVINLVVEDLKV <b>STDELEEKIK</b> -DFEDYVQSVDVAAFNKI
9	SWALL: <a href="#">EF1B_HUMAN</a>	70.7%	<b>ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEECVRSIQADGLVWGS</b> SKLVPVGYGIKKLQIQCVVEDDKV <b>GTDMLEEQITAF</b> -EDYVQSM DVAAFNKI
10	SWALL: <a href="#">AAH04931</a>	70.7%	<b>ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEECVRSIQADGLVWGS</b> SKLVPVGYGIKKLQIQCVVEDDKV <b>GTDMLEEQITAF</b> -EDYVQSM DVAAFNKI
11	SWALL: <a href="#">Q9YGO1</a>	70.7%	<b>ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEECVRSIQADGLVWGS</b> SKLVPVGYGIKKLQIQCVVEDDKV <b>GTDMLEEQITAF</b> -EDYVQSM DVAAFNKI
12	SWALL: <a href="#">Q18681</a>	66.3%	<b>GPIAKSNIILLDVKPWDEETDMAEVEKAVRSVEKDGLLWGASKLV</b> PLAFGIKKLQIITCVVEDDKV <b>GTEDIEEALDAF</b> -EDLIQSVDVAAFNKV
13	SWALL: <a href="#">Q91733</a>	71.7%	<b>GVIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEECVRTVQMDGLVWGS</b> SKLVPVGYGIKKLQIQCVVEDDKV <b>GTDILEEEIT</b> -KFEDYVQSVDAIAAFNKI
14	SWALL: <a href="#">EF1D_XENLA</a>	71.7%	<b>GVIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEECVRTVQMDGLVWGS</b> SKLVPVGYGIKKLQIQCVVEDDKV <b>GTDILEEEIT</b> -KFEDYVQSVDAIAAFNKI
15	SWALL: <a href="#">EF1B_XENLA</a>	69.6%	<b>TLIAKSSILLDVKPWDEETDMGKLEELRSIQMDGLLWGS</b> SKLVPVGYGIKKLQIQCVVEDDKV <b>GTDLVEEKITAF</b> -EDFVQSM DVAAFNKI
16	SWALL: <a href="#">Q91VK2</a>	71.7%	<b>TLVAKSSILLDVKPWDEETDMAQLETCVRSIQLDGLVWGASKLV</b> PVGYGIRKLQIQCVVEDDKV <b>GTDLLEEEIT</b> -KFEEHVQSVDAIAAFNKI
17	SWALL: <a href="#">BAC32149</a>	71.7%	<b>TLVAKSSILLDVKPWDEETDMAQLETCVRSIQLDGLVWGASKLV</b> PVGYGIRKLQIQCVVEDDKV <b>GTDLLEEEIT</b> -KFEEHVQSVDAIAAFNKI
18	SWALL: <a href="#">EF1B_RABIT</a>	69.6%	<b>ALVAKSSILLDVKPWDEETDMVKLEECVRSIQADGLVWGS</b> SKLVPVGYGIKKLQIQCVVEDDKV <b>GTDMLEEQITAF</b> -EDYVQSM DVAAFNKI
19	SWALL: <a href="#">EF1D_HUMAN</a>	71.7%	<b>ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAQLEACVRSIQLDGLVWGASKLV</b> PVGYGIRKLQIQCVVEDDKV <b>GTDLLEEEIT</b> -KFEEHVQSVDAIAAFNKI
20	SWALL: <a href="#">Q60954</a>	72.8%	<b>KRHAKSSILLDVKPWDEETDMVELEKCVRSIEMDGLVWGASKLV</b> AVGYGIKKLVINLVVEDLKV <b>STDELEEKIK</b> -DFEDYVQSVDVAAFNKI

520 IIIb: Septin

Query	100.0%	1[ . . . . .]86
1 SWALL:Q9BVB3	60.5%	NIVYVVVVLFPNIWMLPVENENHCD FV K L R E M L I R T N M E D L R E M T H S K H F E L Y R R H K L E E M G F S D S E S R S L S E T Y E A K R Q E H I T M L
2 SWALL:Q9ESF7	60.5%	KVGNKLVRRARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H S R H Y E L Y R R C K L E E M G F Q D S D G D s l Q E T Y E A K R K E F L S E L
3 SWALL:Q8IX36	60.5%	KVGNKLVRRARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H S R H Y E L Y R R C K L E E M G F Q D S D G D s l Q E T Y E A K R K E F L S E L
4 SWALL:Q8CHH9	60.5%	KVGNKLVRRARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H S R H Y E L Y R R C K L E E M G F Q D S D G D s l Q E T Y E A K R K E F L S E L
5 SWALL:Y202_HUMAN	60.5%	KVGNKLVRRARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H S R H Y E L Y R R C K L E E M G F Q D S D G D s l Q E T Y E A K R K E F L S E L
6 SWALL:AAO13878	60.5%	KVGNKLVRRARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H S R H Y E L Y R R C K L E E M G F Q D S D G D s l Q E T Y E A K R K E F L S E L
7 SWALL:AAG09407	60.5%	KVGNKLVRRARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H S R H Y E L Y R R C K L E E M G F Q D S D G D s l Q E T Y E A K R K E F L S E L
8 SWALL:Q8IX37	60.5%	KVGNKLVRRARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H S R H Y E L Y R R C K L E E M G F Q D S D G D s l Q E T Y E A K R K E F L S E L
9 SWALL:Q96KC0	59.3%	KIGNKMAKARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
10 SWALL:Q96SP1	59.3%	KIGNKMAKARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
11 SWALL:Q9NVA2	59.3%	KIGNKMAKARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
12 SWALL:Q8C1B7	59.3%	KIGNKMAKARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
13 SWALL:Q9H9P7	57.0%	KVGNKMVKARQYPwvVQVENENHCD FV K L R E M L I C T N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F T d p E N k s V Q E T Y E A K R H E F H G E R
14 SWALL:Q8C2L2	58.1%	KIGNKMMRARQYPwtVQVENEAHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H A R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
15 SWALL:AAF97496	58.1%	KIGNKMMRARQYPwtVQVENEAHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
16 SWALL:AAK61492	58.1%	KIGNKMMRARQYPwtVQVENEAHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
17 SWALL:AAN76547	58.1%	KIGNKMMRARQYPwtVQVENEAHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
18 SWALL:AAH36240	58.1%	KIGNKMMRARQYPwtVQVENEAHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
19 SWALL:SEP6_HUMAN	58.1%	KIGNKMMRARQYPwtVQVENEAHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L
20 SWALL:Q8NFI2	58.1%	KIGNKMMRARQYPwtVQVENEAHCD FV K L R E M L I R V N M E D L R E Q T H T R H Y E L Y R R C K L E E M G F K d s K P F S L Q E T Y E A K R N E F L G E L

521 Ib: Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase

		1[. . . . .]88
Query	100.0%	DNTKAAVIRLGLMKMMKFTKVFLGNDKSVFFESCQVADLVATCHGGRNRLLEAVVKSMKKRGIAGVDIRLLEKEILRGQSFQGPLI
1 SWALL:	<a href="#">Q96558</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIKFVDIFFPGSRLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVGEAFIKT-----GKSIEVLEKELLNGQKLGPIIT
2 SWALL:	<a href="#">Q61368</a>	58.0% DNTKAAVMRLGLMEIIKFVNIFFPGGKKTTFEESCQVADLIATCYGGRNRKICEAFVKTGKK-----ISELEKEMLNGQKLGPPFT
3 SWALL:	<a href="#">Q02625</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMVRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVAEAFVKT-----GKSIEELEKEMLNGQKLGPPPT
4 SWALL:	<a href="#">Q02635</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVSS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
5 SWALL:	<a href="#">Q02629</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRKVSEAFVSS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
6 SWALL:	<a href="#">Q02624</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRKVSEAFVSS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
7 SWALL:	<a href="#">Q9GS33</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
8 SWALL:	<a href="#">Q76178</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
9 SWALL:	<a href="#">Q9GS37</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
10 SWALL:	<a href="#">Q9GS44</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
11 SWALL:	<a href="#">Q9GS40</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
12 SWALL:	<a href="#">Q9GS36</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
13 SWALL:	<a href="#">Q9GS43</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
14 SWALL:	<a href="#">Q95091</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
15 SWALL:	<a href="#">Q95084</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
16 SWALL:	<a href="#">Q95072</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
17 SWALL:	<a href="#">Q95074</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
18 SWALL:	<a href="#">Q95096</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
19 SWALL:	<a href="#">Q95090</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT
20 SWALL:	<a href="#">Q95089</a>	58.0% DNTKAAVIRLGLMEMIRFVDVFYPGSKLSTFFESCQVADLITTCYGGRNRRVSEAFVTS-----GKTIEELEKEMLNGQKLGPPPT

522: Phosphoribosyl-Amidotransferase

		1[ . . . . . ]81
	Query 100.0%	LRKLGVAKKFGPLVDNFGKRLVIIDDSIVRGTTMGQLVALLRKAGAKEVHVRVASPPIKYPCYMGINIPTKEELVQTSFL
1	SWALL: <a href="#">PUR1_CHICK</a> 71.6%	LRQLGVAKKFGVLSDNFKGKRIVLIDDSIVRGNTISPIIKLLRESGAKEVHIRVASPPIRFP CYMGINIPTKEELIANRPE
2	SWALL: <a href="#">Q8CIH9</a> 70.4%	LRQLGVAKKFGVLSDNFKGKRIVLIDDSIVRGNTISPIIKLLKESGAKEVHIRVASPPIKYPCFMGINIPTKEELIANKPE
3	SWALL: <a href="#">PUR1_HUMAN</a> 69.1%	LRQLGVAKKFGVLSDNFKGKRIVLVDDSDIVRGNTISPIIKLLKESGAKEVHIRVASPPIKYPCFMGINIPTKEELIANKPE
4	SWALL: <a href="#">AAH04200</a> 69.1%	LRQLGVAKKFGVLSDNFKGKRIVLVDDSDIVRGNTISPIIKLLKESGAKEVHIRVASPPIKYPCFMGINIPTKEELIANKPE
5	SWALL: <a href="#">Q9VHY4</a> 67.9%	LRQLGVAKKFGALSENVAGKRLVLIDDSIVRGNTIGPIIKLLRDAGAREVHIRIASPPLQYPCYMGINIPTREELIANKLN
6	SWALL: <a href="#">PUR1_DROME</a> 67.9%	LRQLGVAKKFGALSENVAGKRLVLIDDSIVRGNTIGPIIKLLRDAGAREVHIRIASPPLQYPCYMGINIPTREELIANKLN
7	SWALL: <a href="#">PUR1_RAT</a> 69.1%	LRQLGVAKKFGVLSDNFKGKRIVLIDDSIVRGNTISPIIKLLKESGAKEVHIRVASPPIKHP CFMGINIPTKEELIANKPE
8	SWALL: <a href="#">Q8WQR5</a> 67.9%	LRQLGVAKKFGALSENVAGKRLVLIDDSIVRGNTIGPIIKLLRDAGAREVHIRIASPPLQYPCYMGINIPTREELIANKLN
9	SWALL: <a href="#">AAF54163</a> 67.9%	LRQLGVAKKFGALSENVAGKRLVLIDDSIVRGNTIGPIIKLLRDAGAREVHIRIASPPLQYPCYMGINIPTREELIANKLN
10	SWALL: <a href="#">Q8T009</a> 67.9%	LRQLGVAKKFGALSENVAGKRLVLIDDSIVRGNTIGPIIKLLRDAGAREVHIRIASPPLQYPCYMGINIPTREELIANKLN
11	SWALL: <a href="#">Q9VRZ1</a> 65.4%	LRQLGVAKKFGALAQNVEGKRIVLVDDSDIVRGNTIGPIIKLLRDAGATEVHIRIASPPLQYPCYMGINIPTREELIANKLN
12	SWALL: <a href="#">AAF50638</a> 65.4%	LRQLGVAKKFGALAQNVEGKRIVLVDDSDIVRGNTIGPIIKLLRDAGATEVHIRIASPPLQYPCYMGINIPTREELIANKLN
13	SWALL: <a href="#">Q967S0</a> 65.4%	LRQLGVAKKFGALAQNVEGKRIVLVDDSDIVRGNTIGPIIKLLRDAGATEVHIRIASPPLQYPCYMGINIPTREELIANKLN
14	SWALL: <a href="#">Q8WQR4</a> 65.4%	LRQLGVAKKFGALAQNVEGKRIVLVDDSDIVRGNTIGPIIKLLRDAGAEVHIRIASPPLQYPCYMGINIPTREELIANKLN
15	SWALL: <a href="#">PUR1_PYRAB</a> 58.0%	GRGLKVKLKLSPVREVVNGKRVVLVDDSDIVRGTTMTRIVKMLRDAGAREVHVRIASPPIRYPCYMGIDIPTRHELIAAWRS
16	SWALL: <a href="#">Q22134</a> 55.6%	MRQNAIKMKFGVLKKKIHGQRIVLVDDSDIVRGNTMRTLKMLRDAGAKEVHLRIASPPVKFP CFMGINIPTTKELIAAEKT
17	SWALL: <a href="#">PUR1_PYRHO</a> 55.6%	GREIKVRLKLSPVKEVIKGRIVLVDDSDIVRGTTMKNIVKMLRDAGAREVHVRIASPPIRYPCYMGIDIPTRHELIAAWKS
18	SWALL: <a href="#">Q9UX25</a> 55.6%	KRNEVLEEKFGVAVDAVRGKRIVLIDDSIVRGNTMKRIITMLRKAGAKEIHVRIGSPMIKYP CYMGIDFPKREELIAHNKS
19	SWALL: <a href="#">Q8U4D4</a> 54.3%	GRELKVKLKLSPVREVIEGKRVVLVDDSDIVRGTTIKRIVKMLRDAGAEVHVRISSPPIRYPCYMGIDIPTRHELIAAWRT
20	SWALL: <a href="#">Q8RBK4</a> 56.8%	DRETGVRIKLNVLKELVQGKRIVLIDDSIVRGTTMKRLVSLKNGGAKEVHVRISSPPVKYS CYFGIDTPTKKELIAARMS

## 534 IIb: Acetatkinase

	Query	100.0%	1[ . . . . . ]78
			TDMRDVEDGMMKGDKNCILAYDMYSYRVKSYIGAYSAIMNGLDAIVFTAGVGENSSIVRSKVCENMDYLGIKIDEQEN
1	SWALL: <a href="#">ACKA_THEMA</a>	57.7%	SDMRDIEEAALKGDEWCKLVLEIYDYRIAKYIGAYAAAMNGVDAIVFTAGVGENSPITREDVCSYLEFLGVKLDKQKN
2	SWALL: <a href="#">ACKA_CLOAB</a>	51.3%	SDMRDIKKgyVDKDPKAMLAYSVFNYKIKQFIGSYTAVMNGLDCLVFTGGIGENSFENRREICKNMDYLGIKIDDKKN
3	SWALL: <a href="#">ACKA_CLOTM</a>	51.3%	SDFRDVQDAAEKGDRAQLALDIFCYGVRKYIGKYIAVLNGVDVAVFTAGIGENNAYIRREVLKMDFFGIKIDLDKN
4	SWALL: <a href="#">ACKA_METTE</a>	46.2%	NDFRDLEEAASKGNRKAELALEIFAYKVKKFIGEYSAVLNGADAVVFTAGIGENSASIRKRILTGLDGIGIKIDDEKN
5	SWALL: <a href="#">ACK2_CLOPE</a>	53.8%	SDFRDVEAAADKGSKEAQIALDLFRNSVKKYIGAYIAEMNGCDVIVFTAGVGENSIIEERGAICRDLEFLGIELDEERN
6	SWALL: <a href="#">AAO35808</a>	46.2%	SDFRDIEEAAEEGNDRAKLALDVFHVKVRRFIGSYAAAMGGVDCVVFTAGLGENSAESREEICKNLEFLGIKINEKKN
7	SWALL: <a href="#">Q9AHI3</a>	46.2%	SDMRDIEAGIQAHNPDAVLAYNIFIDRIKKFIGQYLAVLNGADAIIVFTAGMGENAPLMRNDVVEGLSWFGIELDPQKN
8	SWALL: <a href="#">Q8X269</a>	46.2%	NDFRDLEEAASKGNQKAELALEIFAYKIKKVIGEYIAVLNGVDVAVFTAGIGENSATIRKRILADLDGIGIKIDEEKN
9	SWALL: <a href="#">Q9AHI7</a>	46.2%	SDMRDIEAGIQAHNPDAVLAYNIFIDRIKKFIGQYLAVLNGADAIIVFTAGMGENAPLMRNDVVEGLSWFGIELDLQKN
10	SWALL: <a href="#">ACKA_FUSNN</a>	48.7%	SDCRDLENAVVEGDERAILAESVSMHRLRSYIGAYAAIMGGVDAICFTGGIGENSSMTRKALEGLEFLGVELDKEIN
11	SWALL: <a href="#">ACKA_METMA</a>	46.2%	NDFRDLEEAASKGNQKAELALEIFAYKIKKVIGEYIAVLNGVDVAVFTAGIGENSASIRKRILADLDGIGIKIDEEKN
12	SWALL: <a href="#">ACKA_METAC</a>	46.2%	NDFRDLEEAASKGNQRAELALEIFAYKIKKVIGEYSAVLNGADAVVFTAGIGENSASIRKRILSGLDGLGIEIDEEKN
13	SWALL: <a href="#">Q8E231</a>	44.9%	SDMRDIEAGLQSKDPNAVLAYNVFIIDRIKKFIGQYLAVLNGADAIIFTAGMGENAPLMRQDVIAGLSWFGIELDPEKN
14	SWALL: <a href="#">Q8E7I7</a>	44.9%	SDMRDIEAGLQSKDPNAVLAYNVFIIDRIKKFIGQYLAVLNGADAIIFTAGMGENAPLMRQDVIAGLSWFGIELDPEKN
15	SWALL: <a href="#">Q8DS57</a>	48.7%	NDMREIEAATAAGNKNATLAYNMFIDRIIKHIGAYAAVMNGVDAIVFTAGIGENDAHIRSEIMKHFDWLGADIVTEKN
16	SWALL: <a href="#">ACK2_LACLA</a>	46.2%	SDMRDLSEAVAKGNPKAILAYEMYVDRLLKKFIAQYFGVLNGADALIFTAGVGENDTAVRTDVVNGLSWFGMEIDESKN
17	SWALL: <a href="#">ACKA_CAMJE</a>	47.4%	NDFRDIEREIEQGNDKARLALDMFCYRLVKYIGSYFAVLPKTDAIIFTGGIGENDSLVRQKVCERLAHLGIELDFELN
18	SWALL: <a href="#">ACKA_CLOTS</a>	44.9%	SDFRDLEDAAFkgDKRAQLALNVFAYRVKKTIGSYAAAMGGVDVIVFTAGIGENGPEIREFILDGLEFLGFKLDKEKN
19	SWALL: <a href="#">PDUW_SALTY</a>	44.9%	SDYRDVEQAANTGNRQAKLALTLFAERIRATIGSYIMQMGLDALVFTGGIGENSARARSAVCHNLQFLGLAVDEEKN
20	SWALL: <a href="#">Q8Z5K8</a>	44.9%	SDYRDVEQAANTGNRQAKLALTLFAERIRATIGGYIMQMGLDALVFTGGIGENSARARSAVCHNLQFLGLAVDEEKN

Catalase:

			1[ . . . . . ]89
	Query	100.0%	<b>I</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>C</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>K</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>T</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>X</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>R</b> <b>V</b> <b>C</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>K</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>X</b> <b>T</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>W</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>D</b>
1	SWALL: <a href="#">CATA_BACFR</a>	59.6%	<b>L</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>K</b> <b>R</b> <b>I</b> <b>W</b> <b>V</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>T</b> <b>M</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>Q</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>L</b> <b>M</b> <b>T</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>I</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>Q</b>
2	SWALL: <a href="#">Q9RJK9</a>	58.4%	<b>I</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>S</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
3	SWALL: <a href="#">P77948</a>	58.4%	<b>I</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>S</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
4	SWALL: <a href="#">CATA_PSEAE</a>	53.9%	<b>I</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>Q</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>R</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>M</b> <b>Y</b> <b>V</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>Y</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
5	SWALL: <a href="#">Q8PU00</a>	56.2%	<b>I</b> <b>N</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>V</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>Q</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>V</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>M</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>G</b> <b>M</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>M</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>T</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>S</b> <b>M</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>M</b> <b>W</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>M</b>
6	SWALL: <a href="#">CAB93976</a>	55.1%	<b>I</b> <b>N</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>C</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>M</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>R</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>Y</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>M</b>
7	SWALL: <a href="#">CATA_PROMI</a>	55.1%	<b>I</b> <b>N</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>C</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>M</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>R</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>Y</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>M</b>
8	SWALL: <a href="#">CAB93973</a>	55.1%	<b>I</b> <b>N</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>C</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>M</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>R</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>Y</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>M</b>
9	SWALL: <a href="#">CATA_NEIGO</a>	58.4%	<b>W</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>T</b> <b>M</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>Y</b> <b>H</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
10	SWALL: <a href="#">CATA_VIBFI</a>	56.2%	<b>I</b> <b>N</b> <b>S</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>S</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>I</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>Q</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>T</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>Y</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
11	SWALL: <a href="#">BAC20190</a>	56.2%	<b>I</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>V</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>L</b> <b>H</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>I</b> <b>G</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>R</b> <b>W</b> <b>T</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>T</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>Y</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
12	SWALL: <a href="#">Q9JRF5</a>	57.3%	<b>W</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>T</b> <b>M</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>Y</b> <b>H</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
13	SWALL: <a href="#">Q9KW19</a>	56.2%	<b>Y</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>K</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>M</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>T</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>N</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>Y</b> <b>H</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
14	SWALL: <a href="#">Q9L4S1</a>	57.3%	<b>Y</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>T</b> <b>M</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>T</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>Y</b> <b>H</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
15	SWALL: <a href="#">Q8NWX5</a>	57.3%	<b>Y</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>T</b> <b>M</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>T</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>Y</b> <b>H</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
16	SWALL: <a href="#">Q99UE2</a>	57.3%	<b>Y</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>T</b> <b>M</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>T</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>Y</b> <b>H</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
17	SWALL: <a href="#">AAN49058</a>	53.9%	<b>W</b> <b>N</b> <b>S</b> <b>K</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>S</b> <b>M</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>S</b> <b>M</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>A</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>C</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>Y</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
18	SWALL: <a href="#">BAC55928</a>	53.9%	<b>I</b> <b>N</b> <b>S</b> <b>V</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>L</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>H</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>T</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>V</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>Q</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>Y</b> <b>H</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
19	SWALL: <a href="#">Q8ZGS4</a>	53.9%	<b>N</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>F</b> <b>H</b> <b>F</b> <b>R</b> <b>C</b> <b>Q</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>M</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>I</b> <b>G</b> <b>S</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>R</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>P</b> <b>E</b> <b>H</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>T</b> <b>P</b> <b>Y</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>W</b> <b>P</b> <b>H</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>
20	SWALL: <a href="#">CATA_ONCVE</a>	57.3%	<b>I</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>G</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>H</b> <b>Y</b> <b>K</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>N</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>A</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>F</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>R</b> <b>V</b> <b>C</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>I</b> <b>M</b> <b>T</b> <b>E</b> <b>A</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>A</b> <b>H</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>V</b> <b>T</b> <b>K</b> <b>T</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>I</b>

Superoxid-Dismutase:

		3[	. . . . .	82
	Query	100.0%	<b>K</b> MV <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>S</b> P <b>G</b> S <b>A</b> A <b>G</b> I <b>T</b> G <b>T</b> I <b>T</b> F <b>T</b> O <b>E</b> T <b>S</b> G <b>D</b> C <b>T</b> L <b>V</b> S <b>G</b> O <b>V</b> K <b>L</b> A <b>P</b> G <b>K</b> H <b>G</b> F <b>H</b> I <b>H</b> O <b>F</b> G <b>D</b> <b>Y</b> T <b>N</b> S <b>A</b> G <b>A</b> H <b>F</b> N <b>P</b> K <b>N</b> K <b>S</b> H <b>G</b> G <b>P</b> L <b>D</b> O <b>E</b> R <b>H</b>	
1	SWALL: <a href="#">Q8MUT8</a>	78.4%	- <b>M</b> V <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>A</b> A <b>G</b> S <b>S</b> T <b>S</b> I <b>T</b> G <b>T</b> I <b>T</b> F <b>T</b> O <b>E</b> G <b>P</b> A <b>D</b> S <b>T</b> I <b>V</b> T <b>G</b> E <b>V</b> K <b>L</b> A <b>P</b> G <b>K</b> H <b>G</b> F <b>H</b> I <b>H</b> O <b>F</b> G <b>D</b> <b>Y</b> T <b>N</b> S <b>A</b> G <b>G</b> H <b>F</b> N <b>P</b> L <b>G</b> A <b>T</b> H <b>G</b> G <b>P</b> D <b>D</b> A <b>V</b> R <b>H</b>	
2	SWALL: <a href="#">Q8MUI5</a>	23.4%	<b>M</b> P <b>F</b> <b>K</b> A <b>I</b> C <b>V</b> I <b>R</b> --- <b>G</b> E <b>N</b> V <b>T</b> G <b>T</b> <b>V</b> I <b>F</b> K <b>O</b> N <b>T</b> E <b>N</b> D <b>K</b> T <b>T</b> I <b>T</b> G <b>E</b> I <b>K</b> L <b>T</b> P <b>G</b> K <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>E</b> W <b>G</b> D <b>N</b> S <b>M</b> I <b>S</b> A <b>G</b> A <b>H</b> <b>Y</b> N <b>P</b> F <b>G</b> K <b>T</b> H <b>G</b> G <b>P</b> T <b>D</b> T <b>V</b> R	
3	SWALL: <a href="#">SODC_MOUSE</a>	61.2%	- <b>A</b> M <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> D <b>G</b> P- <b>V</b> O <b>G</b> T <b>I</b> H <b>F</b> E <b>Q</b> K <b>A</b> S <b>G</b> E <b>P</b> V <b>V</b> L <b>S</b> G <b>O</b> I <b>T</b> G <b>L</b> T <b>E</b> G <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>O</b> <b>Y</b> G <b>D</b> N <b>T</b> <b>Q</b> S <b>A</b> G <b>P</b> H <b>F</b> N <b>P</b> H <b>S</b> K <b>K</b> H <b>G</b> G <b>P</b> A <b>D</b> E <b>E</b> R <b>H</b>	
4	SWALL: <a href="#">AAH02066</a>	27.0%	<b>M</b> A <b>M</b> <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> D <b>G</b> P- <b>V</b> O <b>G</b> T <b>I</b> H <b>F</b> E <b>Q</b> K <b>A</b> S <b>G</b> E <b>P</b> V <b>V</b> L <b>S</b> G <b>O</b> I <b>T</b> G <b>L</b> T <b>E</b> G <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>O</b> <b>Y</b> G <b>D</b> N <b>T</b> <b>Q</b> T <b>S</b> A <b>G</b> P <b>H</b> F <b>N</b> P <b>H</b> S <b>K</b> K <b>H</b> G <b>G</b> P <b>A</b> D <b>E</b> E <b>R</b>	
5	SWALL: <a href="#">BAB32154</a>	27.0%	<b>M</b> A <b>M</b> <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> D <b>G</b> P- <b>V</b> O <b>G</b> T <b>I</b> H <b>F</b> E <b>Q</b> K <b>A</b> S <b>G</b> E <b>P</b> V <b>V</b> L <b>S</b> G <b>O</b> I <b>T</b> G <b>L</b> T <b>E</b> G <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>O</b> <b>Y</b> G <b>D</b> N <b>T</b> <b>Q</b> T <b>S</b> A <b>G</b> P <b>H</b> F <b>N</b> P <b>H</b> S <b>K</b> K <b>H</b> G <b>G</b> P <b>A</b> D <b>E</b> E <b>R</b>	
6	SWALL: <a href="#">BAC36730</a>	27.0%	<b>M</b> A <b>M</b> <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> D <b>G</b> P- <b>V</b> O <b>G</b> T <b>I</b> H <b>F</b> E <b>Q</b> K <b>A</b> S <b>G</b> E <b>P</b> V <b>V</b> L <b>S</b> G <b>O</b> I <b>T</b> G <b>L</b> T <b>E</b> G <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>O</b> <b>Y</b> G <b>D</b> N <b>T</b> <b>Q</b> T <b>S</b> A <b>G</b> P <b>H</b> F <b>N</b> P <b>H</b> S <b>K</b> K <b>H</b> G <b>G</b> P <b>A</b> D <b>E</b> E <b>R</b>	
7	SWALL: <a href="#">AAA40996</a>	26.0%	-- <b>M</b> <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> D <b>G</b> P- <b>V</b> O <b>G</b> <b>V</b> I <b>H</b> F <b>E</b> <b>Q</b> K <b>A</b> S <b>G</b> E <b>P</b> V <b>V</b> S <b>G</b> O <b>I</b> T <b>G</b> L <b>T</b> E <b>G</b> E <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>O</b> <b>Y</b> G <b>D</b> N <b>T</b> <b>Q</b> A <b>G</b> P <b>H</b> F <b>N</b> P <b>H</b> S <b>K</b> K <b>H</b> G <b>G</b> P <b>A</b> D <b>E</b> E <b>R</b> H <b>V</b>	
8	SWALL: <a href="#">SODC_RAT</a>	60.4%	- <b>A</b> M <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> D <b>G</b> P- <b>V</b> O <b>G</b> <b>V</b> I <b>H</b> F <b>E</b> <b>Q</b> K <b>A</b> S <b>G</b> E <b>P</b> V <b>V</b> S <b>G</b> O <b>I</b> T <b>G</b> L <b>T</b> E <b>G</b> E <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>O</b> <b>Y</b> G <b>D</b> N <b>T</b> <b>Q</b> T <b>A</b> G <b>P</b> H <b>F</b> N <b>P</b> H <b>S</b> K <b>K</b> H <b>G</b> G <b>P</b> A <b>D</b> E <b>E</b> R <b>H</b>	
9	SWALL: <a href="#">SODC_BRARE</a>	27.0%	<b>M</b> V <b>N</b> <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> T <b>G</b> E- <b>V</b> T <b>G</b> T <b>V</b> <b>Y</b> F <b>N</b> O <b>E</b> G <b>E</b> K <b>K</b> P <b>V</b> K <b>V</b> T <b>G</b> E <b>I</b> T <b>G</b> L <b>T</b> P <b>G</b> K <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>A</b> F <b>G</b> D <b>N</b> T <b>N</b> I <b>S</b> A <b>G</b> P <b>H</b> F <b>N</b> P <b>H</b> D <b>K</b> T <b>H</b> G <b>G</b> P <b>T</b> D <b>S</b> V <b>R</b>	
10	SWALL: <a href="#">SODC_BRUPA</a>	21.9%	--- <b>M</b> S <b>A</b> N <b>R</b> I <b>A</b> V <b>L</b> R <b>G</b> D <b>N</b> V <b>S</b> G <b>I</b> I <b>R</b> F <b>K</b> O <b>E</b> K <b>E</b> S <b>P</b> T <b>T</b> I <b>S</b> G <b>E</b> I <b>K</b> L <b>T</b> P <b>L</b> H <b>G</b> F <b>H</b> V <b>H</b> O <b>Y</b> G <b>D</b> T <b>T</b> N <b>G</b> P <b>H</b> F <b>N</b> P <b>Y</b> N <b>K</b> T <b>H</b> G <b>G</b> P <b>T</b> D <b>E</b> M <b>R</b> H <b>V</b> G	
11	SWALL: <a href="#">SODC_PRIGL</a>	27.5%	-- <b>M</b> <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> T <b>G</b> E- <b>V</b> T <b>G</b> T <b>V</b> L <b>F</b> E <b>Q</b> A <b>A</b> D <b>G</b> P <b>V</b> T <b>L</b> - <b>K</b> S <b>I</b> T <b>G</b> L <b>T</b> P <b>G</b> K <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>A</b> F <b>G</b> D <b>N</b> T <b>N</b> A <b>G</b> P <b>H</b> <b>Y</b> N <b>P</b> F <b>S</b> K <b>N</b> H <b>G</b> G <b>P</b> D <b>D</b> E <b>E</b> R <b>H</b> V	
12	SWALL: <a href="#">Q9U993</a>	24.8%	<b>M</b> S <b>T</b> <b>N</b> A <b>I</b> A <b>V</b> L <b>R</b> G <b>N</b> T--- <b>V</b> S <b>G</b> <b>V</b> I <b>R</b> F <b>K</b> O <b>D</b> K <b>E</b> S <b>P</b> T <b>I</b> I <b>N</b> G <b>E</b> I <b>K</b> L <b>T</b> P <b>L</b> H <b>G</b> F <b>H</b> I <b>H</b> O <b>Y</b> G <b>D</b> T <b>T</b> N <b>I</b> S <b>A</b> G <b>P</b> H <b>F</b> N <b>P</b> H <b>N</b> K <b>T</b> H <b>G</b> G <b>P</b> T <b>D</b> E <b>I</b> R	
13	SWALL: <a href="#">Q8I807</a>	27.0%	<b>M</b> V <b>V</b> <b>K</b> A <b>V</b> C <b>C</b> L--- <b>I</b> G <b>E</b> V <b>K</b> G <b>T</b> I <b>S</b> F <b>S</b> O <b>E</b> G <b>D</b> G <b>K</b> P <b>C</b> Q <b>I</b> T <b>G</b> E <b>V</b> T <b>G</b> L <b>T</b> E <b>G</b> K <b>H</b> G <b>F</b> H <b>I</b> H <b>O</b> <b>Y</b> G <b>D</b> N <b>T</b> <b>N</b> T <b>S</b> A <b>G</b> S <b>H</b> F <b>N</b> P <b>F</b> g <b>k</b> T <b>H</b> G <b>G</b> P <b>D</b> D <b>E</b> R	
14	SWALL: <a href="#">O81352</a>	61.9%	- <b>M</b> A <b>K</b> G <b>V</b> A <b>V</b> L <b>N</b> -- <b>S</b> S <b>E</b> G <b>V</b> K <b>G</b> T <b>I</b> F <b>F</b> T <b>O</b> E <b>G</b> D <b>G</b> - <b>A</b> T <b>T</b> V <b>T</b> G <b>T</b> V <b>S</b> L <b>K</b> P <b>G</b> P <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>A</b> L <b>G</b> D <b>T</b> <b>N</b> S <b>T</b> G <b>P</b> H <b>F</b> N <b>P</b> D <b>G</b> K <b>T</b> H <b>G</b> A <b>P</b> E <b>D</b> A <b>N</b> R <b>H</b>	
15	SWALL: <a href="#">Q95ME5</a>	26.6%	--- <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> D <b>G</b> P- <b>V</b> O <b>G</b> T <b>I</b> <b>Y</b> F-- <b>E</b> L <b>K</b> G <b>E</b> K <b>L</b> V <b>T</b> G <b>T</b> I <b>K</b> L <b>A</b> E <b>G</b> D <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>O</b> <b>F</b> G <b>D</b> N <b>T</b> A <b>G</b> P <b>H</b> F <b>N</b> P <b>E</b> S <b>K</b> K <b>H</b> G <b>G</b> P <b>K</b> D <b>Q</b> E <b>R</b> H <b>V</b> G	
16	SWALL: <a href="#">SODC_PIG</a>	61.2%	- <b>A</b> T <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> D <b>G</b> P- <b>V</b> O <b>G</b> T <b>I</b> <b>Y</b> F-- <b>E</b> L <b>K</b> G <b>E</b> K <b>L</b> V <b>T</b> G <b>T</b> I <b>K</b> L <b>A</b> E <b>G</b> D <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>O</b> <b>F</b> G <b>D</b> N <b>T</b> <b>T</b> S <b>A</b> G <b>P</b> H <b>F</b> N <b>P</b> E <b>S</b> K <b>K</b> H <b>G</b> G <b>P</b> K <b>D</b> <b>Q</b> E <b>R</b> H	
17	SWALL: <a href="#">SOD1_MESCR</a>	61.9%	- <b>M</b> V <b>K</b> A <b>V</b> V <b>V</b> L <b>S</b> -- <b>S</b> S <b>E</b> G <b>V</b> S <b>G</b> T <b>V</b> O <b>F</b> T <b>O</b> E <b>G</b> S <b>G</b> P <b>T</b> - <b>V</b> T <b>G</b> N <b>V</b> S <b>G</b> L <b>R</b> P <b>L</b> H <b>G</b> F <b>H</b> V <b>H</b> A <b>L</b> G <b>D</b> T <b>T</b> N <b>S</b> T <b>G</b> P <b>H</b> F <b>N</b> P <b>A</b> G <b>K</b> E <b>H</b> G <b>A</b> P <b>E</b> D <b>E</b> T <b>R</b> H	
18	SWALL: <a href="#">Q8QHI0</a>	24.8%	<b>M</b> A <b>M</b> <b>K</b> A <b>V</b> C <b>V</b> L <b>K</b> - <b>G</b> T <b>G</b> E- <b>V</b> T <b>G</b> T <b>V</b> F <b>F</b> E <b>Q</b> e <b>a</b> D <b>G</b> P <b>V</b> K <b>L</b> I- <b>G</b> E <b>I</b> S <b>L</b> A <b>P</b> E <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>A</b> <b>Y</b> G <b>D</b> N <b>T</b> <b>C</b> M <b>S</b> A <b>G</b> P <b>H</b> F <b>N</b> P <b>H</b> N <b>Q</b> T <b>H</b> G <b>G</b> P <b>T</b> D <b>A</b> V <b>R</b>	
19	SWALL: <a href="#">Q9Y0A5</a>	24.8%	<b>M</b> S <b>T</b> <b>N</b> A <b>I</b> A <b>V</b> L <b>R</b> G <b>N</b> T--- <b>V</b> S <b>G</b> <b>V</b> I <b>R</b> F <b>K</b> O <b>D</b> K <b>E</b> S <b>P</b> T <b>I</b> I <b>N</b> G <b>E</b> I <b>K</b> L <b>T</b> P <b>L</b> H <b>G</b> F <b>H</b> I <b>H</b> O <b>Y</b> G <b>D</b> T <b>T</b> N <b>I</b> S <b>A</b> G <b>P</b> H <b>F</b> N <b>P</b> H <b>N</b> K <b>T</b> H <b>G</b> G <b>P</b> T <b>D</b> E <b>I</b> R	
20	SWALL: <a href="#">Q9SW98</a>	61.2%	- <b>M</b> V <b>K</b> A <b>E</b> A <b>V</b> L <b>T</b> -- <b>S</b> S <b>E</b> G <b>V</b> S <b>G</b> T <b>I</b> F <b>F</b> T <b>O</b> E <b>G</b> D <b>G</b> P <b>T</b> - <b>V</b> T <b>G</b> N <b>I</b> S <b>L</b> K <b>P</b> L <b>H</b> G <b>F</b> H <b>V</b> H <b>A</b> L <b>G</b> D <b>T</b> <b>N</b> S <b>T</b> G <b>P</b> H <b>F</b> N <b>P</b> S <b>G</b> K <b>D</b> H <b>G</b> A <b>P</b> E <b>D</b> E <b>I</b> R <b>H</b>	
		83	. . . . .	]139
	Query	100.0%	<b>A</b> G <b>D</b> L <b>G</b> N <b>I</b> I <b>A</b> G <b>D</b> D <b>G</b> T <b>A</b> S <b>I</b> E <b>F</b> K <b>D</b> S <b>H</b> I <b>P</b> L <b>I</b> G <b>E</b> N <b>S</b> I <b>I</b> G <b>R</b> V <b>H</b> E <b>K</b> E <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>N</b> D <b>E</b> S <b>L</b> K <b>T</b> G <b>T</b> G	
1	SWALL: <a href="#">Q8MUT8</a>	78.4%	<b>A</b> G <b>D</b> L <b>G</b> N <b>I</b> I <b>A</b> G <b>D</b> D <b>G</b> V <b>A</b> K <b>V</b> E <b>I</b> K <b>D</b> P <b>Q</b> V <b>P</b> L <b>I</b> G <b>E</b> N <b>S</b> I <b>V</b> G <b>R</b> V <b>H</b> E <b>K</b> E <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>N</b> E <b>S</b> L <b>K</b> T <b>G</b> --	
2	SWALL: <a href="#">Q8MUI5</a>	23.4%	<b>H</b> V <b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> I <b>V</b> A <b>G</b> S <b>D</b> G <b>V</b> A <b>K</b> I <b>D</b> I <b>V</b> D <b>D</b> Q <b>I</b> K <b>L</b> T <b>G</b> E <b>H</b> S <b>I</b> I <b>G</b> R <b>V</b> V <b>H</b> I <b>Q</b> E <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>D</b> D <b>E</b> S <b>L</b> K <b>T</b> G	
3	SWALL: <a href="#">SODC_MOUSE</a>	61.2%	<b>V</b> G <b>D</b> L <b>G</b> N <b>V</b> T <b>A</b> G <b>K</b> D <b>G</b> V <b>A</b> N <b>V</b> S <b>I</b> E <b>D</b> R <b>V</b> I <b>S</b> L <b>S</b> G <b>E</b> H <b>S</b> I <b>I</b> G <b>R</b> V <b>H</b> E <b>K</b> Q <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>N</b> E <b>S</b> T <b>K</b> T <b>G</b> --	
4	SWALL: <a href="#">AAH02066</a>	27.0%	<b>H</b> V <b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> V <b>T</b> A <b>G</b> K <b>D</b> G <b>V</b> A <b>N</b> V <b>S</b> I <b>E</b> D <b>R</b> V <b>I</b> S <b>L</b> S <b>G</b> E <b>H</b> S <b>I</b> I <b>G</b> R <b>V</b> V <b>H</b> E <b>K</b> Q <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>N</b> E <b>S</b> T <b>K</b> T <b>G</b>	
5	SWALL: <a href="#">BAB32154</a>	27.0%	<b>H</b> V <b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> V <b>T</b> A <b>G</b> K <b>D</b> G <b>V</b> A <b>N</b> V <b>S</b> I <b>E</b> D <b>R</b> V <b>I</b> S <b>L</b> S <b>G</b> E <b>H</b> S <b>I</b> I <b>G</b> R <b>V</b> V <b>H</b> E <b>K</b> Q <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>N</b> E <b>S</b> T <b>K</b> T <b>G</b>	
6	SWALL: <a href="#">BAC36730</a>	27.0%	<b>H</b> V <b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> V <b>T</b> A <b>G</b> K <b>D</b> G <b>V</b> A <b>N</b> V <b>S</b> I <b>E</b> D <b>R</b> V <b>I</b> S <b>L</b> S <b>G</b> E <b>H</b> S <b>I</b> I <b>G</b> R <b>V</b> V <b>H</b> E <b>K</b> Q <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>N</b> E <b>S</b> T <b>K</b> T <b>G</b>	
7	SWALL: <a href="#">AAA40996</a>	26.0%	<b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> V <b>A</b> A <b>G</b> K <b>D</b> G <b>V</b> A <b>N</b> V <b>S</b> I <b>E</b> D <b>R</b> V <b>I</b> S <b>L</b> S <b>G</b> E <b>H</b> S <b>I</b> I <b>G</b> R <b>H</b> E <b>K</b> Q <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>N</b> E <b>S</b> T <b>K</b> T <b>G</b> ----	
8	SWALL: <a href="#">SODC_RAT</a>	60.4%	<b>V</b> G <b>D</b> L <b>G</b> N <b>V</b> A <b>A</b> G <b>K</b> D <b>G</b> V <b>A</b> N <b>V</b> S <b>I</b> E <b>D</b> R <b>V</b> I <b>S</b> L <b>S</b> G <b>E</b> H <b>S</b> I <b>I</b> G <b>R</b> V <b>H</b> E <b>K</b> Q <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>N</b> E <b>S</b> T <b>K</b> T <b>G</b> --	
9	SWALL: <a href="#">SODC_BRARE</a>	27.0%	<b>H</b> V <b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> V <b>T</b> A <b>D</b> A <b>S</b> G <b>V</b> A <b>K</b> I <b>E</b> I <b>E</b> D <b>A</b> M <b>L</b> T <b>L</b> S <b>G</b> H <b>S</b> I <b>I</b> G <b>R</b> V <b>I</b> H <b>E</b> K <b>E</b> D <b>D</b> L <b>G</b> K <b>G</b> N <b>E</b> S <b>L</b> K <b>T</b> G	
10	SWALL: <a href="#">SODC_BRUPA</a>	21.9%	<b>D</b> L <b>G</b> N <b>I</b> V <b>A</b> G <b>A</b> D <b>G</b> T <b>A</b> H <b>I</b> D <b>I</b> S <b>D</b> K <b>H</b> V <b>Q</b> L <b>L</b> G <b>P</b> N <b>S</b> I <b>I</b> G <b>R</b> A <b>D</b> Q <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> g <b>d</b> e <b>S</b> L <b>K</b> T <b>G</b> -----	
11	SWALL: <a href="#">SODC_PRIGL</a>	27.5%	<b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> V <b>E</b> A <b>N</b> G <b>N</b> G <b>V</b> A <b>E</b> F <b>E</b> I <b>K</b> D <b>R</b> Q <b>L</b> H <b>L</b> S <b>G</b> E <b>R</b> S <b>I</b> I <b>G</b> R <b>H</b> E <b>K</b> E <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>D</b> E <b>E</b> S <b>L</b> R <b>T</b> G	
12	SWALL: <a href="#">Q9U993</a>	24.8%	<b>H</b> V <b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> I <b>V</b> A <b>G</b> A <b>D</b> G <b>T</b> A <b>H</b> I <b>D</b> I <b>S</b> D <b>K</b> Q <b>V</b> Q <b>L</b> L <b>G</b> P <b>N</b> S <b>I</b> I <b>G</b> R <b>V</b> V <b>H</b> A <b>D</b> E <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>V</b> g <b>d</b> e <b>S</b> L <b>K</b> T <b>G</b>	
13	SWALL: <a href="#">Q8I807</a>	27.0%	<b>H</b> V <b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> I <b>V</b> A <b>G</b> K <b>D</b> G <b>V</b> A <b>K</b> V <b>D</b> M <b>S</b> D <b>S</b> Q <b>V</b> T <b>L</b> L <b>G</b> E <b>H</b> S <b>V</b> R <b>S</b> V <b>V</b> V <b>H</b> V <b>G</b> E <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>H</b> D <b>D</b> S <b>L</b> T <b>T</b> G	
14	SWALL: <a href="#">O81352</a>	61.9%	<b>A</b> G <b>D</b> L <b>G</b> N <b>I</b> I <b>V</b> G <b>D</b> D <b>G</b> T <b>A</b> T <b>F</b> T <b>I</b> T <b>D</b> S <b>Q</b> I <b>P</b> L <b>T</b> G <b>P</b> N <b>S</b> I <b>V</b> G <b>R</b> V <b>H</b> A <b>D</b> R <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>H</b> E <b>L</b> S <b>L</b> S <b>T</b> G	
15	SWALL: <a href="#">Q95ME5</a>	26.6%	<b>D</b> L <b>G</b> N <b>V</b> T <b>A</b> G <b>K</b> D <b>G</b> V <b>A</b> T <b>V</b> <b>Y</b> I <b>E</b> D <b>S</b> V <b>I</b> A <b>L</b> S <b>G</b> D <b>H</b> S <b>I</b> I <b>G</b> H <b>E</b> K <b>P</b> D <b>D</b> L <b>G</b> R <b>G</b> G <b>N</b> E <b>S</b> T <b>K</b> T <b>G</b> -----	
16	SWALL: <a href="#">SODC_PIG</a>	61.2%	<b>V</b> G <b>D</b> L <b>G</b> N <b>V</b> T <b>A</b> G <b>K</b> D <b>G</b> V <b>A</b> T <b>V</b> <b>Y</b> I <b>E</b> D <b>S</b> V <b>I</b> A <b>L</b> S <b>G</b> D <b>H</b> S <b>I</b> I <b>G</b> V <b>V</b> H <b>E</b> K <b>P</b> D <b>D</b> L <b>G</b> R <b>G</b> G <b>N</b> E <b>S</b> T <b>K</b> T <b>G</b> --	
17	SWALL: <a href="#">SOD1_MESCR</a>	61.9%	<b>A</b> G <b>D</b> L <b>G</b> N <b>I</b> T <b>V</b> G <b>D</b> D <b>G</b> T <b>A</b> T <b>F</b> T <b>I</b> I <b>D</b> S <b>Q</b> I <b>P</b> L <b>T</b> G <b>P</b> N <b>S</b> I <b>V</b> G <b>R</b> V <b>H</b> A <b>D</b> P <b>D</b> D <b>L</b> G <b>R</b> G <b>G</b> H <b>E</b> L <b>S</b> K <b>A</b> T <b>G</b> --	
18	SWALL: <a href="#">Q8QHI0</a>	24.8%	<b>H</b> V <b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> V <b>T</b> A <b>G</b> A <b>D</b> N <b>V</b> A <b>K</b> I <b>N</b> I <b>Q</b> D <b>K</b> M <b>L</b> T <b>L</b> T <b>G</b> P <b>D</b> S <b>I</b> I <b>G</b> M <b>V</b> I <b>H</b> E <b>K</b> A <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>N</b> E <b>S</b> L <b>K</b> T <b>G</b>	
19	SWALL: <a href="#">Q9Y0A5</a>	24.8%	<b>H</b> V <b>G</b> D <b>L</b> G <b>N</b> I <b>V</b> A <b>G</b> A <b>D</b> G <b>T</b> A <b>H</b> I <b>D</b> I <b>P</b> N <b>K</b> Q <b>V</b> Q <b>L</b> L <b>G</b> P <b>N</b> S <b>I</b> I <b>G</b> R <b>V</b> V <b>H</b> A <b>D</b> E <b>D</b> D <b>L</b> G <b>K</b> G <b>V</b> g <b>d</b> e <b>S</b> L <b>K</b> T <b>G</b>	
20	SWALL: <a href="#">Q9SW98</a>	61.2%	<b>A</b> G <b>D</b> L <b>G</b> N <b>V</b> T <b>A</b> G <b>D</b> D <b>G</b> T <b>A</b> S <b>F</b> T <b>I</b> I <b>D</b> K <b>H</b> I <b>P</b> L <b>S</b> G <b>Q</b> N <b>S</b> I <b>I</b> G <b>R</b> V <b>H</b> A <b>D</b> P <b>D</b> D <b>L</b> G <b>R</b> G <b>G</b> H <b>E</b> L <b>S</b> K <b>T</b> G	

---

## LEBENS LAUF

**Name** Oliver Schneider  
**Geburtstag** 29. August 1965  
**Geburtsort** Reutlingen  
**Familienstand** verheiratet

### **Schul- und Berufsausbildung**

1972-1976 Grundschule in Reutlingen-Rommelsbach  
1976-1985 Gymnasium am Bildungszentrum Nord in Reutlingen  
mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife  
1985-1988 Ausbildung zum Energiegeräte-Elektroniker  
1988-1990 Anstellung als Elektroniker

### **Studium**

10/1990-02/1998 Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen  
mit den Schwerpunkten Zoologie, Parasitologie und Paläontologie.

Diplomarbeit am Institut für Tropenmedizin in Tübingen mit dem  
Thema "Herstellung und Charakterisierung einer Subtraktionsgenbank  
aus *Entamoeba histolytica*-Leberstadien und *Entamoeba histolytica*-  
Kulturtrophozoiten" unter Anleitung von Dr. rer. nat. B. Walderich

05/1998-01/1999 Anstellung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für  
Tropenmedizin in Tübingen

### **Promotion**

02/1999-10/2003 Anfertigung der Dissertation am Institut für Tropenmedizin in Tübingen  
mit dem Thema "Identifizierung und Charakterisierung differentiell  
exprimierter Gene in Hämocyten *Schistosoma mansoni*-resistenter und  
-suszeptibler Zwischenwirtschnecken *Biomphalaria glabrata*" unter  
Anleitung von Dr. rer. nat. U. Zelck

---

Im Selbstverlag herausgegeben von:

**Oliver Schneider**  
**Villastraße 60**  
**72770 Reutlingen**