

Aus der
Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
(Leiter: Prof. Dr. med. Th. Löscher)
der Medizinischen Poliklinik – Innenstadt
(Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff)
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

**UNTERSUCHUNGEN ZUM SPEKTRUM IMMUNOGENER
PROTEINE BEI *ENCEPHALITOZOON CUNICULI***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Maximilian Wiedemann

aus
München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. H. Rinder

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Fischer

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Allgemeines..... | 1 |
| 1.2 | Morphologie | 2 |
| 1.3 | Lebenszyklus | 3 |
| 1.3.1 | Infektion der Wirtszelle..... | 4 |
| 1.3.2 | Proliferative Phase | 4 |
| 1.3.3 | Sporenbildung | 6 |
| 1.3.4 | Freisetzung der Sporen..... | 6 |
| 1.4 | Taxonomie | 6 |
| 1.5 | Wirtsspektrum und Übertragungswege | 7 |
| 1.6 | Epidemiologie..... | 8 |
| 1.7 | Klinische Manifestation..... | 9 |
| 1.7.1 | Gastrointestinale Symptome | 9 |
| 1.7.2 | Weitere Manifestationen..... | 11 |
| 1.8 | Therapie von Mikrosporidiosen | 11 |
| 1.9 | Diagnostik von Mikrosporidiosen..... | 12 |
| 1.9.1 | Mikroskopie | 12 |
| 1.9.2 | PCR..... | 14 |
| 1.10 | <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 15 |
| 2 | Problemstellung und Zielsetzungen der eigenen Arbeit | 17 |
| 3 | Materialien | 19 |
| 3.1 | Zelllinien und Sporen | 19 |
| 3.2 | Antikörper..... | 19 |
| 3.3 | Geräte | 19 |
| 3.4 | Chemikalien | 21 |
| 3.5 | Agar- und Gelmaterialien | 23 |
| 3.6 | Enzyme | 23 |
| 3.7 | Nukleotide | 23 |
| 3.8 | Kommerzielle „Kits“ | 24 |
| 3.9 | Sonstige Materialien..... | 24 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | Methoden | 26 |
| 4.1 | Zellkultur..... | 26 |
| 4.2 | Modifizierte Trichromfärbung nach Weber (Weber'sche Färbung)..... | 27 |
| 4.3 | Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von <i>E. cuniculi</i> -Antisera... | 27 |
| 4.4 | Aufarbeitung der <i>E. cuniculi</i> -Sporen zur Gewinnung von mRNA | 28 |
| 4.4.1 | Isolation der Gesamt-RNA | 28 |
| 4.4.2 | mRNA-Isolation | 29 |
| 4.4.3 | Bestimmung der Gesamt-mRNA..... | 30 |
| 4.4.4 | Fällung der Gesamt-mRNA..... | 31 |
| 4.5 | cDNA Synthese..... | 32 |
| 4.5.1 | Synthese des ersten cDNA-Stranges..... | 33 |
| 4.5.2 | Synthese des zweiten cDNA-Stranges | 34 |
| 4.5.3 | Glätten der cDNA-Enden und Aufreinigung der cDNA..... | 34 |
| 4.5.4 | Ligation der <i>EcoRI</i> -Adapter | 35 |
| 4.5.5 | Phosphorylieren der <i>EcoRI</i> -Enden..... | 36 |
| 4.5.6 | Restriktionsenzymverdau mit <i>XhoI</i> | 36 |
| 4.5.7 | Größenfraktionierung mit einer Sepharosesäule..... | 36 |
| 4.5.8 | Agarosegel-Elektrophorese der 12 verschiedenen cDNA-Fraktionen | 38 |
| 4.5.9 | Reinigung der cDNA-Fraktionen | 39 |
| 4.5.10 | Fällung der cDNA..... | 39 |
| 4.5.11 | cDNA-Quantifizierung..... | 39 |
| 4.5.12 | Ligation der cDNA in den ZAP Express Vektor | 40 |
| 4.6 | Packen des Ligationsergebnisses in λ -Helfer-Phagen | 40 |
| 4.7 | Ausplattieren und Titerbestimmung..... | 42 |
| 4.8 | Dot Blot Test | 43 |
| 4.9 | Ausplattieren der Phagensuspension..... | 44 |
| 4.10 | Immunoscreening..... | 45 |
| 4.11 | Ausstechen und Lagerung der positiven Plaques | 46 |
| 4.12 | Vereinzeln der positiven Phagen..... | 46 |
| 4.13 | <i>In vivo</i> -Exzision und Rezirkulation der ausgewählten geklonten Inserts | 47 |
| 4.14 | Plasmid „Miniprep“ mit E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I..... | 49 |
| 4.15 | Restriktionsenzymverdau mit <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i> | 50 |
| 4.16 | Sequenzieren der Plasmid-DNA | 50 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5 | Ergebnisse | 52 |
| 5.1 | Kultur von <i>Encephalitozoon cuniculi</i> und mRNA-Isolierung..... | 52 |
| 5.2 | cDNA-Quantifizierung..... | 52 |
| 5.3 | Ligation in Phagen zur rekombinanten Proteinexpression | 53 |
| 5.4 | Dot Blot Test | 54 |
| 5.5 | Immunoscreening..... | 55 |
| 5.6 | <i>In vivo</i> -Exzision und Charakterisierung der cDNA-Inserts..... | 56 |
| 5.7 | Analyse der cDNA-Inserts | 59 |
| 5.8 | Alignment der cDNA-Sequenzen mit dem <i>SWP1</i> -Gen..... | 59 |
| | | |
| 6 | Diskussion | 67 |
| 6.1 | Rationale des experimentellen Designs | 67 |
| 6.1.1 | Stand der Technik..... | 67 |
| 6.1.2 | Wahl des zu untersuchenden Mikrosporidiums..... | 68 |
| 6.2 | Spektrum immunogener Proteine von <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 68 |
| 6.3 | Bestimmung der immunogenen Region | 70 |
| 6.4 | Nutzen der Ergebnisse bei der Entwicklung eines Mikrosporidien-ELISA... | 72 |
| | | |
| 7 | Ausblick | 73 |
| | | |
| 8 | Zusammenfassung | 75 |
| | | |
| 9 | Literaturverzeichnis | 77 |
| | | |
| 10 | Abkürzungen | 85 |
| | | |
| 11 | Lebenslauf | 87 |
| | | |
| 12 | Danksagung | 89 |

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Mikrosporidien sind kleine, obligat intrazellulär lebende, sporenbildende einzellige Parasiten, die im Stamm *Microspora* zusammengefasst werden. Die Erstbeschreibung eines Mikrosporidiums (*Nosema bombycis*) erfolgte im Jahre 1857 bei der Seidenraupe (Nägeli, 1857). Bis heute sind mehr als 140 Gattungen und weit über 1200 Arten bekannt, die ein weites Spektrum von Insekten bis zu Säugetieren infizieren (Wittner *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2000).

Mikrosporidien sind echte Eukaryoten, wobei die Größe und Struktur ihres Genoms, insbesondere die der Gene, die für die 16S- und 23S-rRNA kodieren, eher denen von Prokaryoten ähneln. Gleichfalls fehlen ihnen Mitochondrien, Peroxisomen, Zentriolen und die typischen Golgimembranstapel. Sie besitzen jedoch einen echten Zellkern, ein intrazytoplasmatisches Membransystem und die Chromosomen werden von Mitosespindeln getrennt. Ebenso wie bei anderen eukaryotischen Organismen erfolgt eine Polyadenylierung der mRNA. Mikrosporidien wurden deshalb als „extrem alte“ Eukaryoten, möglicherweise als die ältesten Eukaryoten überhaupt, beschrieben (Vossbrinck *et al.*, 1987). So besitzt das haploide Genom der Mikrosporidienart *Encephalitozoon cuniculi* eine Größe von nur 2,9 Mb, was das kleinste eukaryotische Genom überhaupt darstellt, kleiner als das von *Escherichia coli* (4,2 Mb) (Biderre *et al.*, 1995).



Abb. 1:

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Encephalitozoon cuniculi*-Sporen (Foto: Heidrun Schöl).

Nachdem jedoch in den vergangenen Jahren das gesamte Genom dieser Mikrosporidienspezies sequenziert wurde, legen phylogenetische Studien anhand ausgewählter Proteine nahe, dass Mikrosporidien ihren evolutionären Ursprung von den Pilzen nahmen und somit mit ihnen verwandt sind (Babenko *et al.*, 2004; Thomarat *et al.*, 2004; Virel *et al.*, 2004).

Über Infektionen beim Menschen lagen lange Zeit nur wenige Beschreibungen vor. Obwohl Mikrosporidien ubiquitär vorkommen, erlangten sie eine größere humanpathogene Bedeutung erst mit der AIDS-Pandemie. Sie gelten heute als wichtige Erreger opportunistischer Erkrankungen bei Patienten mit AIDS und anderen zellulären Immundefekten. Vertreter von 7 Gattungen, nämlich *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Brachiola* und *Vittaforma*, wurden bisher beim Menschen nachgewiesen. Davon wurden insbesondere Mikrosporidien der Gattungen *Enterocytozoon* und *Encephalitozoon* als Krankheitserreger bei immunkompetenten Patienten gefunden (Didier, 1998; Wittner *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2000; Lippert *et al.*, 2003).

1.2 Morphologie

Die in der Umwelt vorkommenden Sporen von Mikrosporidien sind zwischen 1 und 20 µm groß, wobei die der Spezies, die Säugetiere infizieren, gewöhnlich nicht größer als 3 µm sind. Die Sporen haben eine dicke Wand, die aus 2 Schichten besteht: Erstens, einer elektronenmikroskopisch dichten, proteinösen Außenschicht (Exospore) und zweitens, einer aus Chitin bestehenden elektronenlichten Innenschicht (Endospore). Unmittelbar innerhalb dieser liegt die Zytoplasmamembran an, die den Inhalt der Spore, das so genannte Sporoplasma, einschließlich der posterioren Vakuole, des Zellkerns und dem für Mikrosporidien charakteristischen aufgewundenen Polartubulus („Polfaden“), umschließt. Die Endospore ist am vorderen Pol, durch den der Polfaden bei der Infektion herausgeschleudert wird, verdünnt. In der dadurch gebildeten Vertiefung befindet sich die Ankerplatte des Polfadens. Vor der Ankerplatte liegt der Polaroplast, welcher aus lamellenartig angeordneten Membranen besteht, die in die äußere Membran des Polfadens übergehen. Die Mitte der Spore wird von einem (*Enterocytozoon*,

Encephalitozoon, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*) oder zwei dicht aneinander gelagerten und als Diplokaryon bezeichneten Kernen (*Nosema*, *Thelohania*, *Vittaforma*) eingenommen. Das den Kern umgebende Zytoplasma enthält Ribosomen und einige Zisternen rauhen, endoplasmatischen Retikulums (siehe Abbildung 2). Mikrosporidien besitzen keine Mitochondrien, keine Peroxisomen und keinen ausgereiften Golgi-Apparat (Canning *et al.*, 1993; Didier, 1998).

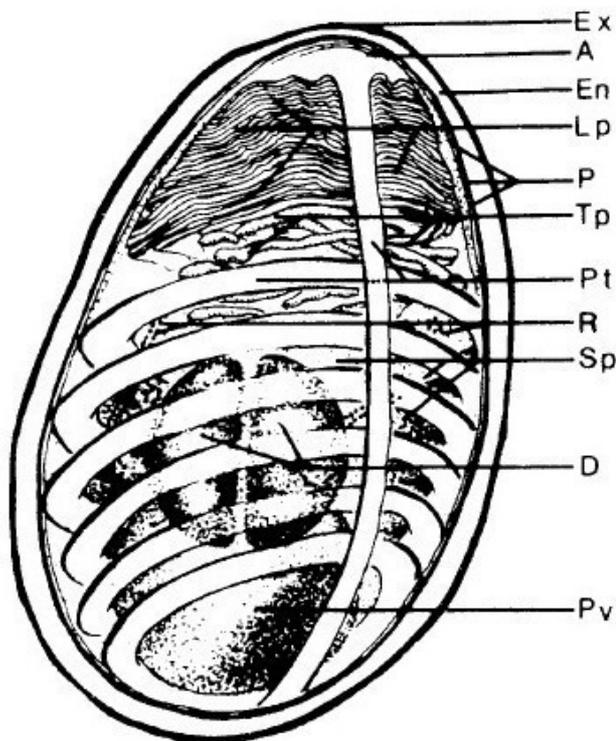


Abb. 2: Schematischer Aufbau einer Mikrosporidien-Spore (nach Didier, 1998).

- Ex: Exospore
- A: Ankerplatte
- En: Endospore
- Lp: lamellarer Polaroplast
- P: Plasmamembran
- TP: tubulärer Polaroplast
- Pt: Polfaden
- R: Ribosomen
- Sp: Sporoplasma
- D: Kerne
- Pv: posteriore Vakuole

1.3 Lebenszyklus

Alle Mikrosporidien sind obligat intrazellulär lebende Parasiten, die ausgenommen von den Sporen keine Entwicklungsstadien außerhalb ihrer Wirtszelle haben. Sie vermehren sich ausschließlich innerhalb der Wirtszelle über komplexe, im Folgenden näher beschriebene Entwicklungsstadien und bilden schließlich umweltresistente Sporen, welche vom Wirt ausgeschieden werden. Der Entwicklungszyklus aller bekannten humanpathogenen Mikrosporidien läuft einwirtig ab (Didier, 1998).

1.3.1 Infektion der Wirtszelle

Die Sporen besitzen im reifen Stadium eine hochdifferenzierte Technik, um Wirtszellen zu infizieren. Dazu dient ein nur bei Mikrosporidien vorkommendes Organell in der Spore, nämlich ein spindelförmig aufgerollter, schlauchartiger, durchschnittlich 1-3 μm langer Polfaden und eine am vorderen Pol der Spore liegende Ankerplatte. Auf Grund von *in vivo* bislang noch nicht eindeutig geklärten Stimuli – das alkalische Milieu des Dünndarms spielt wahrscheinlich eine Rolle – und in einer noch nicht völlig verstandenen Weise erhöht sich der osmotische Druck in der Spore auf etwa 60 atm, wodurch der Polfaden ausgeschleudert wird und wahrscheinlich rein mechanisch die Wirtszellmembran durchdringt (Undeen und Frixione, 1991). Der Inhalt der Spore, das Sporoplasma, wandert dann einschließlich des Zellkerns durch den ausgestülpten Polfaden in die Wirtszelle und infiziert diese. Der hoch entwickelte Infizierungsmechanismus der Mikrosporidien steht somit in einem auffälligen Gegensatz zur archaischen Struktur ihres Genoms und der einfachen übrigen Ausstattung der Zelle.

1.3.2 Proliferative Phase

Nach der Penetration der Wirtszelle durch den Polfaden und dem Einschleusen des Sporoplasmas beginnt die proliferative Phase des Entwicklungszyklus. Diese Phase wird als Merogonie, seltener auch als Schizogonie, bezeichnet. Die intrazelluläre Entwicklung erfolgt entweder innerhalb einer parasitophoren Vakuole (*Encephalitozoon*) oder direkt im Zytoplasma der Wirtszelle (*Enterocytozoon*). Das in die Wirtszelle eingedrungene und von einer Membran umschlossene Sporoplasma wird als Meront (Synonym: Schizont) bezeichnet. Es ist meist unregelmäßig begrenzt, rund und größer als die Spore. In der Wirtszelle findet nun eine Phase von wiederholten Teilungen statt, die aus Zweiteilung oder auch multiplen Zellteilungen bestehen kann und Merogonie genannt wird. Dabei erfolgt die Zellteilung entweder unmittelbar im Zusammenhang mit der Kernteilung (*Encephalitozoon*) oder erst im Anschluss an mehrere Kernteilungen (*Enterocytozoon*), wobei zunächst so genannte Plasmodienformen entstehen (Didier *et al.*, 1998).

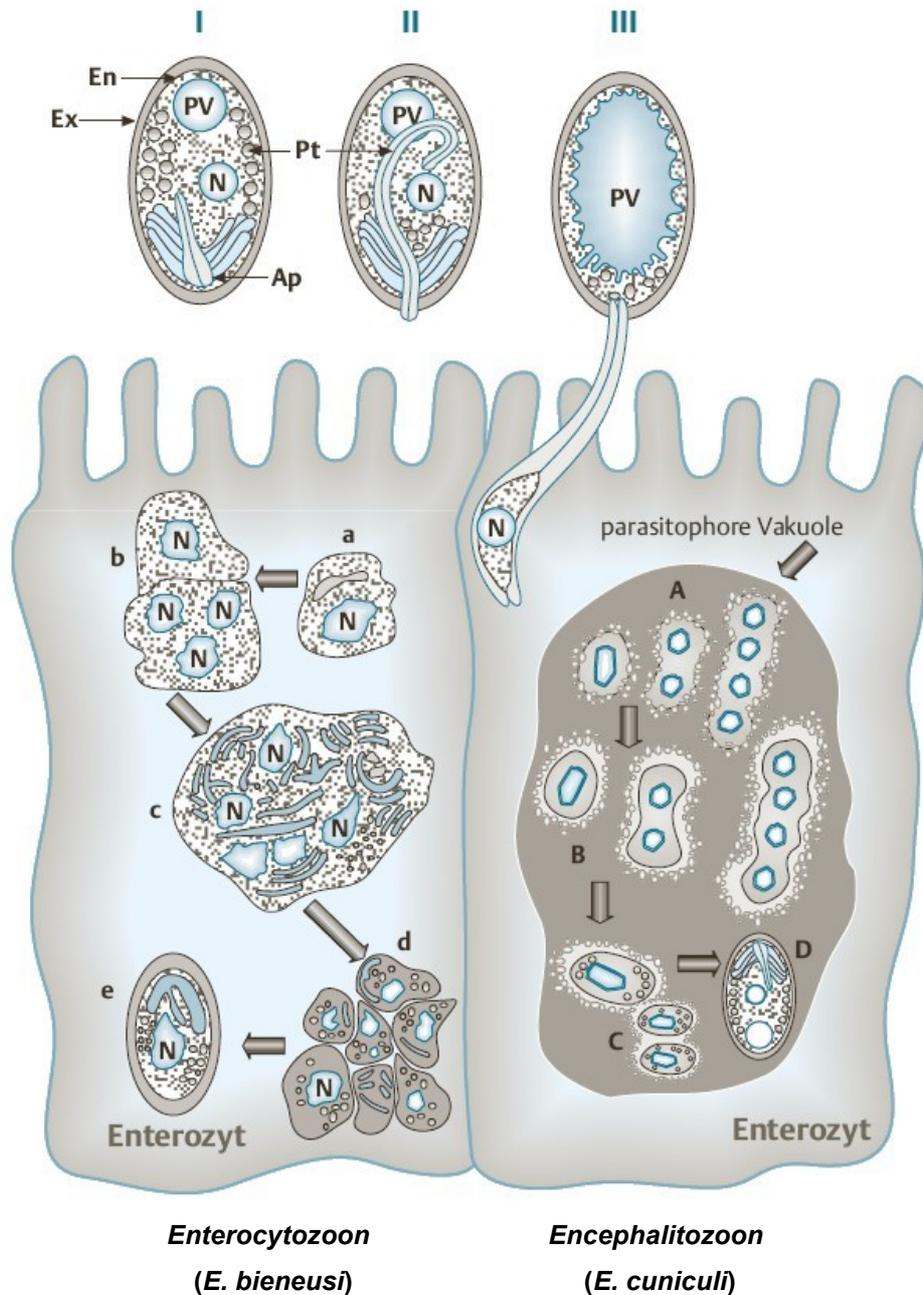


Abb. 3: Schematische Darstellung der Sporenstruktur (I), der infektiösen Phase (II-III), sowie des Lebenszyklus von *E. bienewsi* (a-e) und von *E. cuniculi* (A-D). Reife Mikrosporidien-Spore mit elektronenmikroskopisch dichter Exospore (Ex), elektronenmikroskopisch lichter Endospore (En), Ankerplatte (Ap), Polartubulus (Pt), Zellkern (N) und posteriorer Vakuole (PV). Beginn der Ausstülpung des Polartubulus (II) und nachfolgende Passage des Parasiten durch den entwickelten Polartubulus (III). Lebenszyklus von *E. bienewsi*: Einzelne proliferative Zelle (a), Plasmodien ohne zytoplasmatische Organellen (b), späte Plasmodien mit elektronendichten Scheiben (c), Sporblasten mit Polartubulus (d) und reife *E. bienewsi*-Spore (e). Lebenszyklus von *E. cuniculi*: Proliferative Zellen können ein-, zwei- oder vierkernig sein (A), auch die Sporonten können ein-, zwei- oder vierkernig sein (B) und sezernieren eine fibrilläre Matrix. Nach der letzten Zellteilung beginnt die Umwandlung zu Sporblasten (C) und reifen *E. cuniculi*-Sporen (D) (nach Schottelius, 2003).

1.3.3 Sporenbildung

Die Phase der Differenzierung hin zur Spore (Sporogonie) beginnt mit der Bildung einer elektronenmikroskopisch dichten Auflagerung auf die Zellmembran der Meronten („surface coat“), aus der sich die spätere Exospore entwickelt. Die Zellen werden nun Sporonten genannt. Diese vervielfältigen sich durch Zweiteilung oder multiple Teilung und entwickeln sich zu Sporoblasten, die zu den reifen Sporen differenzieren (Canning, 1993; Didier, 1998).

1.3.4 Freisetzung der Sporen

Die intrazelluläre Vermehrung der Mikrosporidien dauert an, bis die Wirtszelle die Parasiten nicht länger fassen kann und rupturiert, wodurch die Sporen, aber auch unreife Organismen verschiedenster Entwicklungsstadien frei werden. Der massenhafte Untergang der Wirtszellen ist, je nach Lokalisation, für die klinischen Manifestationen der Infektion verantwortlich.

1.4 Taxonomie

Taxonomisch werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt etwa 140 Gattungen und über 1200 Arten von Mikrosporidien unterschieden. Allerdings sind davon nur 7 Gattungen beim Menschen als humanpathogen beschrieben worden (Lippert *et al.*, 2003). Die Systematik der Mikrosporidien ist, wie die vieler anderer Organismen, nicht starr und endgültig, sondern Gegenstand von Neu- und Reklassifizierungen. So bestehen derzeit auf Grund von neu gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der nahen Verwandtschaft von Mikrosporidien mit den Pilzen Überlegungen, Mikrosporidien dem Stamm der Pilze zuzuordnen (Babenko *et al.*, 2004; Thomarat *et al.*, 2004; Virel *et al.*, 2004)

1.5 Wirtsspektrum und Übertragungswege

Humanpathogene Mikrosporidien wurden bei einer großen Anzahl von Säugetieren, aber auch bei Vögeln gefunden (Schottelius *et al.*, 2003; Sobottka *et al.*, 2003; Reetz *et al.*, 2004; Haro *et al.*, 2005). Dies legt ein zoonotisches Potential nahe. Allerdings liegen bislang keine stützenden epidemiologischen Untersuchungen vor, in denen beispielsweise der Kontakt zu Tieren als Risikofaktor identifiziert worden wäre.

Eine Übersicht über das Vorkommen der vier häufigsten humanpathogenen Mikrosporidienspezies gibt Tabelle 1.

Tab. 1: Übersicht über das Wirtsspektrum der vier häufigsten humanpathogenen Mikrosporidienspezies.

| <i>E. bienewisi</i> | <i>E. intestinalis</i> | <i>E. hellem</i> | <i>E. cuniculi</i> |
|---|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Mensch • Affe • Huhn • Hund • Katze • Maus • Rind • Schwein • Taube | <ul style="list-style-type: none"> • Mensch • Kaninchen • Maus • Taube | <ul style="list-style-type: none"> • Mensch • Huhn • Kaninchen • Maus • Papagei • Taube | <ul style="list-style-type: none"> • Mensch • Affe • Fuchs • Hase • Huhn • Hund • Igel • Maus • Pferd • Ratte • Rind • Schaf • Schwein • Ziege |

Die Möglichkeit von fäkal-oralen Übertragungswegen erscheint ebenfalls plausibel und wird durch eine Studie über Mikrosporidien an der Wasseroberfläche des Flusses Seine (Frankreich) und dem Bericht über einen trinkwasserassoziierten Mikrosporidienausbruch unterstützt (Cotte *et al.*, 1997; Fournier *et al.*, 2000). Das Auftreten von ausschließlich respiratorischen *E. hellem*-Infektionen ist ein Hinweis, dass Mikrosporidien auch inhalativ erworben werden könnten (Weber *et al.*, 1993; del Aguila *et al.*, 1997). Der Nachweis von jeweils derselben Mikrosporidienspezies bei Sexualpartnern deutet außerdem auf eine Übertragung durch Sexualkontakte hin (Franzen und Müller, 1999; Sobottka *et al.*, 2003).

1.6 Epidemiologie

Mikrosporidieninfektionen wurden vor allem bei immungeschwächten Patienten beschrieben. So wurden diese Infektionen fast ausschließlich bei Patienten mit AIDS beobachtet, die eine CD4⁺ T-Zellkonzentration von weniger als 100/μl hatten (Poles *et al.*, 2003). Versuche bei Mäusen mit einem T-Zell-Defizit <100/μl haben gezeigt, dass bei einer so geringen T-Zell-Zahl schon wenige hundert Sporen für eine manifeste Infektion ausreichen (Schmidt *et al.*, 1983). Klinische Studien belegen, dass Mikrosporidien vor Einführung der HAART-Therapie („hochaktive antiretrovirale Therapie“) mit fast 40% die häufigsten enteropathogenen Erreger bei HIV-infizierten Patienten mit chronischer Diarrhoe waren (Schottelius *et al.*, 2003). In Deutschland wurde die überwiegende Zahl aller Mikrosporidieninfektionen durch *Enterocytozoon bieneusi* (etwa 90%) und *Encephalitozoon intestinalis* (etwa 10%) verursacht. Weniger oft fanden sich *Encephalitozoon hellem* und *Encephalitozoon cuniculi* (Weber *et al.* 2000).

Seit der Einführung der HAART-Therapie hat die Prävalenz der Mikrosporidiose in Deutschland deutlich abgenommen. Allerdings weiß man, dass alle heutzutage verfügbaren Therapien die Latenzphase einer HIV-Infektion nur verlängern. Erreicht ein mit HIV-infizierter Patient später das voll ausgeprägte Krankheitsbild AIDS mit einer CD4⁺ T-Zellkonzentration unter 100/μl, werden Mikrosporidieninfektionen wahrscheinlich wieder häufiger angetroffen werden (Poles *et al.*, 2003).

Mikrosporidien wurden aber auch bei Patienten mit anderen Formen von Immunsuppression nachgewiesen, wie zum Beispiel bei Patienten, die eine Organtransplantation erhalten hatten und medikamentös immunsupprimiert waren (Sing *et al.*, 2001), aber auch bei Kleinkindern und Senioren (Lores *et al.*, 2001; Tumwine *et al.*, 2002; Mungthin *et al.*, 2005; Tumwine *et al.*, 2005). Darüber hinaus werden Mikrosporidien zunehmend häufiger in aufsuchenden Untersuchungen (Surveys) auch bei immunkompetenten Personen, die an einer selbstlimitierender Diarrhoe erkrankt sind, gefunden, insbesondere bei Reisenden in tropische und subtropische Gebiete und in Einzelfällen bei Personen mit Tierkontakten (Raynaud *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2001). Infektionen des Menschen mit anderen Mikrosporidienarten als denen der Gattungen *Enterocytozoon* und *Encephalitozoon* sind auf einzelne Kasuistiken beschränkt.

1.7 Klinische Manifestation

1.7.1 Gastrointestinale Symptome

Die häufigsten Symptome bei einer Infektion mit Mikrosporidien sind chronische, fieberhafte Diarrhoen, Blähungen, unspezifische Oberbauchbeschwerden und Malabsorptionsstörungen mit Gewichtsverlust. Die Infektion spielt sich überwiegend im proximalen Jejunum ab. Die Diarrhoe äußert sich typischerweise in 3-10 ungeformten bis wässrigen Stuhlentleerungen pro Tag ohne Blut- oder Schleimauflagerungen, vor allem morgens, oft aber auch nach den Mahlzeiten. Die Stuhlfrequenz kann intermittierend auch häufiger sein. Oft wechseln sich Phasen andauernder Diarrhoe mit Phasen normaler Stuhlfrequenz und -konsistenz ab. Die Diarrhoe ist selten unmittelbar lebensbedrohlich, kann aber im Verlauf von Monaten zu einer lebensbedrohlichen Kachexie führen (Canning, 1993; Weber und Deplazes, 1995; Kotler und Orenstein, 1998; Franzen und Müller, 1999).

Bei schweren, nichtblutigen Durchfällen ohne Leukozyten im Stuhl sollten Mikrosporidieninfektionen in die differentialdiagnostischen Überlegungen mit einbezogen werden. Häufig besteht bei diesen Patienten eine Malabsorption von Fett, D-Xylose, Vitamin B₁₂ und Laktose (Weber *et al.*, 2000).

Tab. 2: Klinische Manifestationen bei Infektion mit humanpathogenen Mikrosporidien (nach Schottelius, 2003). Die wichtigsten klinischen Manifestationen der in Deutschland am häufigsten auftretenden Mikrosporidien sind im Fettdruck hervorgehoben.

| <u>Mikrosporidienspezies</u> | <u>Immunsuppression</u> | <u>Immunkompetenz</u> |
|---|---|---|
| <i>Enterocytozoon bieneusi</i> | Chronische Diarrhoe, Cholangitis, Cholezystitis , Bronchitis, Pneumonie, Sinusitis | selbstlimitierende Diarrhoe |
| <i>Encephalitozoon intestinalis</i> (früher <i>Septata intestinalis</i>) | Chronische Diarrhoe, Cholangitis, Cholezystitis, Nephritis, Sinusitis, Harnwegsinfektion , Bronchitis, Keratokonjunktivitis, generalisierte Infektion | selbstlimitierende Diarrhoe |
| <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | Keratokonjunktivitis, Sinusitis , Bronchitis, Pneumonie, Nephritis , Hepatitis, Peritonitis, Harnwegsinfektion, intestinale Infektion, generalisierte Infektion | (zwei HIV-negative Kinder mit vermuteter <i>E. cuniculi</i> -Infektion waren wahrscheinlich immunsupprimiert) |
| <i>Encephalitozoon hellem</i> | Keratokonjunktivitis, Sinusitis , Pneumonie, Bronchitis, Nephritis , Harnwegsinfektion, Prostatitis, generalisierte Infektion | selbstlimitierende Diarrhoe |
| <i>Pleistophora spp.</i> | Myositis | nicht beschrieben |
| <i>Trachipleistophora hominis</i> | Myositis, Keratokonjunktivitis, Sinusitis | nicht beschrieben |
| <i>Trachipleistophora anthropophthera</i> | Enzephalitis, Myositis, Hepatitis, Pankreatitis, generalisierte Infektion | nicht beschrieben |
| <i>Nosema ocularum</i> | nicht beschrieben | Keratitis |
| <i>Brachiola connori</i> (früher <i>N. connori</i>) | generalisierte Infektion | nicht beschrieben |
| <i>Brachiola algerae</i> (früher <i>N. algerae</i>) | nicht beschrieben | Keratitis |
| <i>Brachiola vesicularum</i> (früher <i>N. vesicularum</i>) | Myositis | nicht beschrieben |
| <i>Vittaforma corneae</i> (früher <i>N. corneum</i>) | generalisierte Infektion | Keratitis |
| <i>Microsporidium ceylonensis</i> ¹ | nicht beschrieben | Keratitis, Kornealulcus |
| <i>Microsporidium africanum</i> ¹ | nicht beschrieben | Keratitis, Kornealulcus |
| Der Name „ ¹ <i>Microsporidium</i> “ wurde hier als eine kollektive, nicht taxonomische Bezeichnung für Mikrosporidien, die nicht klassifiziert werden konnten, verwendet. | | |

1.7.2 Weitere Manifestationen

Weitaus seltener als der Darm sind die Gallengänge und die Gallenblase für klinische Symptome verantwortlich, wobei das Auftreten von Übelkeit, Erbrechen und Fieber Hinweis auf eine begleitende Cholangitis oder Cholezystitis und abdominelle Schmerzen Ausdruck einer Papillitis oder Papillenstenose sein können. Laborchemisch findet man bei biliärer Beteiligung meist eine Erhöhung der Transaminasen, alkalischen Phosphatase und γ -Glutamyl-Transpeptidase (Kotler und Orenstein, 1998).

Bei generalisierten *Encephalitozoon*-Infektionen von Patienten mit AIDS kann eine Beteiligung der Harnwege gefunden werden. Das Symptomspektrum reicht von Zeichen einer Zystitis, asymptomatischen Nephritiden mit und ohne Mikrohämaturie über schwere Nephritiden mit Makrohämaturie bis hin zum Nierenversagen. Die Sinusitis ist eine weitere Mikrosporidienmanifestation. Man findet bei diesen Patienten einen nicht-eitrigen Nasenschleim von zäher, glasiger Konsistenz. Sehr selten sind andere Organmanifestationen zu finden, darunter Hepatitis, Pankreatitis, Peritonitis, Augen-, ZNS- und Muskelbeteiligungen, pulmonale Komplikationen sowie Zeichen einer Prostatitis oder Urethritis (Poles *et al.*, 2003; Schottelius *et al.*, 2003).

1.8 Therapie von Mikrosporidiosen

Während intestinale Mikrosporidieninfektionen bei immunkompetenten Personen meist selbstlimitierend verlaufen und keiner weiteren Behandlung bedürfen, ist die erfolgreiche Behandlung von immunsupprimierten Patienten sehr von der infizierenden Mikrosporidienspezies abhängig. Bei diesen Patienten ist die Differenzierung der Mikrosporidien sinnvoll, da sich hieraus unterschiedliche therapeutische Optionen ergeben. Es hat sich gezeigt, dass Infektionen mit Mikrosporidien der Gattung *Encephalitozoon* bei Patienten mit AIDS effektiv mit Albendazol (2 x 400 mg pro Tag für 3-4 Wochen) behandelt werden können (Poles *et al.*, 2003). Dagegen führt bei Patienten, die an einer durch *E. bienewisi* verursachten chronischen Diarrhoe leiden, eine Albendazoltherapie meist nur bei etwa 50% zu einer vorübergehenden klinischen Besserung, ohne dass es zu einer Eliminierung

der Erreger kommt. Andere Substanzen wie Furazolidon, Thalidomid (teratogen!) und Fumagillin haben bei einzelnen Patienten zu einer Besserung geführt, sind aber für diese Indikation in Deutschland nicht zugelassen (Molina *et al.*, 2002; Sobottka *et al.*, 2003; Schottelius *et al.*, 2003).

Zu Therapieversuchen mit anderen Wirkstoffen, darunter das bereits erwähnte Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) hemmende Thalidomid (Sharpstone *et al.*, 1995), existieren nur kleine Untersuchungsreihen und Kasuistiken ohne statistische Signifikanz (Franzen und Müller, 1999).

1.9 Diagnostik von Mikrosporidiosen

Der lichtmikroskopische Nachweis einer Infektion mit den nur 1-3 µm großen Mikrosporidien ist auf Grund der geringen Sporengröße und uncharakteristischen Färbereigenschaften schwierig und von der individuellen Expertise des Untersuchers abhängig. Einige Arten können auf Zellkulturen isoliert werden, nicht jedoch *E. bienersi*. Eine Anzucht wird aber ohnehin nur für experimentelle Untersuchungen eingesetzt, für diagnostische Zwecke ist sie wegen ihres Aufwands und ihrer beschränkten Sensitivität nicht geeignet. Die serologische Diagnostik von Mikrosporidiosen mittels ELISA hat sich auf Grund ausgeprägter Kreuzreaktivitäten, einer hohen Rate falsch-negativer Ergebnisse und einem möglicherweise ausgeprägten Durchseuchungstiter als nicht zuverlässig erwiesen und ist ohne Bedeutung (Zierdt *et al.*, 1993; Aldras *et al.*, 1994; Enriquez *et al.*, 1997; van Gool *et al.*, 2004). Deshalb findet der Nachweis von Mikrosporidieninfektionen fast ausschließlich über einen Direktnachweis des Erregers statt.

1.9.1 Mikroskopie

Bis zu Beginn der 90er Jahre war der Nachweis von Mikrosporidiosen wegen ihrer geringen Größe und ihrer uncharakteristischen Färbereigenschaften ausschließlich der Elektronenmikroskopie vorbehalten (van Gool *et al.*, 1990; Weber *et al.*, 1994; Kotler und Orenstein, 1998). Dagegen ist heute die Lichtmikroskopie die einfachste Diagnostikmethode. Um den direkten Nachweis im Mikroskop jedoch erst zu

ermöglichen, der durch unspezifische Färbereigenschaften der Sporen erschwert wird, mussten Spezialfärbemethoden entwickelt werden. Die beiden wichtigsten Färbetechniken sind die modifizierte Trichromfärbung nach Weber (Weber *et al.*, 1992) und die Fluoreszenzfärbung mit optischen Aufhellern (van Gool *et al.*, 1993; Vavra *et al.*, 1993). Bei der Trichromfärbung wird der Farbstoff „Chromotrop 2R“ verwendet, der Mikrosporidien rot färbt, während Bakterien blassgrün bleiben. Diese Eigenschaft wurde in einer Modifizierung der Trichrom-Färbung ausgenutzt und durch eine zehnfach höhere Konzentration dieses Farbstoffs und eine verlängerte Inkubationszeit weiter verbessert („Weber’sche Färbung“). Die Sensitivität, aber auch die Spezifität dieser Methode ist jedoch sehr von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Auch bei höchster lichtmikroskopischer Vergrößerung sind kaum innere Sporenstrukturen zu erkennen und auch andere Stuhlbestandteile können sich ebenfalls rötlich färben (Weiss und Vossbrinck, 1998).

Alternativ existieren noch Färbemethoden mit Fluoreszenzfarbstoffen, insbesondere „Calcofluor White M2R“ und „Uvitex 2B“ (van Gool *et al.*, 1993; Vavra *et al.*, 1993). Zwar scheinen diese Fluoreszenzfärbemethoden etwas sensitiver als die modifizierte Trichromfärbung zu sein, jedoch sind sie weniger spezifisch, da sie nicht nur das Chitin der Mikrosporidien-Endospore anfärben, sondern auch das von im Stuhl enthaltenen Pilzzellen (Didier *et al.*, 1995). Immerhin waren in einer vergleichenden Studie sowohl die modifizierte Trichrom-Färbung als auch die „Uvitex 2B“-Färbung von Sporen aus Stuhl sensitiver als der Nachweis von Mikrosporidien aus Duodenalbiopsien (DeGirolami *et al.*, 1995).

Empfohlen wird heute im Allgemeinen die modifizierte Trichromfärbung, da sie spezifischer ist. In einer multizentrischen Studie konnte für die Lichtmikroskopie in sechs teilnehmenden Labors eine durchschnittliche Sensitivität von 80% ermittelt werden (Rinder *et al.*, 1998).

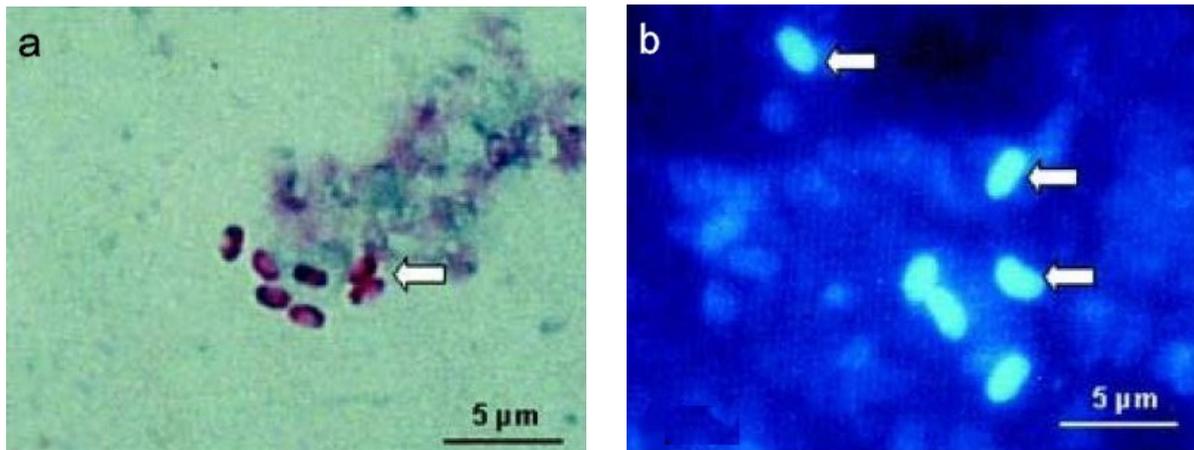


Abb. 4: **a)** Modifizierte Trichromfärbung vom Stuhl eines mit HIV infizierten Patienten mit chronischer Diarrhoe zeigt rot gefärbte *Encephalitozoon intestinalis*-Sporen (Pfeil). **b)** *Encephalitozoon intestinalis*-Sporen (Pfeile) in derselben Stuhlprobe gefärbt mit Calcofluor white 2MR (nach Schottelius 2003).

Zur weiteren Bestätigung und näheren Charakterisierung der Mikrosporidien kann die Elektronenmikroskopie eingesetzt werden, insbesondere zum Nachweis von Mikrosporidien im Gewebe. Aus der Feinstruktur der Spore mit der Anordnung des Polartubulus und aus den Veränderungen der Zelle können die Gattungen und teilweise auch die Art der infizierenden Mikrosporidien ermittelt werden (Franzen und Müller, 1999; Wittner und Weiss, 1999; Weber *et al.*, 2000).

1.9.2 PCR

Zum Nachweis und zur Differenzierung der Mikrosporidien werden zunehmend auch PCR-basierte Methoden eingesetzt. Diese sind jedoch bisher nur Speziallaboratorien vorbehalten, da es aktuell keine kommerzielle oder standardisierte diagnostische „Kits“ gibt und die Labors auf selbst entwickelte PCR-Methoden oder Literaturangaben zurückreifen müssen. Gegenüber den lichtmikroskopischen Verfahren mit einer Nachweisgrenze von etwa 10^4 bis 10^6 Sporen/ml ist die Nachweisgrenze bei der PCR mit etwa 10^2 Sporen/ml um mindestens das Hundertfache niedriger. Eine vergleichende Studie zwischen sechs Laboratorien, die ihre selbst entwickelte PCR einsetzten und sechs anderen, die die Stuhlproben von Patienten lichtmikroskopisch untersuchten, ergab eine höhere durchschnittliche Empfindlichkeit für die PCR (89%) verglichen mit der Mikroskopie (80%). Die Spezifität beider Methoden erwies sich mit 98% bzw. 95% als sehr gut (Rinder *et al.*, 1998).

Durch eine geeignete Wahl des Zielgens ist nicht nur der Nachweis von Mikrosporidien, sondern gleichzeitig auch eine einfache Artdifferenzierung möglich, z.B. durch Amplifizierung des nicht-kodierenden, intern transkribierten Spacer (ITS) des Gens der rRNA (rDNA) mit einer geschachtelten („nested“) Polymerasekettenreaktion (PCR) und dem Verdau des PCR-Produkts mit dem Restriktionsenzym *MnII* mit nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung (Katzwinkel-Wladarsch *et al.*, 1996; Rinder *et al.*, 1997).

1.10 *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi war das erste Mikrosporidium, das als Parasit bei Säugetieren beschrieben wurde. Seine Entdeckung in Kaninchen geht auf das Jahr 1922 zurück (Levaditi *et al.*, 1923). Im Gegensatz zu den übrigen *Encephalitozoon spp.* und zu *E. bieneusi* war *E. cuniculi* bereits vor seiner Erstbeschreibung beim Menschen als Verursacher von Enzephalitiden und Nephritiden bei Kaninchen, seltener auch bei anderen Hasentieren sowie bei Nagern, Fleischfressern und Primaten bekannt (Canning, 1993).

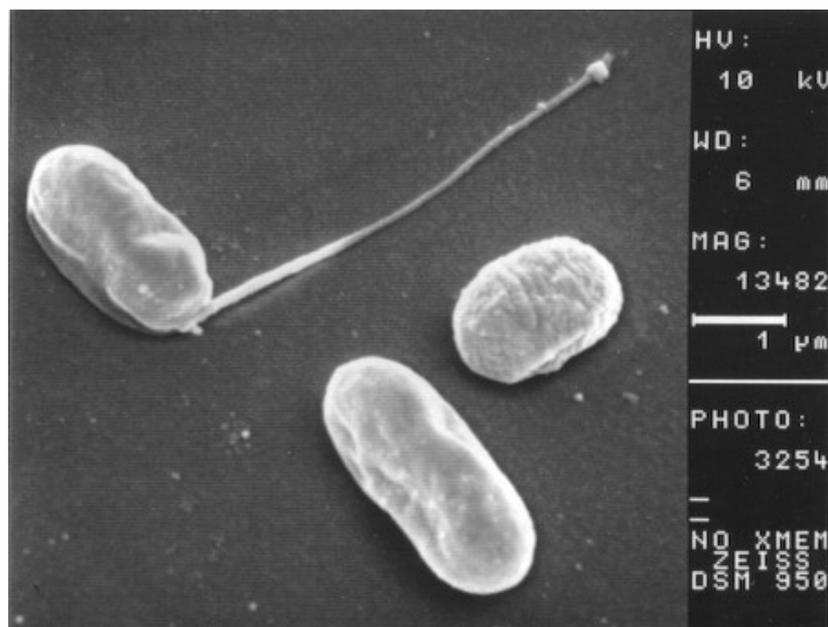


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Encephalitozoon cuniculi*-Sporen, eine davon mit ausgeworfenem Polfaden (Foto: Heidrun Schöl).

Der Erstdnachweis von *E. cuniculi* beim Menschen gelang im Liquor und Urin eines 9 Jahre alten japanischen Jungen (Matsubayashi *et al.*, 1959). Infektionen des Menschen mit *E. cuniculi* sind insgesamt selten. Auf Grund der geringen Fallzahlen ist die Kenntnis über die klinischen Manifestationen von *E. cuniculi* begrenzt. Generell ist zu sagen, dass Infektionen milder ablaufen als bei *E. bienewisi* oder *E. intestinalis*. Es wurden jedoch auch schon sehr komplizierte und schwierige Krankheitsverläufe beschrieben (Franzen *et al.*, 1995).

Für experimentelle Untersuchungen bietet *E. cuniculi* den großen Vorteil, dass es sich im Gegensatz zu *E. bienewisi* in einer Zellkultur anzüchten lässt. Somit stehen Sporen nach Kultivierung in ausreichender Anzahl und Reinheit zur Verfügung. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass ein Großteil des Wissens über Mikrosporidien aus der Erforschung dieser Art stammt. Bis heute ist *E. cuniculi* das wohl am besten erforschte Mikrosporidium. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen mit *E. cuniculi* durchgeführt.

2 Problemstellung und Zielsetzungen der eigenen Arbeit

Mikrosporidieninfektionen beim Menschen finden sich ubiquitär. Im vorangegangenen Kapitel wurde aufgezeigt, dass die Diagnostik von Mikrosporidien durch den heutzutage immer noch problematischen Nachweis der Erreger mit konventionellen, aber auch biochemischen und immunologischen Methoden bislang sehr schwierig ist und dass bis heute noch keine Testmethode etabliert wurde, die sich für eine Routine-Diagnostik von Mikrosporidieninfektionen eignet. Lichtmikroskopische Methoden setzen eine große Erfahrung des Untersuchers voraus, immunologische Nachweise sind unspezifisch und für die PCR-Diagnostik sind immer noch keine standardisierten und zertifizierten Testsysteme kommerziell erhältlich. Gerade vor dem Hintergrund aktuell zunehmender HIV-Infektionen wäre aus dem oben genannten Grund eine spezifische, schnelle und einfach durchzuführende Diagnostikmethode wünschenswert.

Hier böte sich ein ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Essay) zum Nachweis von Mikrosporidienantigenen insbesondere aus dem Stuhl an (so genannter Koproantigen-ELISA). So werden ELISA-basierte Verfahren zum Nachweis von Antigenen im Stuhl bereits heute zum Beispiel in der Diagnostik von Entamoeben und anderen darmpathogenen Keimen eingesetzt. Leider gelang es bislang noch nicht, einen für die Routine-Diagnostik geeigneten ELISA für Mikrosporidien zu etablieren, mit dem der Stuhl eines mit Mikrosporidien infizierten Patienten untersucht werden kann. Das Grundproblem stellt bis heute die Wahl eines geeigneten Antigens dar. Zwar fanden in den letzten Jahren hierzu mehrere Untersuchungen statt, die Identifizierung eines passenden Antigens für die Routine-Diagnostik blieb jedoch aus.

In der vorliegenden Arbeit sollten die bereits erwähnten Schwierigkeiten auf der Suche nach einem geeigneten Antigen zur Entwicklung eines ELISA durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden überwunden werden.

Im Einzelnen sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Ziele verfolgt werden:

- Anzucht und Vermehrung der Mikrosporidienspezies *Encephalitozoon cuniculi* als Modellorganismus in der Zellkultur
- Isolation der Sporen aus dieser Kultur in möglichst hoher Anzahl und Reinheit
- Isolation der mRNA aus den Sporen
- Transkription der gewonnenen mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA (complementary DNA)
- Anlegen einer Genexpressionsklonbank
- Screenen der Genexpressionsklonbank mit polyklonalen Antikörpern, die durch Immunisierung von Kaninchen mit *E. cuniculi* gewonnen wurden
- Sequenzierung der durch die Antikörper identifizierten Klone, die immunogene Proteine exprimieren
- Analyse und Charakterisierung der gewonnenen cDNA-Sequenzen
- Suche nach Übereinstimmungen mit bereits bekannten Sequenzen in Gendatenbanken, um konservierte Domänen zu identifizieren
- Identifizierung immunogener Domänen durch Deletionsmutanten
- Charakterisierung immunogener Domänen bezüglich ihrer Eignung zur Entwicklung eines Koproantigen-ELISA

3 Materialien

3.1 Zelllinien und Sporen

Die Sporen von *Encephalitozoon cuniculi* (IPZ:CH-H14) und die menschlichen Lungenfibroblasten (MRC-5) wurden der Stammsammlung der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München entnommen.

3.2 Antikörper

Polyklonale Kaninchen Anti-*E. cuniculi* Serum-Immunglobuline
siehe Kapitel 4.3.

Dako, Glostrup, Dänemark:

- „Peroxidase-Conjugated Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins“

3.3 Geräte

Abimed, Düsseldorf:

- Pipette „Labmate L10“

Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz:

- Vibrationsmischer „Vortex Genie 2“

Claus Damm, Fredensborg, Dänemark:

- Laminaflow „clanLAF VFR 1206“

Materialien

Eppendorf Gerätebau, Hamburg:

- Kühlzentrifuge „5417 R“
- Photometer „PCP 6121“
- Absaugpumpe „4151“

Gilson, Bad Camberg:

- Pipetten „Pipetman P1000, P200 und P20“

Glasgerätebau Hirschmann, Eberstadt:

- Pipettierhilfe „Pipettus-Akku“

Heraeus Instruments, Hanau:

- Brutschrank „Typ B 5060 EC-CO2“
- Tischzentrifuge „Biofuge 13“

Hettich, Tuttlingen:

- Tischzentrifuge „Mikroliter“
- Zentrifuge „Rotanta S“

H + P Labortechnik, Oberschleißheim:

- Labor-Sterilisator „Varioklav 400 EP-Z“

IKA Labortechnik, Staufen:

- Schütteltisch „HS 250 Basic“

Julabo Labortechnik, Seelbach:

- Wasserbad „Julabo SW 1“

Leitz, Wetzlar:

- Umkehrmikroskop „Labovert“

LKB, Bromma:

- Wasserbad „2209 Multicool“

Materialien

Pharmacia Biotech, Cambridge, USA:

- Photometer „Gene Quant II, RNA / DNA Calculator“
- Elektrophoresenetzgerät „Gibco BRL ST 504 D“

Polaroid Cooperation, Cambridge, Massachusetts, USA:

- Sofortbildkamera „MP 4“

Sartorius GmbH, Göttingen:

- Tischwaage „Sartorius 3716“
- Tischwaage „Sartorius BP 210 D“

Schütt Labortechnik GmbH:

- Gassicherheitsbrenner „Flammy S“

Strehlau + Kruse, Freiburg:

- Gelelektrophoresekammer „Bioplex“, Größe 10 cm x 11 cm

3.4 Chemikalien

Biochrom, Berlin:

- MEM-EARLE-Medium (ohne Glutamin)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- L-Glutamin (200 mM)
- Penicillin / Streptomycin
- Trypsin / EDTA-Lösung
- Phosphate Buffered Saline (PBS)

BTS-Bio Tech Trade Service (Vertrieb Sigma):

- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)

Materialien

Merck, Darmstadt:

- Essigsäure (99%)
- Magnesiumsulfat
- Methanol 100 %
- Natriumchlorid
- Xylol

Roth, Karlsruhe:

- 2-Mercaptoethanol 99 % p.a.
- Chloroform
- Ethanol 99,6% und 70 %
- Natriumhydrogencarbonat
- Phenol-Chloroform (1:1), pH 7,5

Sigma, Deisenhofen:

- Farbstoff „Chromotrope 2R“
- Ethidiumbromid
- Farbstoff „Fast green“
- Phosphorwolframsäure
- Tetracyclin
- Wasserstoffperoxid 30 %
- 4-Chloro-1-Naphtol
- Mineralöl „Light White Oil“

United States Biochemical Group (USB), Cleveland, Ohio, USA:

- Kanamycinsulfat
- Triton X 100
- Tween 20

3.5 Agar- und Gelmaterialien

Appligene, Heidelberg:

- Agarose „molecular biology grade“

Roth, Karlsruhe:

- Agar-Agar für die Bakteriologie, hochrein
- Trypton/Pepton aus Casein
- Hefeextrakt

Sigma, Deisenhofen:

- Gelatin

3.6 Enzyme

Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig:

- Restriktionsendonuklease *EcoRI*, 15 units/ μ l
- Restriktionsendonuklease *XhoI*, 8 units/ μ l

Invitrogen, Karlsruhe:

- Rekombinanter Ribonuklease Inhibitor „RNaseOUT“

3.7 Nukleotide

Invitrogen, Karlsruhe:

- 1 Kb DNA-Leiter

MWG Biotech, Ebersberg:

- Sequenzierprimer: T3 (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3')
- Sequenzierprimer: T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3')

Thermo Electron GmbH, Ulm:

- Sequenzierprimer: SWP-3 (5'-GGA YCA GTA CAA GAA GGC-3')

3.8 Kommerzielle „Kits“

Peqlab Biotechnologie GmbH:

- „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“

Qiagen, Hilden:

- „Poly A⁺ RNA Oligotex Mini Kit“
- „QIAamp DNA Stool Mini Kit“
- „RNeasy Mini Kit“

Stratagene, Heidelberg:

- „ZAP Express cDNA Synthesis Kit“
- „ZAP Express cDNA Gigapack III Gold cloning Kit“
- „picoBlue Immunoscreening Kit“

3.9 Sonstige Materialien

Amersheim Biosciences, Freiburg:

- Nitrocellulose Filter Hybond-C Extra 45 Micron, 82 mm und 137 mm

Dow Chemical, Vertrieb Schubert Laborbedarf, München:

- Plastikfolie: „Saran“

Lynnon Corporation, Quebec, Kanada:

- Computersoftware „DNA-Man“

Nunc, Roskilde, Dänemark:

- Kulturflaschen mit Filterkappe „Nunclon Surface“, 25 cm² und 185 cm²

Materialien

Polaroid, Vertrieb Sigma, Deisenhofen:

- Sofortbildfilm „667“

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Das Mikrosporidium *Enterocytozoon cuniculi* vermehrt sich obligat intrazellulär. Um *E. cuniculi*-Sporen in einer ausreichenden Menge und Reinheit zur Isolierung der mRNA zu erhalten, wurden die Sporen in einer Fibroblasten-Zellkultur vermehrt. Zur Züchtung der *E. cuniculi*-Sporen (IPZ:CH-H14) wurden als Wirtszellen menschliche embryonische Lungenfibroblasten (MRC-5) verwendet. Die Fibroblasten wurden als „Monolayer“-Kultur in 185 cm² Kulturflaschen mit Filterdeckel gehalten. In jeder Kulturflasche befanden sich 25 ml Nährmedium, welches zwischen 5% und 20% im Wasserbad für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), 1% L-Glutamin, jeweils 0,5% Penicillin und 0,5% Streptomycin und ad 100% MEM-EARLE Medium enthielt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und mit einer CO₂-Konzentration von 5% inkubiert. Mit dem prozentualen Anteil an FKS konnte die Wachstumsgeschwindigkeit der Fibroblasten gesteuert werden. So erwies es sich als vorteilhaft, die Fibroblasten in den ersten 5 Tage mit einem Nährmedium, das einen Anteil von 20% FKS enthielt, zu kultivieren, damit eine rasche Proliferation erfolgte. Fünf Tage nach Beginn der Kultur wurden die Zellen mit 5×10^6 *E. cuniculi*-Sporen infiziert. Während der Infektionsphase von 3 Tagen wurde ein Nährmedium mit einem Anteil von 5% FKS eingesetzt, um den Sporen genügend Zeit zu geben, die sich nun langsamer teilenden Fibroblasten zu infizieren. Die *E. cuniculi*-Sporen wurden über 5 Wochen gezüchtet. Das Wachstum der Sporen sowie der Fibroblasten musste täglich unter dem Umkehrmikroskop kontrolliert werden, da die Mikrosporidien ihre Wirtszellen beim Austritt lysieren und somit ausreichend Fibroblasten zur Neuinfizierung benötigt wurden. Ein Mediumwechsel erfolgte in 2 bis 4-tägigen Abständen, abhängig von der vorhanden Sporenanzahl im Medium sowie der Dichte des Zellrasens mit Fibroblasten. Waren einzelne unvernetzte Fibroblasten auf dem Zellrasen zu erkennen, wurde im Nährmedium der Anteil an FKS von 10 auf 20% erhöht, solange bis sich wieder ein dichter Rasen gebildet hatte. Die gewonnenen *E. cuniculi*-Sporen im ausgewechselten Nährmedium wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Des Weiteren wurden von den Sporen Trichrome-Stain-Präparate (siehe Kapitel 4.2) angefertigt. Die beim Nährmediumwechsel geernteten Sporen wurden gesammelt.

4.2 Modifizierte Trichromfärbung nach Weber (Weber'sche Färbung)

Für die Herstellung der Trichrom-Färbelösung nach Weber *et al.* (1992) wurden 6,0 g des Farbstoffes „Chromotrope 2R“ und 0,15 g des Farbstoffes „Fast green“ zusammen mit 0,7 g Phosphorwolframsäure in 3 ml Essigsäure (99%) aufgelöst und mit einem Glasstab verrührt. Die Lösung wurde 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und im Anschluss mit 100 ml Aqua bidest. aufgegossen und verrührt.

Für die Färbung von Mikrosporidien im Stuhl oder Nährmedium wurde auf einem Objektträger ein Ausstrich angefertigt, trocknen gelassen und im Anschluss mit reinem Methanol fixiert. Die nun auf dem Objektträger fixierte Probe wurde nun für 1,5 Stunden in der Trichromfärbelösung inkubiert. Zum Entfärben wurde der Objektträger für 10 Sekunden in Essigalkohol (99,55 ml Ethanol (90%) und 0,45 ml 99%ige Essigsäure) und die überschüssige Farbe im Anschluss 10 Sekunden mit 95%igem Ethanol abgespült. Zum Entwässern wurde der Objektträger in dieser Reihenfolge zuerst 5 Minuten in Ethanol (95%), weitere 10 Minuten in Ethanol (100%) und zum Schluss für 10 Minuten in reinem Xylol inkubiert. Der Objektträger wurde nun an der Luft getrocknet.

Die fertigen Präparate wurden unter höchster lichtmikroskopischer Vergrößerung (1000x-Objektiv) angeschaut. Die vorhandenen Mikrosporidien waren nun rot gefärbt.

4.3 Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von *E. cuniculi*-Antiseren

Um ein Antiserum zum Screenen der Genexpressionsbank (siehe Kapitel 4.10) zur Verfügung zu haben, wurden 8 Aliquots mit jeweils 500×10^9 *E. cuniculi*-Sporen (gelöst in 200 μ l PBS-Puffer) vorbereitet. 2 Kaninchen wurden mit jeweils 1 Aliquot durch intraperitoneale Injektion immunisiert. Die restlichen Aliquots wurden bei -20°C gelagert. Bei beiden Kaninchen erfolgte nach 4 Wochen eine 1. Boosterung, nach 7 Wochen eine 2. Boosterung und nach 4 Monaten eine 3. Boosterung mit jeweils 500×10^9 *E. cuniculi*-Sporen. Acht Monate nach Beginn der Immunisierung wurde den Kaninchen Blut entnommen und daraus das Serum gewonnen. Aus dem Serum

beider Kaninchen wurde für Kaninchen Nr. 1 ein IFT-Titer von 1:512 und für Kaninchen Nr. 2 ein IFT-Titer von 1:2048 bestimmt. Auf Grund des höheren Titers wurde für das Immunoscreening das Serum von Kaninchen Nr. 2 verwendet.

4.4 Aufarbeitung der *E. cuniculi*-Sporen zur Gewinnung von mRNA

Bei der Aufarbeitung der *E. cuniculi*-Sporen galt es, etwa 5 µg mRNA zu isolieren, da die cDNA Synthese mit dem ZAP Express cDNA Synthesis Kit (Stratagene) für diese Menge optimiert ist.

4.4.1 Isolation der Gesamt-RNA

Um die mRNA der *E. cuniculi*-Sporen aufzuarbeiten, wurde aus fünf mit *E. cuniculi* infizierten Fibroblasten-Kulturen jeweils die gesamte Menge (5 x 25 ml) Nährmedium entnommen, in fünf 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 1000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Danach wurde der Zellrasen jeder Kulturflasche nach Spülung mit 25 ml PBS mit 15 ml Trypsin abgelöst und das Trypsin mit 15 ml Nährmedium geblockt. Die abgelösten, mit *E. cuniculi* infizierten Fibroblasten wurden zu den Röhrchen hinzugegeben, wiederum bei 1000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und abdekantiert.

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mittels des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden). Das Kit verwendet eine Silica-Gel-Membran, die die Eigenschaft besitzt, RNA mit einer Größe über 200 Nukleotiden besonders gut zu binden und damit rRNA und tRNA abzutrennen. Somit konnte die mRNA bereits im ersten Schritt konzentriert und gereinigt werden. Die fünf Sedimente („Pellets“) eines jeden Röhrchens wurden mit jeweils 1,2 ml „RLT“-Puffer (aus dem Kit) resuspendiert, gleichmäßig auf zwei 1,5 ml Mikrozentrifugengefäße verteilt und sofort auf Eis gestellt. Durch fünfmaliges Aufziehen und wieder Zurückdrücken aller fünf Eluate mit einer 10-Gauge-Kanüle, auf die eine sterile 2 ml Plastikspritze gesteckt war, erfolgte der mechanische Aufschluss der Zellen. Durch Zugabe von 1 µl RNase Inhibitor „RNaseOUT“ (Invitrogen, Karlsruhe) in jedes Eluat sollte ein enzymatischer Abbau der RNA verhindert werden. Die Eluate wurden für 3 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und

der Überstand in ein neues Gefäß übertragen. Dann wurde ein Volumen Ethanol (70%) zugegeben und vermischt. Da die im Kit enthaltenen Säulchen jeweils ein maximales Bindungsvermögen von 100 µg RNA haben, erfolgte die Aufteilung der Eluate auf 10 Säulchen. Denn für die Gewinnung der gewünschten 5 µg mRNA mussten bei einem angenommenen Anteil von 1% an der Gesamt-RNA insgesamt 500 µg Gesamt-RNA gewonnen werden. Die Säulchen wurden 15 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Jedes Säulchen konnte mit maximal 700 µl Volumen beladen werden. Deswegen wurde die restliche Menge nach der Zentrifugation aufgetragen und wiederum 15 Sekunden zentrifugiert. Um die im Säulchen gebundene RNA zu reinigen, wurden sie zuerst mit 700 µl „RW1“-Puffer und danach zweimal mit 500 µl „RPE“-Puffer (aus dem Kit) beladen, jeweils 15 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wurden die Silica-Gel-Membranträger aller 10 Säulchen in ein neues Gefäß gesteckt und für 2 Minuten bei höchster Stufe zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Zum Eluieren der Gesamt-RNA wurde auf jede Silica-Gel-Membran insgesamt 55 µl RNase-freies Wasser gegeben und die Säulchen in einem neuen Mikrozentrifugengefäß bei höchster Stufe 1 Minute zentrifugiert. Die gesamten 10 RNA-Eluate wurden in einem neuen Mikrozentrifugengefäß zusammengegeben. Das Gesamtvolumen aller Eluate betrug 550 µl. Die Zusammensetzungen der Puffer werden von der Herstellerfirma nicht angegeben.

4.4.2 mRNA-Isolation

Die gelöste Gesamt-RNA wurde bei 65°C für 5 Minuten im Wasserbad erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Die mRNA-Isolation erfolgte mittels des „Poly(A) Quik mRNA Isolation Kit“ (Qiagen, Hilden), das ein Säulchen mit Oligo(dT)-Zellulose verwendet, an die sich das Poly-A-Ende der mRNA bindet. Dadurch kann die restliche RNA abgetrennt werden. Durch Zugabe von 55 µl 10x „Sample Buffer“ zu den 550 µl RNA-Eluat erfolgte eine Verdünnung der Lösung auf 1x. Nun wurde die „Push Column“-Säule, nachdem sie 5 Minuten aufrecht stehen gelassen wurde, damit sich die enthaltene Oligo(dT)-Zellulose setzt, zweimal mit 200 µl „High-Salt Buffer“ äquilibriert. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA zweimal mit einer Geschwindigkeit von 2 Tropfen pro Sekunde mit einer Spritze durchgedrückt, damit die mRNA von der Säule gebunden wurde. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 200 µl „High-Salt Buffer“ und dreimaligem Waschen mit 200 µl „Low-Salt Buffer“,

wurde die mRNA mit 800 µl 65°C heißem Elutions-Puffer eluiert. Die gewonnenen 740 µl Eluat wurden sofort auf Eis gestellt. Die Zusammensetzungen aller im Kit enthaltenen Puffer werden von der Herstellerfirma nicht angegeben.

4.4.3 Bestimmung der Gesamt-mRNA

Zur Bestimmung des Gesamt-mRNA-Gehalt wurde von den 740 µl mRNA-Eluat 12,5 µl entnommen und mit 237,5 µl H₂O ad 250 µl aufgefüllt (Verdünnung 1:19). Laut Hersteller entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml einer Einzelstrang-RNA (ssRNA). Des Weiteren gibt das Verhältnis zwischen den Wellenlängen 260 und 280 nm eine Aussage über Reinheit der mRNA, wobei eine OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 2 für ein ausreichend reines mRNA-Isolat spricht. Für das verdünnte mRNA-Eluat wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm eine Absorption von 0,0073 bestimmt werden. Für das OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis wurde ein Wert von 2,35 errechnet. Somit konnte von einem sehr reinen mRNA-Isolat ausgegangen werden. Mit Hilfe der Absorptionsmessung wurde in einem ersten Schritt die mRNA-Konzentration und in einem zweiten Schritt die mRNA-Menge im verbliebenen Eluat berechnet:

$$\begin{aligned} 1. \quad & \text{mRNA-Konzentration} = 0,0073 \times 20 \times 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 5,84 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \\ & \text{Absorption} \quad \text{Verdünnung} \quad \text{Konzentration von ssRNA mit OD}_{260} = 1 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2. \quad & \text{mRNA-Gehalt im Eluat} = 5,84 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 0,7275 \text{ ml} = 4,25 \mu\text{g} \\ & \text{mRNA-Konzentration} \quad \text{Eluatvolumen} \end{aligned}$$

Somit wurde eine mRNA-Konzentration von 5,84 µg/ml errechnet, der Gesamt-mRNA-Gehalt betrug 4,25 µg gelöst in 727,5 µl Elutions-Puffer.

4.4.4 Fällung der Gesamt-mRNA

Zum Fällern der mRNA wurde die 727,5 µl mRNA-Eluat (siehe Abschnitt 4.4.3) ad 800 µl mit „Sample Buffer“ („Poly(A) Quick mRNA Isolation Kit“) aufgefüllt und dann auf 2 Mikrozentrifugengefäße zu jeweils 400 µl verteilt. In beide Gefäße wurden jeweils 1000 µl Ethanol (100%) gegeben, vermischt und die mRNA über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurden die Lösungen für 30 Minuten bei 12000 x g in der Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Beide Sedimente wurden mit jeweils 150 µl 70%igem Ethanol, das mit Diethylpyrocarbonat (DECP)-behandeltem Wasser hergestellt worden war, gewaschen. Danach wurde der Überstand abpipettiert und die Pellets an der Luft getrocknet.

4.5 cDNA Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das ZAP Express cDNA Synthesis Kit (Stratagene, Heidelberg) benutzt. Eine Übersicht über die cDNA-Synthese gibt Abbildung 6:

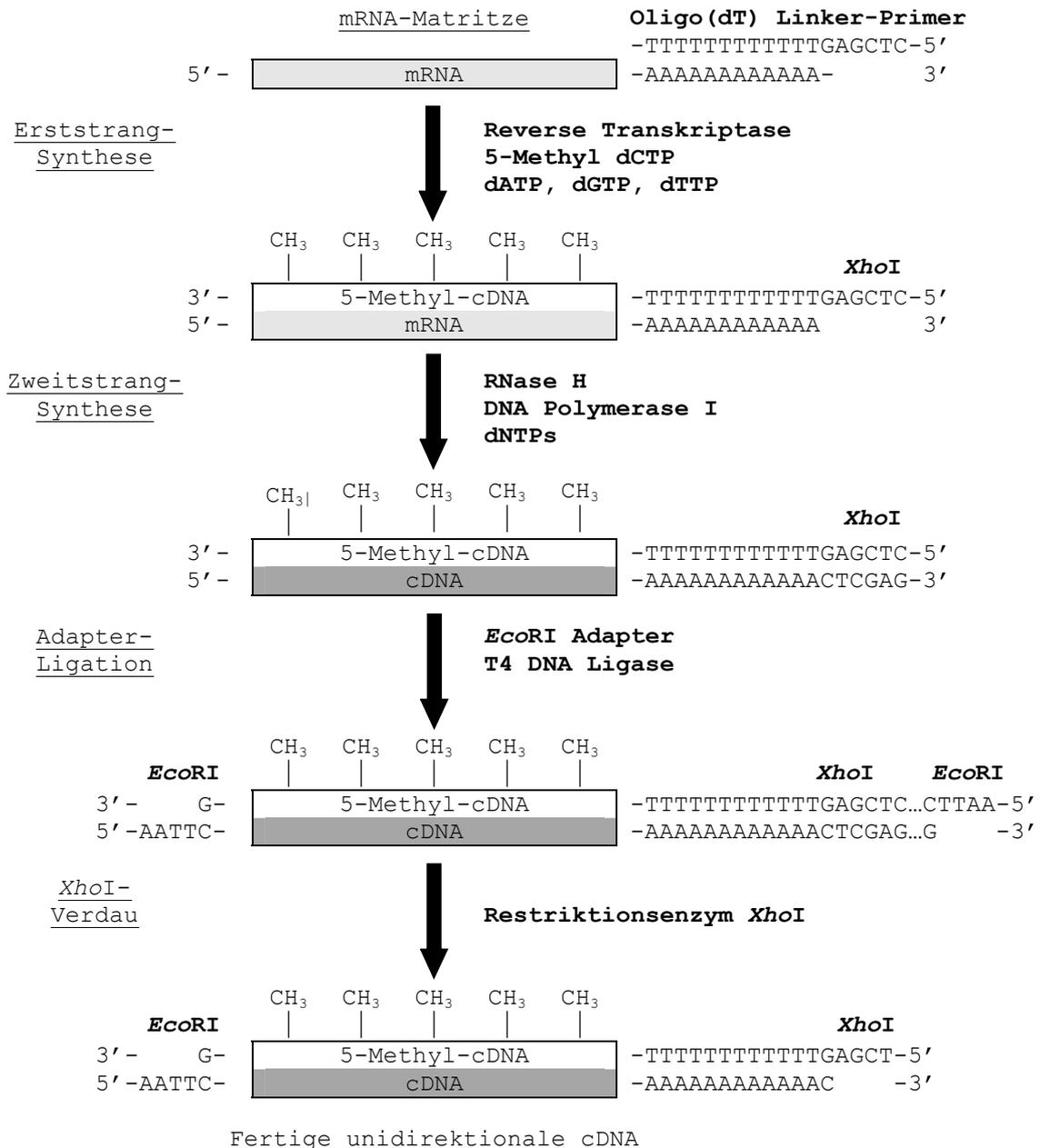
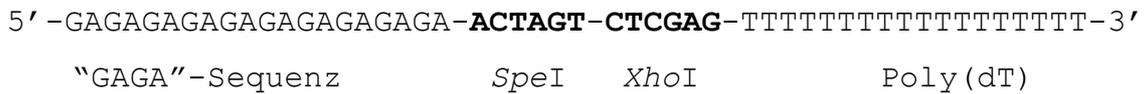


Abb. 6: Übersicht über die cDNA-Synthese aus mRNA.

4.5.1 Synthese des ersten cDNA-Stranges

Zur Synthese des ersten cDNA-Stranges wurde ein Hybrid Oligo(dT) Linker-Primer mit 50 Basen verwendet, dessen Sequenz Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *SpeI* beinhaltet.



Der Linker-Primer ist mit einer "GAGA"-Sequenz ausgestattet, um die *XhoI*-Restriktionsenzymerkennungsseite vor einem Abbau der DNA durch 5'-Exonukleasen zu schützen. Weiter besitzt er eine aus 18 Poly-dT-Basen bestehende Sequenz, um an die Poly-A-Sequenz der mRNA zu binden. Die Restriktionsenzymsequenz erlaubt es später, die fertige cDNA leichter in den Vektor zu ligieren.

Für die Transkription der mRNA in cDNA wurde die Reverse Transkriptase vom Mäuse-Leukämie-Virus eingesetzt, die keine RNase H-Aktivität (RNase H⁻ Version) besitzt (siehe Abschnitt 4.5.2). Der Nukleotid-Mix für den ersten Strang enthält die Nukleotide dATP, dGTP, dTTP sowie 5-Methyl-dCTP. Somit hat der komplette erste cDNA-Strang an jeder Cytosin-Base eine Methylgruppe, so dass die spätere doppelsträngige cDNA vor einem Verdau mit dem Restriktionsenzym *XhoI* geschützt ist, da *XhoI* nur nicht-methylierte DNA schneidet. Zu Beginn der Synthese des Erststrangs bindet die Poly-dT-Region des Linker-Primers an das Poly-A-Ende der mRNA. Danach transkribiert die Reverse Transkriptase die mRNA revers in cDNA.

In der praktischen Durchführung wurden die zwei getrockneten mRNA-Pellets (siehe Abschnitt 4.4.4) in jeweils 18,75 µl DECP-behandeltem Wasser resuspendiert und in einem neuen Mikrozentrifugengefäß zusammengegeben, so dass darin 37 µl gelöste mRNA enthalten waren. In die mRNA-Lösung wurden nacheinander 5 µl 10x Erststrang-Puffer, 3 µl Erststrang-Methylnukleotidmix (je 10 mM dATP, dGTP, dTTP und 5 mM 5-Methyl-dCTP), 2 µl Linker-Primer (1,4 µg/µl) und 1 µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl) (aus dem Kit) zugegeben. Die Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Primer an die mRNA binden konnten. Danach wurde 1,5 µl StrataScript Reverse Transkriptase (50 U/µl) (aus dem

Kit) zugegeben und vermischt. Für die Transkription musste die Lösung bei 42°C für 1 Stunde im Wasserbad inkubiert werden. Zum Beenden der Transkription wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt.

4.5.2 Synthese des zweiten cDNA-Stranges

Zur Synthese des zweiten Stranges zerschneidet das Enzym RNase H die an den Erststrang gebundene mRNA. Somit entsteht eine große Anzahl von Fragmenten, die der DNA-Polymerase I als Primer dienen. Die DNA-Polymerase I synthetisiert mit Hilfe dieser RNA-Fragmente den cDNA-Zweitstrang. Der Zweitstrangnukleotid-Mix enthält nur noch unmethylierte Nukleotide. Es wird also kein 5-Methyl-dCTP in den zweiten Strang eingebaut, auch nicht an die *Xho*I-Schnittstelle. Somit ist nur der Erststrang methyliert. Dies stellt sicher, dass anschließend die *Xho*I-Schnittstelle im Linker-Primer vom Restriktionsenzym erkannt und geschnitten wird, nicht jedoch etwaige halbmethylierte *Xho*I-Schnittstellen in der cDNA.

Zur Durchführung wurden in die Lösung, die den ersten Strang der cDNA (siehe Abschnitt 4.5.1) enthielt, folgende Bestandteile des Kits pipettiert: 20 µl 10x Zweitstrangpuffer, 6 µl Zweitstrang dNTP (je 10 mM dATP, dGTP, dTTP und 26 mM dCTP), 116 µl steriles demineralisiertes H₂O, 2 µl RNase H (1,5 U/µl) und 11 µl DNA Polymerase I (9 U/µl). Die Lösung wurde gemischt und zur Synthese des zweiten Stranges für 2,5 Stunden bei 16°C ins Wasserbad gegeben. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung auf Eis gestellt, um die Reaktion zu beenden.

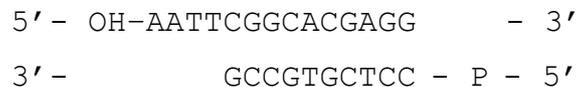
4.5.3 Glätten der cDNA-Enden und Aufreinigung der cDNA

In die Zweitstrang-Synthesereaktion wurden zur Auffüllung von möglicherweise bestehenden Einstrang-Überhängen 23 µl „Blunting dNTP Mix“ (je 10 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP) und 2 µl „Cloned *Pfu* DNA Polymerase“ (2,5 U/µl) (aus dem Kit) pipettiert. Die Lösung wurde bei 72°C für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 200 µl Phenol-Chloroform [1:1, pH 7,0-8,0] der Reaktion zugegeben und gemischt. Um das Chloroform wieder von der cDNA-Lösung zu trennen, wurde die Lösung 2 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und danach die obere wässrige Phase, die die cDNA enthielt, in ein neues Mikrozentrifugengefäß übertragen. Dazu wurde dasselbe Volumen an Chloroform (100%) zugegeben, gemischt und erneut für

2 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und wiederum in ein neues Mikrozentrifugengefäß übertragen, mit 20 µl 3 M Natriumacetat und 400 µl Ethanol (100%) versetzt, gemischt und die cDNA über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die gefällte cDNA-Lösung in der Kühlzentrifuge für 1 Stunde bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen. Die cDNA wurde erneut zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet.

4.5.4 Ligation der *Eco*RI-Adapter

Der *Eco*RI-Adapter hatte folgende Sequenz:



Dieser Adapter besteht aus zwei Oligonukleotiden mit 10 und 14 Nukleotiden und bildet nach Anlagerung beider Oligonukleotide einen *Eco*RI-kompatiblen Überhang. Das aus 10 Nukleotiden bestehende Stück ist phosphoryliert, so dass der Adapter an die bereits geglätteten Enden der cDNA ligiert werden kann. Das aus 14 Basen bestehende Oligonukleotid ist nicht phosphoryliert, um die zweite Seite des Linkers vor einer Ligation an andere DNA-Moleküle zu schützen.

Zur praktischen Durchführung wurde das getrocknete Pellet (aus Abschnitt 4.5.3) mit 9 µl *Eco*RI-Adapterlösung (0,4 µg/µl) resuspendiert und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert, damit sich die cDNA komplett lösen konnte. Zur Kontrolle wurde 1 µl cDNA-Lösung abgenommen und bei -20°C gelagert, um sie später bei der Gelelektrophorese mitlaufen lassen zu können. Um die *Eco*RI-Adapter an die geglättete cDNA zu ligieren wurde 1 µl 10x Ligase-Puffer, 1 µl 10 mM rATP und 1 µl T4 DNA-Ligase (4 U/µl) zugegeben. Damit die *Eco*RI-Adapter binden konnten, wurde der Ligationsansatz zwei Tage lang im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Ligase bei 70°C im Wasserbad 30 Minuten lang inaktiviert.

4.5.5 Phosphorylieren der *EcoRI*-Enden

Nachdem die Adapterligation abgeschlossen und die Ligase hitzeinaktiviert worden war, wurde nun auch das aus 14 Basen bestehende Oligonukleotid phosphoryliert, um die spätere Ligation in den nicht-phosphorylierten Vektor zu ermöglichen. Dazu wurde in die cDNA-Lösung 1 µl 10x Ligase-Puffer, 2 µl 10 mM rATP, 5 µl steriles Wasser und 2 µl T4 Polynukleotid-Kinase (5 U/µl) (aus dem Kit) pipettiert und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zum Inaktivieren der Kinase wurde die Lösung für 30 Minuten bei 70°C erhitzt.

4.5.6 Restriktionsenzymverdau mit *XhoI*

Durch die unmethylierte *XhoI*-Schnittstelle (siehe Abschnitt 4.5.2) kann durch Restriktion mit *XhoI* auf einer Seite der cDNA ein *XhoI*-kompatibler Überhang erzeugt werden. Um später zusammen mit der verbliebenen *EcoRI*-Schnittstelle am anderen Ende der cDNA eine so genannte „gerichtete“ Ligation in den Vektor zu ermöglichen (siehe Abschnitt 4.5.12), wurden in den Ansatz 28 µl *XhoI*-Puffer und 3 µl *XhoI* (40 U/µl) (aus dem Kit) pipettiert und für 1,5 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 5 µl 10x STE-Puffer (aus dem Kit) und 125 µl Ethanol (100%) zugegeben und die cDNA über die Nacht bei -20°C gefällt. Die cDNA-Lösung wurde am nächsten Tag in der Kühlzentrifuge 60 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das an der Luft getrocknete Pellet mit 14 µl 1x STE-Puffer und 3,5 µl Säulenfarbstoff resuspendiert.

4.5.7 Größenfraktionierung mit einer Sepharosesäule

Um die bei den Restriktionsenzymverdauen entstandenen Fragmente sowie die restlichen Linker und Adapter abzutrennen und die cDNA-Stränge entsprechend ihrer Länge zu fraktionieren, wurde die cDNA-Lösung mit Hilfe einer Sepharose-Säule aufgetrennt und einzelne Fraktionen gesammelt, die später auf ein Agarosegel aufgetragen wurden. Zur Vorbereitung der Sepharosesäule mussten folgende Vorbereitungsschritte durchgeführt werden: Bei einer 1 ml Glaspipette wurde die Seite mit der Spitze mit einem Wattestopfen verschlossen. Die Pipette wurde mit der Spitze nach unten in eine Klemme gespannt und mit Sepharosegel CL-2B (aus dem Kit) befüllt. Nachdem sich die Sepharose gesetzt hatte, wurde die Säule mit 10 ml

1x STE-Puffer (aus dem Kit) gewaschen und mit den 17,5 μ l cDNA-Lösung aus Abschnitt 4.5.6 beladen. Die Elution erfolgte mit 3 ml 1x STE-Puffer. Sobald der Farbstoff, der in der Lösung enthalten war, die auf der Glaspipette aufgedruckte -0,4 ml Marke erreichte, wurden mit 12 Mikrozentrifugengefäßen Fraktionen jeweils zu 3 Tropfen (ca. 100 μ l) gesammelt, die cDNA unterschiedlicher Länge enthielten.

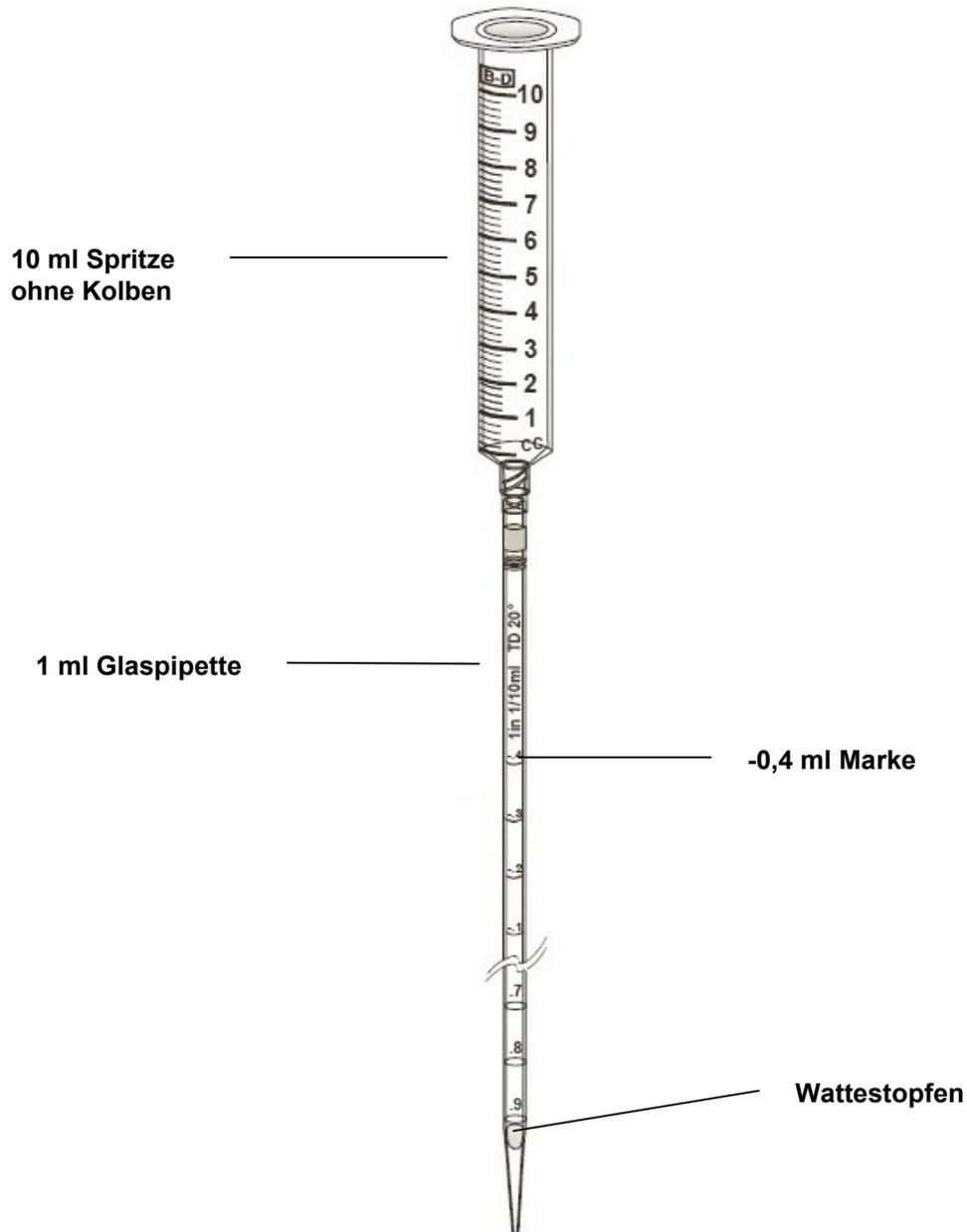


Abb. 7: Aufbau der Sepharosesäule

4.5.8 Agarosegel-Elektrophorese der 12 verschiedenen cDNA-Fractionen

Zur Herstellung eines 1,3%igen Agarosegels wurden 0,57 g Agarose in 44 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,0, 1 mM EDTA) gekocht und nach Abkühlung auf ca. 40°C mit 1,2 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung versetzt und in eine Elektrophoresekammer gegossen. Von den 12 verschiedenen cDNA-Fractionen wurden jeweils 15 µl zusammen mit 1,5 µl 10x Agarosepuffer (1% SDS, 0,25% Bromphenolblau, 15% Ficoll 400, 0,1 M EDTA) auf das Gel aufgetragen und bei 35 V und 40 mA 60 Minuten aufgetrennt. Als Größenstandard dienten 10 µl (0,05 µg/µl) einer 1 kb-DNA-Leiter (in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl und 0,1 mM EDTA). Durch Interkalation des im Gel vorhandenen Ethidiumbromids zwischen den Basen des cDNA-Doppelstrangs wurden die Banden des cDNA-Produkts im UV-Licht (312 nm) durch Fluoreszenz sichtbar gemacht und fotografiert (siehe Abbildung 8). Die 4 längsten cDNA-Inserts wurden gemeinsam in ein neues Gefäß überführt.

Fraktion Nr.:

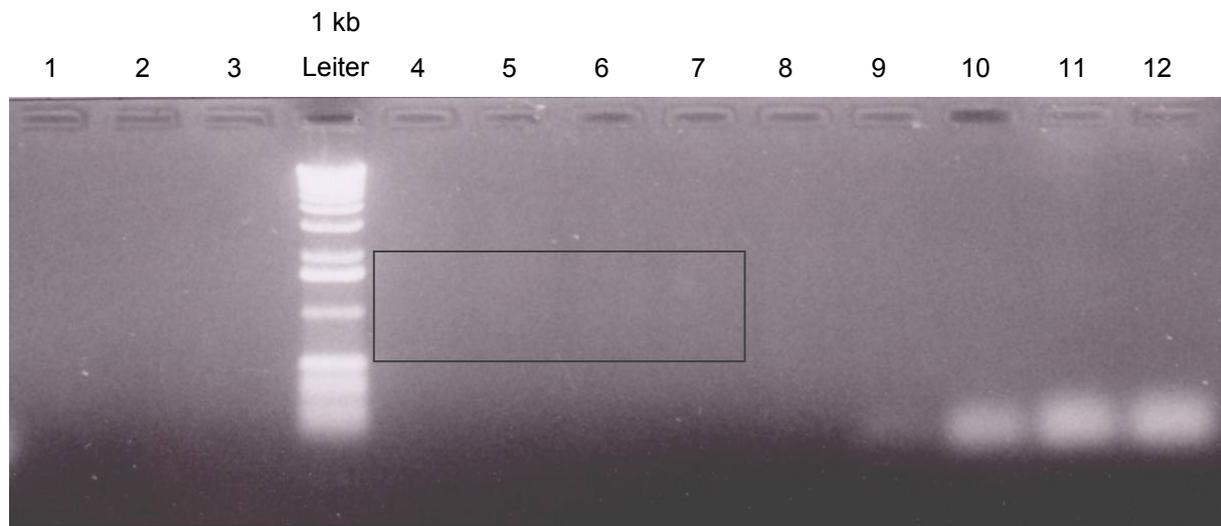


Abb. 8: Agarosegel-Elektrophorese der 12 cDNA-Fractionen. Die Lage der Banden von Fraktion Nr. 4, 5, 6 und 7 ist mit einem schwarzen Rahmen gekennzeichnet, da diese auf dem Foto sehr schlecht zu erkennen sind.

4.5.9 Reinigung der cDNA-Fractionen

Da die cDNA-Fractionen für die weiteren Schritte gereinigt werden mussten, wurde in die Lösung 1 Volumen Phenol-Chloroform zugegeben, vermischt und danach 2 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde wiederum in ein neues Gefäß übertragen, 1 Volumen Chloroform zugegeben, vermischt und 2 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut in ein neues Gefäß gegeben.

4.5.10 Fällung der cDNA

Um die cDNA zu fällen wurde in die Lösung 1 Volumen Ethanol 100% gegeben und über Nacht bei -20°C in den Gefrierschrank gestellt. Am nächsten Morgen wurde die cDNA-Lösung in der Kühlzentrifuge bei 4°C für 60 Minuten zentrifugiert und danach abdekantiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 200 μl Ethanol (80%) gewaschen und erneut zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Sobald das Pellet nur noch leicht feucht war, wurde es in 3 μl sterilem demineralisierten Wasser gelöst und 0,5 μl der Lösung zur cDNA-Quantifizierung abgenommen. Es verblieben 2,5 μl cDNA-Lösung für die Ligation in den ZAP Express Vektor.

4.5.11 cDNA-Quantifizierung

Da für die Ligation der cDNA in den ZAP Express Vektor eine Verdünnung von 100 ng/ μl benötigt wurde, musste die erstellte cDNA quantifiziert werden. Für die Quantifizierung wurde ein 0,8%iges Agarose-Gel hergestellt (siehe Abschnitt 4.5.8), das 1 μl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung enthielt und in eine Petrischale gegossen. Danach wurde in der Mitte die 0,5 μl der cDNA aus Abschnitt 4.5.10 aufgetragen und außen herum kreisförmig je 0,5 μl von 7 DNA-Lösungen bekannter Konzentrationen (10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 ng/ μl in 100 mM EDTA) aufgetragen und unter UV-Licht fotografiert. Auf dem Photoabzug wurde zur Quantifizierung die Fluoreszenz der cDNA in der Mitte mit denen der umliegenden bekannten Konzentrationsstandards verglichen. Die zu bestimmende cDNA in der Mitte ähnelte am ehesten der Kontroll-cDNA mit der Konzentration 100 ng/ μl (siehe Abbildung 10, Kapitel 5.2). Da der ZAP Express Vektor für ein Optimum von

100 ng/ μ l cDNA ausgelegt ist, konnten die 2,5 μ l cDNA-Lösung aus Abschnitt 4.5.10 ohne Verdünnung verwendet werden.

4.5.12 Ligation der cDNA in den ZAP Express Vektor

Um die cDNA in den ZAP Express Vektor zu ligieren wurde in die 2,5 μ l cDNA-Lösung folgende Bestandteile des Kits pipettiert: 0,5 μ l 10x Ligase-Puffer, 0,5 μ l 10 mM rATP (pH 7,5), 1 μ l ZAP Express Vektor (1 μ g/ μ l) und 0,5 μ l T4 DNA-Ligase (4 U/ μ l). Die Reaktion wurde zwei Tage lang bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Die Zusammensetzung der Puffer wird von der Herstellerfirma nicht angegeben.

4.6 Packen des Ligationsprodukt in λ -Helfer-Phagen

Die Lambda-Helfer-Phagen wurden zusammen mit der *Escherichia coli*-Zelllinie XL1-Blue MRF' (RecA⁻) ausplattiert. Der pBK-CMV Phagen-Vektor kann in XL1-Blue MRF'-Zellen eindringen und hat in den Bakterien mehrere Funktionen:

Erstens beinhaltet er eine Sequenz, die für die α -Region des lacZ-Gens kodiert, das der Δ M15-Mutante des Wirtsbakteriums fehlt. Um ein enzymatisch aktives β -Galaktosidase-Protein zu produzieren sind zwei Domänen Voraussetzung: Die α -Region, die vom Vektor exprimiert wird und die Δ M15 lacZ-Region, die vom F'-Episom exprimiert wird. Diese beiden Regionen formen das funktionstüchtige Protein, da die α -Region die fehlenden Aminosäuren der Δ M15-Mutante ersetzt.

Zweitens exprimiert das F'-Episom die Gene für die F'-Pili an der Oberfläche der Bakterien. Diese werden später von einem zusätzlichen Helferphagen benötigt, der zur *in vivo*-Exzision des cDNA-Inserts aus dem pBK-CMV-Phagenvektor benötigt wird.

Drittens beinhaltet das F'-Episom das lacIq-Gen, welches die Transkription des lacZ-Promoters in Abwesenheit von IPTG unterdrückt. Dies ist notwendig, um die Expression von Fusions-Proteinen zu unterdrücken, die für *E. coli* tödlich sein

könnten. Da die Gegenwart vom lacIq-Repressor im *E. coli*-Gaststamm auf diese Weise die Repräsentation und Komplettierung der Bank verbessern kann, eignet sich XL1-Blue MRF' sehr gut als Wirtszelle.

Die β -Galaktosidase spaltet das Zuckerderivat X-Gal, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Wird die cDNA in den Polylinker des Vektors eingebaut, ist die α -Region zerstört und das Produkt der Δ M15 lacZ-Mutante kann nicht mehr zur vollständigen β -Galaktosidase komplettiert werden. Somit kann das im Agar enthaltene X-Gal nicht mehr gespalten werden und es entstehen weiße Plaques. Dies ist demnach ein Hinweis für ein vorhandenes Insert. Sollte kein Insert in den Polylinker eingefügt worden sein, kann die β -Galaktosidase exprimiert werden und durch Spaltung des X-Gals entstehen blaue Plaques.

Zur praktischen Durchführung wurde die gesamte Menge des Ligationsansatzes in den zuvor gefrorenen „Gigapack III Gold Packaging Extract“ (aus dem Kit) im Moment des Auftauens gegeben und gemischt. Damit die Helfer-Phagen an die cDNA des Ligationsansatzes binden konnten, wurde der Ansatz für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 500 μ l SM-Puffer und 20 μ l Chloroform zugegeben. Um die ungepackten Phagenreste zu sedimentieren, wurde die Lösung kurz anzentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die gepackten Phagen.

4.7 Ausplattieren und Titerbestimmung

Zur Herstellung einer Flüssigkultur der Wirtsbakterien wurde von einer auf LB-Tet-Agar ausplattierten XL1-Blue MRF'-Kultur mit einer Impföse ein Klon gepickt und in 50 ml Luria-Bertani (LB) Kulturmedium (10 g NaCl, 10 g Trypton und 5 g Hefeextrakt mit deionisiertem H₂O ad 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert) angeimpft. Zusätzlich wurden 500 µl einer 20%igen Maltoselösung und 500 µl 1 M MgSO₄ hinzu gegeben und die Kultur über die Nacht unter Schütteln bei 30°C im Brutschrank bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Bakterien bei 1000 x g herunterzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml einer 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. Im Anschluss wurden die Bakterien photometrisch mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt.

Für die Titerbestimmung wurden zwei Verdünnungen (10⁻¹ und 10⁻²) der Phagenlösung mit SM-Puffer (5,8 g NaCl, 2,0 g MgSO₄, 50 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 5 ml 2%ige Gelatine mit deionisiertem H₂O ad 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert) angefertigt. Zur Infektion wurde zu drei Ansätzen mit je 200 µl Wirtsbakterien (OD₆₀₀ von 0,5) jeweils 1 µl Phagenlösungen mit den Verdünnung 10⁰ (unverdünnt), 10⁻¹ und 10⁻² zugegeben und 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, damit sich die Phagen an die Wirtsbakterien anlagern konnten. Zum Ausplattieren wurden zu jedem Ansatz 3 ml geschmolzener und auf etwa 50°C abgekühlter NZY Top-Agar (5 g NaCl, 2 g MgSO₄, 5 g Hefeextrakt und 10 g NZ Amin mit deionisiertem H₂O ad 1 Liter aufgefüllt, auf einen pH von 7,5 mit NaOH eingestellt und autoklaviert), 15 µl IPTG (0,5 M in H₂O) und 50 µl X-Gal (250 mg/ml in DMF) zugegeben und sofort auf einer Platte (Durchmesser: 9 cm) mit NZY-Agar (5 g NaCl, 2 g MgSO₄, 5 g Hefeextrakt, 10 g NZ Amin und 15 g Agar, mit deionisiertem H₂O ad 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert) ausplattiert. Nach 12 Stunden Bebrüten bei 37°C waren weiße und blaue Plaques erkennbar (siehe Abbildung 11, Kapitel 5.3). Nun konnte der Phagentiter durch Auszählen der „Plaque Forming Units“ (pfu) mit folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{Anzahl der Plaques (pfu)} \times \text{Lösungsfaktor}}{\text{Ausplattiertes Volumen (in } \mu\text{l)}} \times 1000 \mu\text{l /ml}$$

4.8 Dot Blot Test

Der Dot Blot-Test erfolgte, um eine geeignete Konzentration der Antikörper für das Immunoscreening zu bestimmen. Weiterhin sollten unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers an die Nitrozellulose und/oder an den zweiten Antikörper sowie Kreuzreaktionen mit *E. coli* erkannt werden. Der Dot Blot Test wurde nach der Anleitung des „PicoBlue Immunoscreening Kits“ (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Als erster Antikörper dienten polyklonale Kaninchen Anti-*E. cuniculi* Serum-Immunglobuline (siehe Kapitel 4.3). Für den zweiten Antikörper wurden Peroxidase-konjugierte Schwein Anti-Kaninchen Immunglobuline (Firma Dako, Dänemark) verwendet.

Zur praktischen Durchführung wurden fünf Verdünnungen des Antigens (10^{-1} – 10^{-5}) in TBS („Tris Buffered Saline“: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) erstellt, das zuvor mit 50 μ l Triton-X 100, 50 μ l 1 M Tris-HCl und 945 μ l H₂O 5 Minuten in 100°C heißem Wasser inkubiert wurde. Des Weiteren wurden fünf Verdünnungen (10^{-1} – 10^{-5}) in Blockungslösung [1% fötales Kälberserum (FKS) in TBS] des 1. Antikörpers und drei Verdünnungen (10^{-1} – 10^{-3}) in Blockungslösung des *E. coli*-Phagen-Lysats (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,0) erstellt. Aus Nitrocellulosefiltern wurden 6 Streifen (ca. 2 x 7 cm) ausgeschnitten und mit einem Bleistift 12 Quadrate eingezeichnet. Auf fünf Nitrocellulosestreifen wurde in die Quadrate der obersten Reihe je 1 μ l des lysierten Antigens in den aufsteigenden Konzentrationen (10^0 – 10^{-5}) aufgetragen, in die Reihe darunter je 1 μ l der vier unterschiedlichen Konzentrationen des *E. coli*-Phagen-Lysates. Auf dem sechsten Streifen wurde allein die Konzentration des ersten Antikörpers aufgetragen. Nach dem Trocknen an der Luft wurden alle 6 Streifen in 25 ml Blockungslösung für 1 Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Danach wurden alle Teststreifen dreimal in 25 ml TBST [Tris Buffered Saline mit Tween 20 (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20)] gewaschen. Es wurden fünf Verdünnungen des ersten Antikörpers (10^{-2} – 10^{-6}) in Blockungslösung hergestellt, um danach in jeder Lösung je einen Streifen für 1,5 Stunden zu inkubieren. Der sechste Streifen wurde separat in einer Schale mit 25 ml TBST beiseite gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden alle 6 Streifen dreimal in TBST für 5 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurden die 6 Streifen in einer Lösung, die den zweiten Antikörper in einer Konzentration von

3×10^{-3} in Blockungslösung enthielt, für 1,5 Stunden inkubiert und danach viermal in TBST für 5 Minuten gewaschen. Um die Farbreaktion zu starten wurden in 21 ml TBS 12,5 μ l H_2O_2 (30%) und 12,5 mg 4-Chloro-1-Naphtol, das in 4 ml eiskaltem ($-20^\circ C$) Methanol (100%) aufgelöst wurde, gegeben. In diese Lösung wurden alle 6 Teststreifen 20 Minuten zum Entwickeln hineingelegt. Zum Beenden der Farbreaktion wurden die Teststreifen mehrmals mit demineralisiertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet (siehe Abbildung 12, Kapitel 5.4).

4.9 Ausplattieren der Phagensuspension

Die gesamte verbliebene Phagensuspension wurde auf 2 x 250 μ l Lösung aufgeteilt und zusammen mit jeweils 600 μ l XL1-Blue MRF¹-Zellen (OD_{600} von 0,5) vermischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei $37^\circ C$, wurden die beiden Phagenlösungen mit etwa jeweils 15 ml NZY-Topagar auf 2 großen NZY-Platten (\varnothing 15 cm) ausplattiert. Die Platten wurden etwa 8 Stunden bei $42^\circ C$ bebrütet, bis erste Plaques sichtbar waren. Nun wurde auf jede Platte ein Nitrozellulosefilter, der zuvor in 10 mM IPTG-Lösung getränkt und an der Luft getrocknet worden war, aufgelegt. Das IPTG dient als Indikator und erhöht dadurch die Proteinexpression in den Bakterien.

Beide Platten wurden 4 Stunden bei $37^\circ C$ bebrütet. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lage des Filters auf dem Agar mit einer in Tusche getauchten Nadel markiert und der Filter abgezogen, sofort 3 mal für je 5 Minuten in TBST gewaschen und über Nacht in Blockungslösung gelegt. Über Nacht wurde gleichzeitig ein zweiter Filter, der wiederum mit 10 mM IPTG-Lösung behandelt worden war, auf die Agarplatten gelegt und die Zellen bei $37^\circ C$ bebrütet. Am nächsten Morgen wurde jetzt auch die Lage des zweiten Filters markiert, der Filter abgezogen, dreimal für 5 Minuten in TBST gewaschen und 1 Stunde in Blockungslösung gelegt. Die zwei NZY-Platten wurden während des Immunoscreenings bei $4^\circ C$ im Kühlschrank gelagert.

4.10 Immunoscreening

Als Antikörper zum Immunoscreening dienten Polyklonale Kaninchen Anti-*E. cuniculi* Serum-Immunglobuline (1. Antikörper, siehe Kapitel 4.3) und Peroxidase-konjugierte Schwein Anti-Kaninchen Immunglobuline (2. Antikörper, Firma Dako, Dänemark). Beim Immunoscreening wurden alle 4 Filter zuerst mit dem 1. Antikörper mit der im Dot Blot Test als optimal bestimmte Verdünnung von 1:3000 für 1,5 Stunden bei leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Filter dreimal 5 Minuten lang mit TBST gewaschen und mit dem 2. Antikörper mit einer Verdünnung 1:3000 wiederum für 1,5 Stunden bei leichtem Schütteln inkubiert. Alle Filter wurden erneut 3 mal mit TBST gewaschen und anschließend mit TBS, um eventuelle Tween-Reste zu entfernen. Zum Entwickeln wurden in 16 ml eiskaltem (-20°C) Methanol (100%) 84 ml TBS 50 µl H₂O₂ (30%) und 50 mg 4-Chloro-1-Naphtol aufgelöst. Hierin wurden die Filter 20 Minuten lang entwickelt und danach dreimal in demineralisiertem Wasser gewaschen, um die Farbreaktion zu beenden. Alle Filter wurden an der Luft getrocknet (siehe Abbildung 9 und Abbildung 13, Kapitel 5.6).

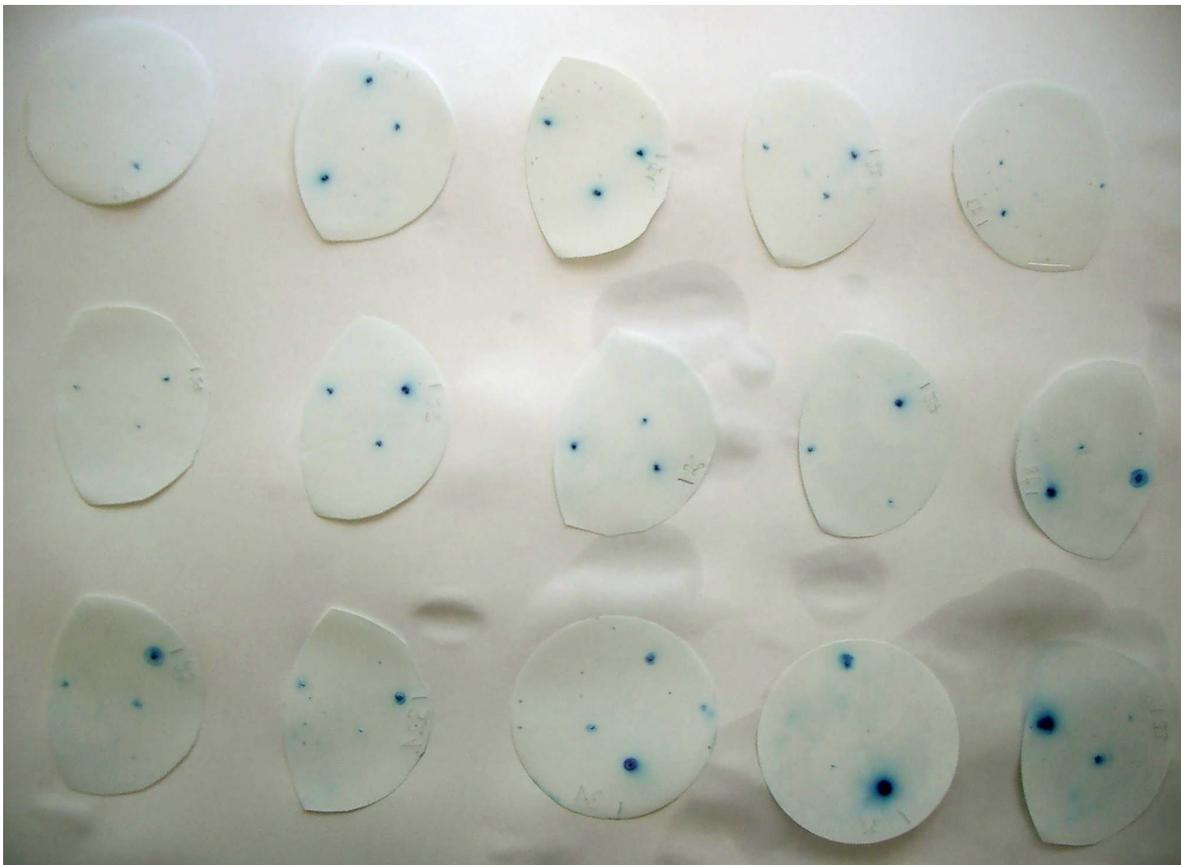


Abb. 9: Foto von entwickelten Filtern nach dem Immunoscreening.

4.11 Ausstechen und Lagerung der positiven Plaques

Nach dem Entwickeln der Nitrocellulosefilter war auf den Filtern die Lage der Plaques zu erkennen, die ein immunogenes rekombinantes Protein exprimiert hatten. Zur Bestätigung wurde jeweils der erste Filter einer Platte mit dem zweiten verglichen und nach Übereinstimmung gesucht, um unspezifische Reaktionen erkennen zu können. Die ausfindig gemachten Plaques wurden nun mit einer abgeschnittenen 1000 µl Pipettenspitze aus dem Agar ausgestochen. Die Pipettenspitze wurde umgedreht, auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und leicht geklopft, damit der Agar in das Gefäß rutschte.

In jedes Gefäß, das einen positiven Plaque enthielt, wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform pipettiert, um alle Wirtszellen zu töten und die Phagen zu suspendieren und lagerungsfähig zu machen. Die Phagen wurden anschließend im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Bevor man mit den Phagen weiterarbeiten konnte, mussten sie mindestens 1 Nacht im Kühlschrank gelagert werden, damit die Phagen aus dem Agar in den SM-Puffer diffundieren konnten.

4.12 Vereinzeln der positiven Phagen

Um die optimale Verdünnung der Phagensuspensionen zu bestimmen, wurde stellvertretend von drei zufällig ausgewählten Suspensionen jeweils eine Verdünnungsreihe in SM-Puffer (10^{-2} - 10^{-6}) angefertigt und diese auf jeweils 5 kleinen NZY-Agarplatten mit 200 µl NZY-Topagar ausplattiert. Nach 8 Stunden Bebrüten wurde die jeweils beste Platte, nämlich dort, wo die Plaques so vereinzelt lagen, dass sie sicher einzeln ausgestochen werden konnten, für das Immunoscreening ausgewählt. Das Ausplattieren, Immunoscreening und Ausstechen lief wie oben beschrieben ab. Die restlichen Phagensuspensionen wurden nur noch in der zuvor als optimale Verdünnung bestimmten Konzentration ausplattiert (siehe Abschnitt 5.5). Insgesamt mussten alle Phagensuspensionen solange erneut ausplattiert und vereinzelt werden, bis entweder alle Plaques positiv waren oder aber sich ein ausgestochener Plaque als negativ herausstellte. Die gewonnenen isolierten

positiven Phagen wurden wie oben beschrieben ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer mit 20 µl Chloroform haltbar gemacht.

4.13 *In vivo-Exzision und Rezirkulation der ausgewählten geklonten Inserts*

Um das Insert der Phagen vervielfältigen zu können, wurden die Phagen *in vivo*-exzidiert und das Insert zu einem Plasmid rezirkularisiert und in Gastzellen eingeschleust. Die *in vivo*-Exzision ist an das Genom des Lambda-Phagen und die Gegenwart von verschiedenen Helfer-Proteinen gekoppelt. So werden die *E. coli*-Gastzellen (XL1-Blue MRF') simultan mit den Lambda-Phagen, die das geklonte cDNA-Insert enthalten und einem Helferphagen (M13) infiziert. Dieser Helferphage ist imstande, in den Gastzellen bestimmte Phagenproteine zu exprimieren, die den Ursprung der Replikation auf der DNA des Lambdavektors erkennen können. Die Proteine heften sich nun an die Initiator-Sequenz des Mutterstranges an, die innerhalb des Lambda-Vektors liegt und beginnen die DNA strangabwärts („downstream“) zu duplizieren. Die DNA-Synthese des neuen Einzelstranges wird durch das geklonte Insert bis zum Terminationssignal fortgesetzt, das sich am 3'-Ende der DNA befindet. Das ssDNA-Molekül wird nun von einem neuen Protein, das ebenfalls vom Helfer-Phagen gebildet wird, zirkularisiert, indem die DNA zwischen Initiator- und Terminatorsequenz in ein zirkularisiertes Molekül geformt wird. Der Vektor beinhaltet nun die komplette Sequenz des Phagen und die des Inserts. Durch die Zirkularisierung der DNA wird automatisch ein funktionstüchtiger f1-Ursprung erstellt, wie er in f1-Bakteriophagen gefunden wird und der die Signalsequenzen zum Packen des neuen „Phagemids“ enthält. Durch sie kann die zirkularisierte ssDNA in die Phagemid-Partikel gepackt werden. Nachdem das Phagemid-Partikel von *E. coli* ausgebildet worden ist, werden die Zellen und Lambda-Phagen, die zur *in vivo*-Exzision verwendet worden sind, durch 70°C Hitzebehandlung lysiert, bzw. denaturiert. Das Phagemid wird von der Hitze nicht beeinflusst. Ein weiterer *E. coli*-Stamm (XL0LR) wird nun mit dem Phagemid infiziert und auf einem selektiven Nährboden, der das Antibiotikum Kanamycin enthält, ausplattiert. Da das Phagemid in seinem Genom ein Kanamycinresistenzgen eingebaut hat, können somit auf dem Nährboden nur *E. coli*-Zellen wachsen, die ein Phagemid aufgenommen haben.

Zur Durchführung wurde am Abend vor der geplanten *in vivo*-Exzision jeweils von einem Drei-Ösen-Ausstrich von XL1-Blue MRF'- und XLOLR-Zellen auf LB-Tet-Agar (15 mg Tetrazyklin in 1 Liter LB Agar) eine Kolonie gepickt und jeweils in 50 ml LB-Medium mit Supplementen (500 µl 1 M MgSO₄ und 500 µl 20%ige Maltose) angeimpft und über Nacht bei 30°C bebrütet. Am nächsten Morgen wurden die beiden Übernachtskulturen jeweils bei 1000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die beiden Pellets mit je 10 ml 10 mM autoklaviertem MgSO₄ resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 1,0 verdünnt.

Die Phagensuspensionen wurden kurz anzentrifugiert, damit sich das Chloroform am Boden abtrennen konnte. Danach wurden pro LB-Tet-Agarplatte in ein 15 ml Zentrifugiergefäß 250 µl Phagensuspension, 200 µl XL1-Blue-MRF' Zellen mit einer OD₆₀₀ von 1,0 und 1 µl „ExAssist“ Helfer-Phagen pipettiert. Damit sich die Phagen an die Zellen anheften konnten, wurden sie für 15 Minuten bei 37°C ins Wasserbad gestellt. In jede Lösung wurde nun 3 ml LB-Medium mit Supplementen (30µl 1 M MgSO₄ und 30 µl 20%ige Maltose) hinzugegeben und für 3 Stunden bei 37°C unter Schütteln bebrütet. Nach dieser Zeit wurden die Lösungen im Wasserbad für 20 Minuten auf 70°C erhitzt, um die Lamda-Phagen-Partikel zu denaturieren und die Zellen zu lysieren. Danach wurden die Lösungen bei 1000 x g für 15 Minuten zentrifugiert, um die Zellreste abzuzentrifugieren. Im Überstand waren jetzt die ausgeschnittenen pBK-CMV Phagemide als fadenförmige Phagen-Partikel gepackt.

Zum Ausplattieren dieser Phagen wurden pro Phagensuspension in zwei 1,5 ml Mikrozentrifugengefäße jeweils 200 µl XLOLR Zellen mit einer OD₆₀₀ von 1,0 pipettiert. Jetzt wurde jeweils in das erste Gefäß 10 µl und in das zweite 100 µl Phagenüberstand einer Lösung pipettiert. Die Gefäße wurden für 15 Minuten bei 37°C ins Wasserbad gestellt, damit die Phagen in die Wirtszellen eindringen konnten. Nach Ablauf dieser Zeit wurde in jedes Gefäß 300 µl NZY-Medium gegeben und die Gefäße 45 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. XLOLR-Zellen, die einen Phagen aufgenommen hatten, bildeten nun eine Kanamycin-Resistenz aus, da der Phage unter anderem dafür kodierte. Nun wurden jeweils 200 µl dieser Suspension auf Kanamycin-Agar (50 µg/ml) ausplattiert. Die Agar-Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C bebrütet.

4.14 Plasmid „Miniprep“ mit E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I

Mit dem Kit können bis zu 25 µg hochreine Plasmid-DNA aus einer Übernachtskultur isoliert werden. Dabei werden die Plasmide durch modifizierte alkalische Lyse (siehe unten) aus den Bakterien freigesetzt und selektiv an die Silikamembran gebunden. Durch Waschen werden Kontaminationen und Enzyminhibitoren entfernt. Die Plasmid-DNA wird mit 10 mM Tris•HCl eluiert.

Um eine ausreichende Menge eines gewünschten Plasmids aus einer Kolonie zu bekommen, wurde diese zuerst in einer Übernachtskultur vermehrt. Dazu wurde pro *E.coli*-Kolonie mit dem gewünschten Plasmid in einen 10 ml fassenden Glaskolben 5 ml LB-Medium, das 50 µg/ml Kanamycin enthielt, gefüllt. Nun wurde eine Kolonie mit einer Impföse gepickt, damit das Nährmedium angeimpft und für 16 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml der Übernachtskultur entnommen, in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß 1 Minute bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, so dass insgesamt pro Kultur 3 ml Nährmedium verwendet wurden.

Nun wurde das Bakteriensediment durch sorgfältiges Resuspendieren in 250 µl Lösung I/RNase A resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 250 µl Lösung II und mehrmaliges Invertieren aufgeschlossen. Die Zugabe von 350 µl Lösung III und darauffolgendes mehrmaliges Invertieren neutralisierte das Lysat. Die Lösungen wurden jetzt für 10 Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert und der klare Überstand, der die Plasmide enthielt, in eine Ionenaustauschsäule (HiBind-Miniprep-Zentrifugensäule), die in ein 2 ml Sammel-Tube gesteckt war, übertragen. Die Säule wurde 1 Minute zentrifugiert, bis das Lysat vollständig die Silikamembran passierte, dann mit 500 µl HB-Puffer gewaschen und erneut für eine Minute zentrifugiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit jeweils 750 µl DNA-Waschpuffer und die Zentrifugation für 1 Minute. Nun wurde die leere Zentrifugensäule durch einminütiges Zentrifugieren vollständig getrocknet und danach die Plasmid-DNA mit 75 µl 10 mM TrisHCl durch Zentrifugation aus dem Säulchen eluiert. Die Lösung I, II und III, der HB-Puffer, sowie der DNA-Waschpuffer und die Zentrifugensäulchen waren im genannten Kit enthalten. Die genauen Zusammensetzungen der Lösungen werden von der Herstellerfirma nicht bekannt gegeben.

4.15 Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* und *XhoI*

Um die Länge des DNA-Inserts zu bestimmen, wurden die gewonnenen Plasmide mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut. Dazu wurden pro Ansatz 1,2 µl 10x Puffer, 0,5 µl *EcoRI*, 0,5 µl *XhoI* und 9,8 µl Plasmid-DNA eingesetzt. Die Lösungen wurden 90 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und danach zusammen mit 1,5 µl Agarosepuffer auf ein 1,3%iges Agarose-Gel mit 1 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung aufgetragen.

Nach dem Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* und *XhoI* zeigte sich, dass viele Klone Inserts gleicher Länge trugen. Für die nachfolgenden Sequenzierungen wurden 10 Klone mit Inserts von unterschiedlicher Größe ausgewählt.

4.16 Sequenzieren der Plasmid-DNA

Um die cDNA-Sequenzen der Inserts zu bestimmen, wurde die Plasmid-DNA durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sequenziert. Zum Versand wurde die DNA gefällt. Dazu wurden die verbliebenen 50 µl Plasmid-DNA-Lösung pro gewünschte Sequenzierung auf zwei Mikrozentrifugengefäße gleichmäßig verteilt und mit 10 mM TrisHCl (pH = 8) ad 100 µl aufgefüllt. In jedes Gefäß wurden 12,5 µl 10 M Ammonium-Acetat und 100 µl Ethanol (98%) gegeben und die DNA 2 Stunden bei -20°C gefällt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Gefäße für 10 Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, abdekantiert und die Pellets mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die Gefäße wurden erneut für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Pellets getrocknet.

Das Plasmid ist mit Schnittstellen für verschiedene Primersequenzen ausgestattet, u.a. für T3 (Upstream-Primer) und T7 (Downstream-Primer). Die ausgewählten Klone wurden mit diesen Primer von beiden Seiten sequenziert. Sieben Inserts waren zu groß, um auf diese Weise vollständig sequenziert werden zu können. Deswegen wurde ein neuer Primer SWP-3 (Upstream-Primer) anhand der bereits vorliegenden Sequenz konstruiert, mit dem nun auch das Mittelstück sequenziert werden konnte.

Methoden

Sequenzierprimer:

T3 (Upstream): 5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'

T7 (Downstream): 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

SWP-3 (Upstream): 5'-GGA YCA GTA CAA GAA GGC-3'

5 Ergebnisse

5.1 Kultur von *Encephalitozoon cuniculi* und mRNA-Isolierung

Für die mRNA-Isolierung konnten 5×10^8 freie *E. cuniculi*-Sporen und die verbliebenen, sporenhaltigen MRC-5-Fibroblasten geerntet werden. Nach der Reinigung der Gesamt-RNA und anschließenden Isolierung der mRNA konnte photometrisch ein mRNA-Gehalt von 4,25 μg (gelöst in 727,5 Elutions-Puffer) gemessen werden. Somit wurde das für das cDNA-Synthese Kit empfohlene Optimum von 5 μg mRNA nicht ganz erreicht.

5.2 cDNA-Quantifizierung

Da das ZAP Express cDNA-Synthese-Kit für eine Menge von 100 ng cDNA pro Ansatz ausgelegt ist, musste die Menge der aus der mRNA revers transkribierten cDNA quantifiziert werden. Dazu wurde ein Aliquot der zu bestimmenden cDNA-Lösung in die Mitte eines mit Etidiumbromid versetzten Agarosegels aufgetragen und kreisförmig mit 7 verschiedenen Lösungen bekannter DNA-Mengen umgeben und die Fluoreszenzintensitäten der Referenz-DNA-Lösungen mit der zu bestimmenden cDNA-Lösung verglichen (siehe Abbildung 10).

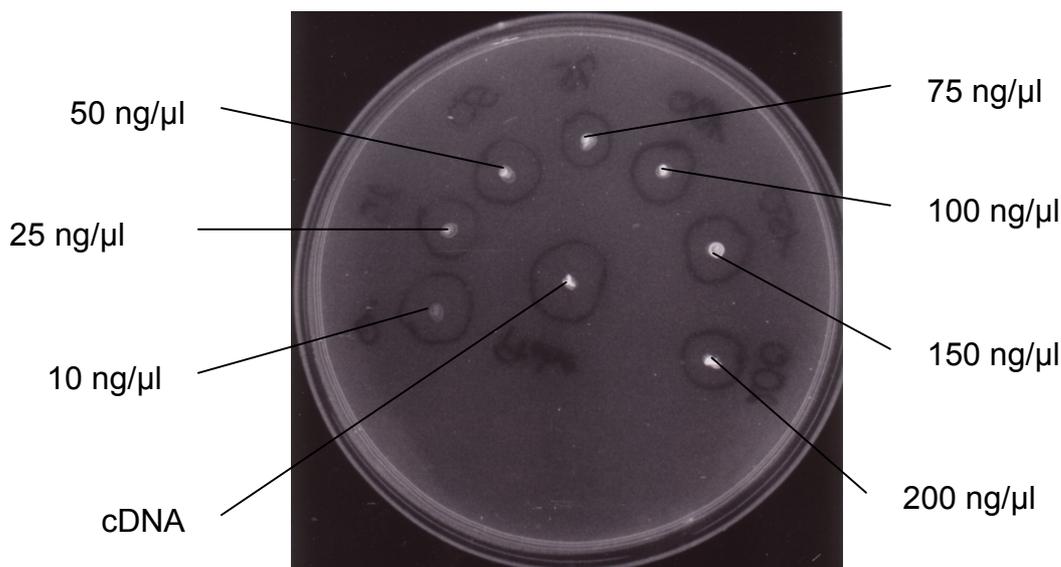


Abb. 10: cDNA-Quantifizierung

Eine vergleichbare Intensität der zu bestimmenden cDNA-Lösung wurde annähernd mit der 100 ng/μl enthaltenden Referenz-DNA-Lösung ermittelt. In dieser Konzentration konnte die cDNA-Lösung für die weiteren Schritte unverdünnt eingesetzt werden.

5.3 Ligation in Phagen zur rekombinanten Proteinexpression

Die cDNA wurde in den ZAP Express Vektor ligiert und das Ligationsprodukt in λ-Helfer-Phagen gepackt. Zur Titerbestimmung wurden Aliquots von jeweils 200 μl Wirtsbakterien mit einer unverdünnten sowie mit zwei mit SM-Puffer verdünnten (1:9 und 1:99) Phagensuspensionen angefertigt und auf NZY-Agar zusammen mit Host-Bakterien ausplattiert. Nach 12-stündigem Bebrüten fanden sich auf der Platte mit der unverdünnten Phagensuspension 60 weiße und 15 blaue Plaques (siehe Abbildung 11). Nach folgender Formel für die „Plaque Forming Units“ (pfu) errechnete sich daraus ein Phagentiter von 375 pfu/ml und aus dem Verhältnis von weißen (mit einligiertem Insert) zu blauen Plaques (ohne Insert) eine Rekombinationsrate von 4:1.

$$\frac{75 \text{ pfu}}{200 \mu\text{l}} \times 1000 \mu\text{l/ml} = 375 \text{ pfu/ml}$$

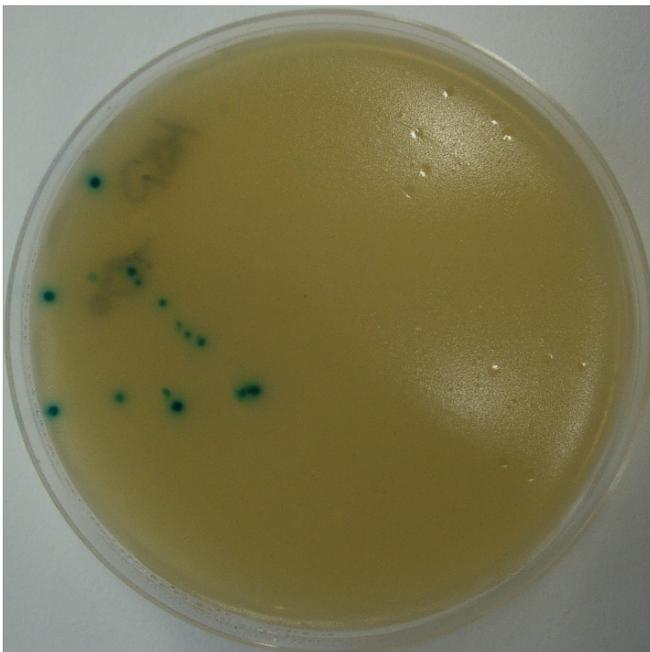


Abb. 11: NZY-Platte mit blauen und weißen Plaques zur Bestimmung der „Plaque Forming Units“.

5.4 Dot Blot Test

Der Dot Blot-Test erfolgte, um eine geeignete Verdünnung für den 1. Antikörper (polyklonale Kaninchen Anti-*E. cuniculi* Serum-Immunglobuline) für das Immunoscreening ausfindig zu machen. So musste aufgezeigt werden, inwieweit der Antikörper an die Nitrozellulose bindet und inwieweit er mit dem 2. Antikörper (Peroxidase-konjugierte Schwein Anti-Kaninchen Immunglobuline) reagiert. Weiter sollten eventuelle Kreuzreaktionen mit *E. coli*-Antigenen erkannt werden. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen des lysierten Antigens (10^0 [unverdünnt], 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5}) und eines *E. coli*-Phagenlysates (10^0 [unverdünnt], 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3}) mit dem ersten Antikörper in den Verdünnungen 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} inkubiert. Auf einem sechsten Streifen wurde der 1. Antikörper alleine in den Verdünnungsstufen 10^0 (unverdünnt), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} aufgetragen. Anschließend wurden alle 6 Streifen mit dem 2. Antikörper mit der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:3000 inkubiert (siehe Abbildung 12).

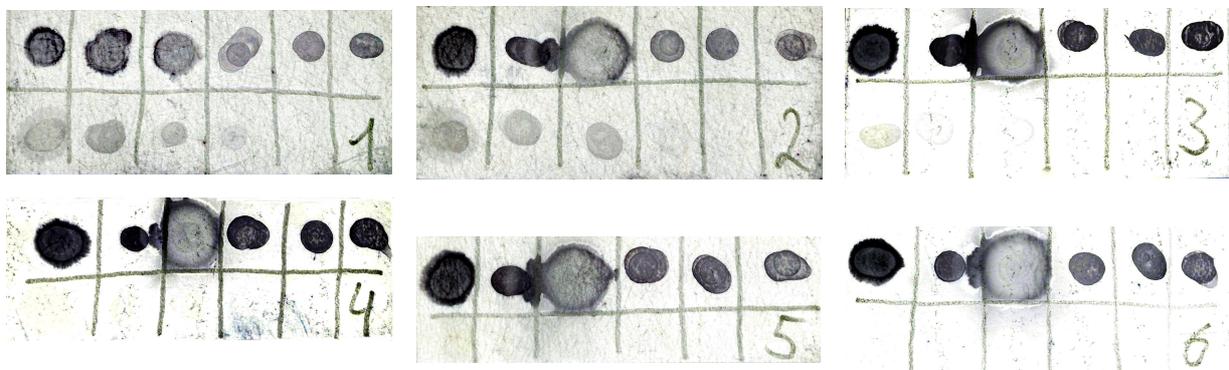


Abb. 12: Dot Blot Test: In der oberen Reihe der Teststreifen Nr. 1-5 sind jeweils 1 µl des lysierten Antigens in den Verdünnungsstufen 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} , in der unteren Reihe jeweils 1 µl des *E. coli*-Phagen-Lysates in den Verdünnungsstufen 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} aufgetragen. Auf dem sechsten Streifen ist je 1 µl des ersten Antikörpers (polyklonale Kaninchen Anti-*E. cuniculi* Serum-Immunglobuline) in den Verdünnungsstufen 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} alleine aufgetragen. Die ersten 5 Streifen wurden in verdünnten Antiseren mit dem 1. Antikörper in den Verdünnungsstufen 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} inkubiert.

Nachdem das Ergebnis mittels Farbreaktion sichtbar gemacht wurde, zeigte sich, dass der 1. Antikörper noch in einer Verdünnung von 10^{-6} reagierte. Auf den Teststreifen mit den Nummern 1-2 (entsprechend den Antiseren-Verdünnungen 10^{-2} und 10^{-3}) waren allerdings deutliche Kreuzreaktionen mit dem *E. coli*- Phagenlysat erkennbar. Da diese Kreuzreaktionen auf Streifen Nr. 3 (Verdünnungsstufe 10^{-4}) auch bei der höchsten *E. coli*-Phagenlysatkonzentration nur noch gering ausgeprägt war, wurde als beste Verdünnung für den 1. Antikörper 1:3000 (entsprechend einer Verdünnung zwischen 10^{-3} und 10^{-4}) gewählt.

5.5 Immunoscreening

Nach Ausplattierung der cDNA auf zwei NZY-Platten zusammen mit XL1-Blue MRF'-Zellen, Bebrütung und Auflegen eines mit IPTG getränkten Nitrozellulosefilters auf die sichtbar werdenden Plaques, waren nach der Entwicklung des Nitrocellulosefilter insgesamt 33 Kolonien zu erkennen, die ein immunogenes Protein exprimiert hatten. Diese 33 Kolonien wurden den Plaques auf den Agarböden zugeordnet. Die Plaques wurden durch Ausstechen isoliert und mit den Nummern 1 – 33 bezeichnet (siehe Tabelle 3)

Da der Zellrasen der Agarplatte eine sehr hohe Plaquedichte aufwies, konnte man nicht davon ausgehen, exakt nur einen einzigen Phagenklon ausgestochen zu haben. Deswegen mussten die ausgestochenen Phagen durch nochmaliges Ausplattieren in höheren Verdünnungen vereinzelt werden. Es zeigte sich, dass man die besten Ergebnisse bei 10000- bis 100000-fachen Verdünnungen erhielt. Aus diesem Grund wurden die restlichen Proben zunächst nur noch in einer Verdünnung von 1:30000 ausplattiert. Gegebenenfalls mussten die Proben solange erneut ausplattiert und vereinzelt werden, bis entweder alle Plaques positiv waren oder sich eine Probe als negativ herausstellte (13 Fälle). Insgesamt wurden 31 positive Klone isoliert und weiter charakterisiert (siehe Tabelle 3).

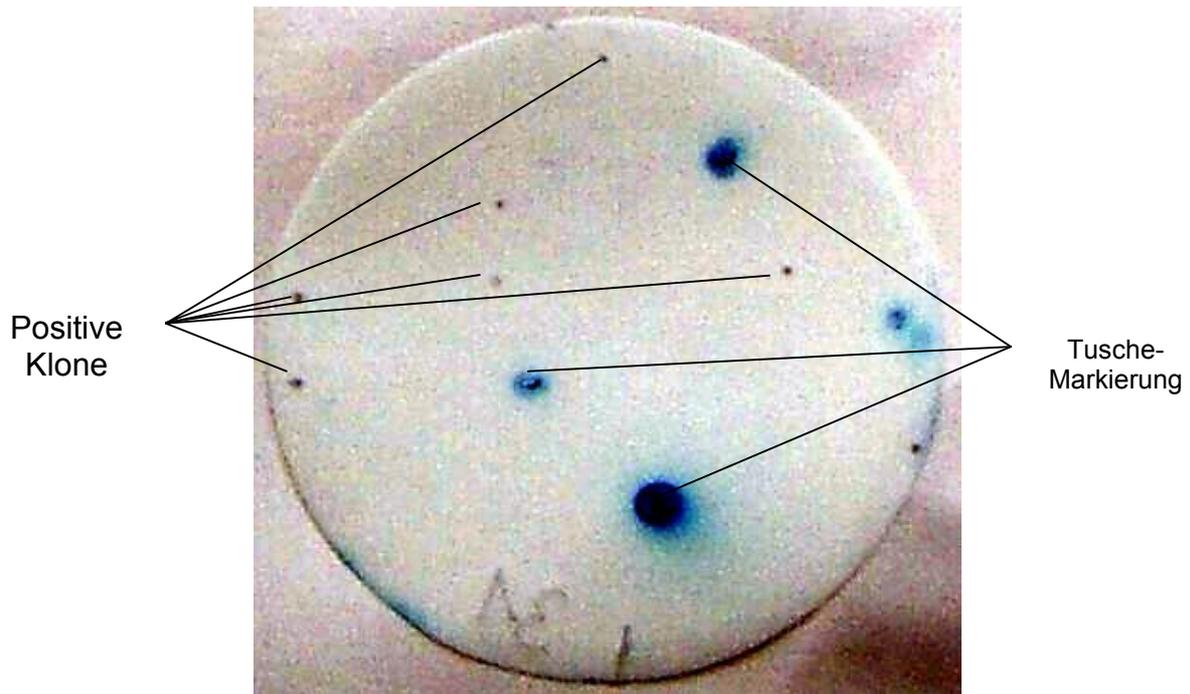


Abb. 13: Nitrozellulosefilter mit Klonen, die eine positive Farbreaktion zeigen

5.6 *In vivo-Exzision und Charakterisierung der cDNA-Inserts*

Zur einfacheren Weiterklonierung der Inserts wurden alle 31 isolierten Phagen *in vivo*-exzidiert, die Inserts zu Plasmiden rezirkularisiert und in *E. coli*-Zellen amplifiziert. Nach Exzision der cDNA-Inserts mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* konnten gelelektrophoretisch cDNA-Längen zwischen 0,45 und 1,1 kb ermittelt werden (siehe Abbildung 14 und Tabelle 3).

Ergebnisse

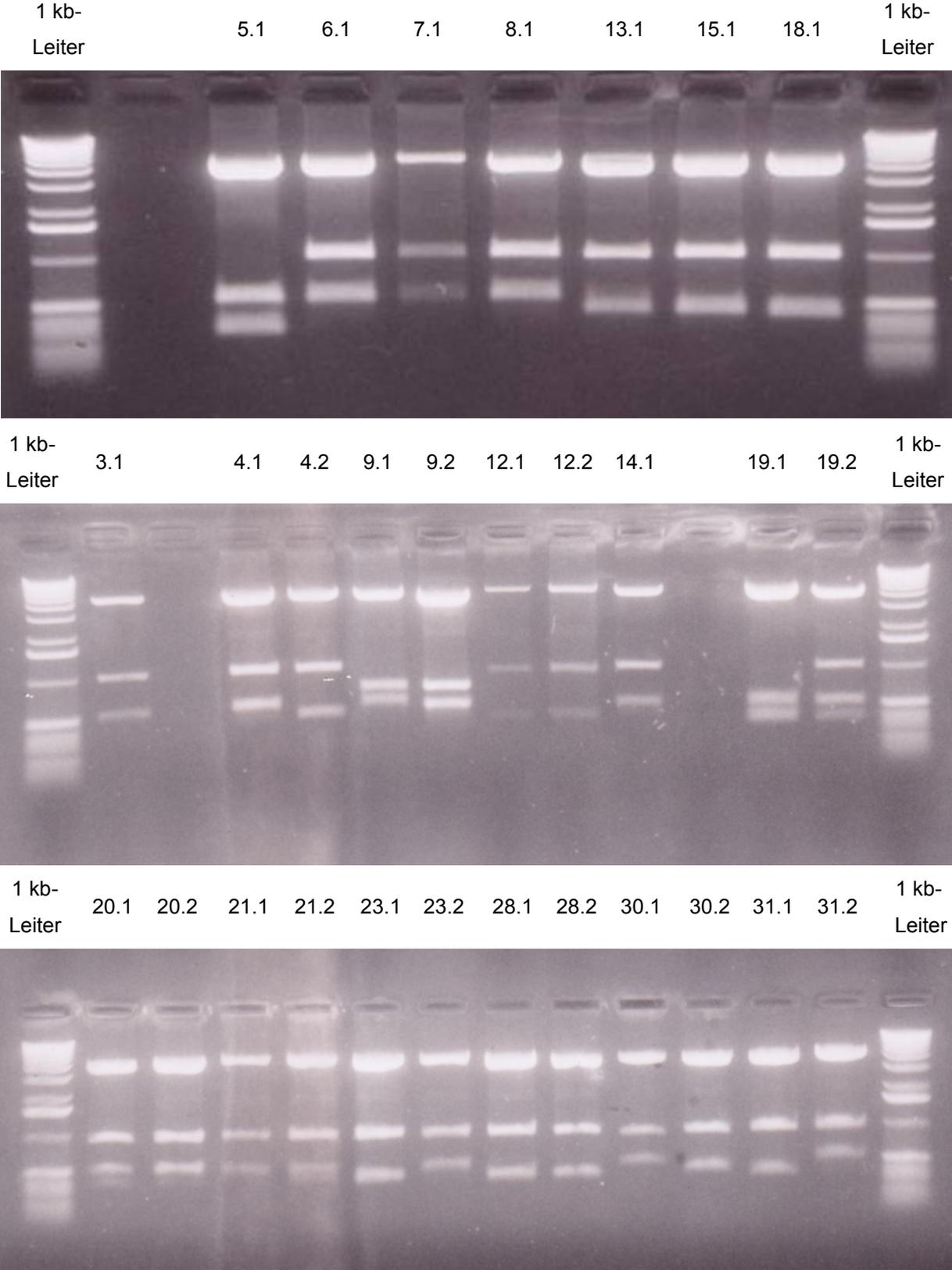


Abb. 14: Gelelektrophoretische Auftrennung der positive Phagenklone nach *in vivo*-Exzision. Die obere Bande entspricht dem Vektor, die Bande(n) darunter dem (zum Teil interne Schnittstellen enthaltenden und deshalb geschnittenen) Insert.

Ergebnisse

Tab. 3: Übersicht über die isolierten Klone (grau unterlegt: ausgewählte Klone für vollständige Sequenzierungen)

| Plaquet-Nr.: | Klon-Nr.: | Insert (kb) | Sequenzierprimer |
|--------------|-------------------------|---|----------------------|
| 1 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 2 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 3 | 3.1 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| 4 | 4.1 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| | 4.2 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| 5 | 5.1 | $0,6 + 0,35 = 0,95$ | T3, T7 |
| 6 | 6.1 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3, T7, SWP-3 |
| 7 | 7.1 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| 8 | 8.1 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| 9 | 9.1 | $0,9 + 0,7 = 1,6$ | T3, T7, SWP-3 |
| | 9.2 | $0,9 + 0,6 = 1,5$ | T3, T7, SWP-3 |
| 10 | 10.1 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3, T7, SWP-3 |
| | 10.8 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| 11 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 12 | 12.1 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| | 12.2 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| 13 | 13.1 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| 14 | 14.1 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| 15 | 15.1 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3, T7, SWP-3 |
| 16 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 17 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 18 | 18.1 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| 19 | 19.1 | $1,1 + 0,6 + 0,3 = 2,1$ | T3, T7 |
| | 19.2 | $0,6 + 0,35 = 0,95$ | T3, T7 |
| 20 | 20.1 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| | 20.2 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| 21 | 21.1 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| | 21.2 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| 22 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 23 | 23.1 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| | 23.2 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| 24 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 25 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 26 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 27 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 28 | 28.1 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| | 28.2 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| 29 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 30 | 30.1 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3 |
| | 30.2 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3 |
| 31 | 31.1 | $1,1 + 0,45 = 1,55$ | T3, T7, SWP-3 |
| | 31.2 | $1,1 + 0,6 = 1,7$ | T3, T7, SWP-3 |
| 32 | Kein Expressionsprodukt | | |
| 33 | Kein Expressionsprodukt | | |

5.7 Analyse der cDNA-Inserts

Da viele Klone identische Restriktionsschnittstellen zeigten, wurden 10 repräsentative Klone (Nr. 5.1, 6.1, 9.1, 9.2, 10.1, 15.1, 19.1, 19.2, 31.1 und 31.2) zur Sequenzierung ausgewählt (siehe Tabelle 3), die sich in der Länge ihres Inserts unterschieden. Da das Plasmid mit Schnittstellen für verschiedene Primersequenzen ausgestattet war, erfolgte die Sequenzierung der 10 ausgewählten Klone von beiden Seiten mit dem „Upstream-Primer“ T3 und „Downstream-Primer“ T7. Sieben Inserts waren zu groß, um auf diese Weise vollständig sequenziert werden zu können. Mit einem neuen Primer (SWP-3), der anhand anfänglich ermittelter Sequenzen konstruiert wurde, erfolgte die Sequenzierung des Mittelstückes des Inserts. Hierauf wurde mit allen 10 Sequenzen der ausgewählten repräsentativen Klone eine Suche nach Homologien mit DNA und Proteinen in der DDBJ/EMBL/Genbank mit der Funktion „BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Bei allen 10 Sequenzen fand sich eine Übereinstimmung in der Genbank mit der Proteinsequenz des „Spore Wall Proteins 1“ (SWP1) (Genbank accession no.: AJ133745) von *Encephalitozoon cuniculi*. SWP1 ist ein Bestandteil der Sporenwand und macht die Spore gegen Umwelteinflüsse resistent. Die kodierende Sequenz des Gens für SWP1 von *E. cuniculi* ist 1350 Basenpaare lang und kodiert für ein Protein von 450 Aminosäuren mit einer Größe von 51 kDa. Die restlichen 21 Klone wurden mit dem Primer T3 von einer Seite ansequenziert. Da sich bei einer erneuten Suche in der Genbank herausstellte, dass deren Inserts ebenfalls für die Sequenz von SWP1 kodierten, wurde auf eine komplette Sequenzierung verzichtet.

5.8 Alignment der cDNA-Sequenzen mit dem SWP1-Gen

Mit den 10 vollständig sequenzierten Klonen und der Genbanksequenz des „Spore Wall Proteins 1“ wurde am Computer mit der Software „DNA-Man“ ein Alignment durchgeführt (siehe Abbildung 15). Abgesehen von einem Abweichen von der Anfangssequenz (GAATTC-GGCACGAGG), was sich durch Ligationsartefakte der Adapter-Oligonukleotide erklären lässt (siehe Kapitel 4.5.4), konnte bei drei Klonen (Nummer 6.1, 10.1 und 31.2) eine vollständige Übereinstimmung mit der in der

Ergebnisse

Genbank veröffentlichten Sequenz für *SWP1* (Genbank accession no.: AJ133745) von *E. cuniculi* nachgewiesen werden. Die restlichen fünf komplett sequenzierten Klone kodierten für Teilabschnitte der Sequenz von *SWP1*, stimmten in diesen Bereichen jedoch vollständig mit der Genbanksequenz überein. Bei drei Klonen (10.1, 19.1 und 19.2) fand sich am Poly-A-Ende eine Abweichung von der Genbanksequenz (siehe Abbildung 15). In Klon 10.1 und Klon 19.2 fand sich jeweils eine unterschiedliche Base an Position 1538 (Klon 10.1: Cytosin anstatt Adenin, Klon 19.2: Guanin anstatt Adenin) und in Klon 19.1 zwei verschiedene Basen an Position 1534 und 1538 (Cytosin und Guanin an Stelle von zweimal Adenin), was zu einer Änderung der kodierten Aminosäure führt. In der cDNA-Sequenz von Klon 15.1 fand sich eine interne Deletion von 101 Basen (zwischen Base Nummer 1080 und 1181) und bei Klon 31.1 eine interne Deletion von insgesamt 152 Basen (Base Nummer 1080 – 1232) jeweils im letzten Drittel der cDNA-Sequenz. Das vollständige Alignment der 10 ausgewählten Klone mit *SWP1* zeigt Abbildung 15:

| | | |
|-------------|--|-----|
| <i>SWP1</i> | AATTAAAGATGATGAAGCTTTCACCTGCTGCTAGGTCTAGTAAGCTTCAGTGCAGT | 55 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ...g--ttcg-cacg--g----- | 52 |
| Klon 9.1 | | 0 |
| Klon 9.2 | | 0 |
| Klon 10.1 | g-a-tcg-cacga-g----- | 55 |
| Klon 15.1 | .gaattc-gcacgagg----- | 54 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 |ga-t-cggcacga-g----- | 35 |
| Klon 31.2 |ga-t-cggcacga-g----- | 35 |
| <i>SWP1</i> | GCTTGCAAGCGAGAACAGAAGGGGAATTGCCAGATGTGCCCTGAAGGTACCAGA | 110 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 107 |
| Klon 9.1 | | 0 |
| Klon 9.2 | | 0 |
| Klon 10.1 | ----- | 110 |
| Klon 15.1 | ----- | 109 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 90 |
| Klon 31.2 | ----- | 90 |

Ergebnisse

| | | |
|-------------|--|-----|
| <i>SWP1</i> | TACTTCGAAAAAACAATCTTCTTGGAAAGGAGGTTCAAGAACGATGTGAGAAAAGC | 165 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 162 |
| Klon 9.1 | | 0 |
| Klon 9.2 | | 0 |
| Klon 10.1 | ----- | 165 |
| Klon 15.1 | ----- | 164 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 145 |
| Klon 31.2 | ----- | 145 |
| <i>SWP1</i> | TCTGCGGTGACGGAATGAGCAGTGATGTCCATGATGAATCTTCATCTCACTCCTC | 220 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 217 |
| Klon 9.1 | | 0 |
| Klon 9.2 | | 0 |
| Klon 10.1 | ----- | 220 |
| Klon 15.1 | ----- | 219 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 200 |
| Klon 31.2 | ----- | 200 |
| <i>SWP1</i> | TTCCTCTTCTGACTGCAAACCAAGAAGAAGGAGACACCATAGAAGATACGAGGAT | 275 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 272 |
| Klon 9.1 | | 0 |
| Klon 9.2 | | 0 |
| Klon 10.1 | ----- | 275 |
| Klon 15.1 | ----- | 274 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 255 |
| Klon 31.2 | ----- | 255 |
| <i>SWP1</i> | AGCTGCTCATTTGGTTCTTCAGACTGCGATGATTCAAGCACCTATTCATCGTG TG | 330 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 327 |
| Klon 9.1 |gaattcgg-acgagg----- | 23 |
| Klon 9.2 |gaattcgg-acgagg----- | 23 |
| Klon 10.1 | ----- | 330 |
| Klon 15.1 | ----- | 329 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 310 |
| Klon 31.2 | ----- | 310 |
| <i>SWP1</i> | TCTCCTCGGAATGCAGTCCCCCATGCCGACCCGTGCCTCTGAACTGCGACTATGA | 385 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 382 |
| Klon 9.1 | ----- | 78 |
| Klon 9.2 | ----- | 78 |
| Klon 10.1 | ----- | 385 |
| Klon 15.1 | ----- | 384 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 365 |
| Klon 31.2 | ----- | 365 |

Ergebnisse

| | | |
|-------------|--|-----|
| <i>SWP1</i> | GCTGAAGACACCTATTATCAACATGGGAGAAAAGGATATTTGAGTTCCTTAAGAAC | 440 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 437 |
| Klon 9.1 | ----- | 133 |
| Klon 9.2 | ----- | 133 |
| Klon 10.1 | ----- | 440 |
| Klon 15.1 | ----- | 439 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 420 |
| Klon 31.2 | ----- | 420 |
| <i>SWP1</i> | TACGAGGATCAGTACAAGAAGGCCGTCGTTCTTTTCCTGACCAGGATTCTCTCTC | 495 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 492 |
| Klon 9.1 | ----- | 188 |
| Klon 9.2 | ----- | 188 |
| Klon 10.1 | ----- | 495 |
| Klon 15.1 | ----- | 494 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 475 |
| Klon 31.2 | ----- | 475 |
| <i>SWP1</i> | AGATTGATGGATTTGCTCCCTCTTACCCAAGTGCAGATTACGAGCCCCTGATCGA | 550 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 547 |
| Klon 9.1 | ----- | 243 |
| Klon 9.2 | ----- | 243 |
| Klon 10.1 | ----- | 550 |
| Klon 15.1 | ----- | 549 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 530 |
| Klon 31.2 | ----- | 530 |
| <i>SWP1</i> | ACAGCTTGAGACGCTCGGGGTTACTGTTCCGTCCAACATGGCAGCTGATCTCGCA | 605 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 602 |
| Klon 9.1 | ----- | 298 |
| Klon 9.2 | ----- | 298 |
| Klon 10.1 | ----- | 605 |
| Klon 15.1 | ----- | 604 |
| Klon 19.1 | | 0 |
| Klon 19.2 | | 0 |
| Klon 31.1 | ----- | 585 |
| Klon 31.2 | ----- | 585 |
| <i>SWP1</i> | GCCCTGGATGCTGCTGAGGCGACCTCACTTGCAGGAACTATCAGAGCTAATGCAC | 660 |
| Klon 5.1 | | 0 |
| Klon 6.1 | ----- | 657 |
| Klon 9.1 | ----- | 353 |
| Klon 9.2 | ----- | 353 |
| Klon 10.1 | ----- | 660 |
| Klon 15.1 | ----- | 659 |
| Klon 19.1 |gaattcgg-acgag----- | 26 |
| Klon 19.2 |gaattccg-acgag----- | 26 |
| Klon 31.1 | ----- | 640 |
| Klon 31.2 | ----- | 640 |

Ergebnisse

| | | |
|-------------|--|-----|
| <i>SWP1</i> | AGAAGGTGATAGGCGACCTACTCGCCAGAGTCAACACAATGTGCTATCTGGATCT | 715 |
| Klon 5.1 |-a--tc | 6 |
| Klon 6.1 | ----- | 712 |
| Klon 9.1 | ----- | 408 |
| Klon 9.2 | ----- | 408 |
| Klon 10.1 | ----- | 715 |
| Klon 15.1 | ----- | 714 |
| Klon 19.1 | ----- | 81 |
| Klon 19.2 | ----- | 81 |
| Klon 31.1 | ----- | 695 |
| Klon 31.2 | ----- | 695 |
| <i>SWP1</i> | CATGAGCCTCGTCACTAGCGGACTCTTTGCCAGCCAGGTCACAAGTGCATTCAGT | 770 |
| Klon 5.1 | ggcac-agg----- | 61 |
| Klon 6.1 | ----- | 767 |
| Klon 9.1 | ----- | 463 |
| Klon 9.2 | ----- | 463 |
| Klon 10.1 | ----- | 770 |
| Klon 15.1 | ----- | 769 |
| Klon 19.1 | ----- | 136 |
| Klon 19.2 | ----- | 136 |
| Klon 31.1 | ----- | 750 |
| Klon 31.2 | ----- | 750 |
| <i>SWP1</i> | AATACACAGCCAATAATTACCATCGCAGGAAATGATCTGTTTACCAAGCAGATGG | 825 |
| Klon 5.1 | ----- | 116 |
| Klon 6.1 | ----- | 822 |
| Klon 9.1 | ----- | 518 |
| Klon 9.2 | ----- | 518 |
| Klon 10.1 | ----- | 825 |
| Klon 15.1 | ----- | 824 |
| Klon 19.1 | ----- | 191 |
| Klon 19.2 | ----- | 191 |
| Klon 31.1 | ----- | 805 |
| Klon 31.2 | ----- | 805 |
| <i>SWP1</i> | CCGTGTTCCAGAGATTACCAGGGACTCTACCCTCTGCAGCTATTACTGCCATCAC | 880 |
| Klon 5.1 | ----- | 171 |
| Klon 6.1 | ----- | 877 |
| Klon 9.1 | ----- | 573 |
| Klon 9.2 | ----- | 573 |
| Klon 10.1 | ----- | 880 |
| Klon 15.1 | ----- | 879 |
| Klon 19.1 | ----- | 246 |
| Klon 19.2 | ----- | 246 |
| Klon 31.1 | ----- | 860 |
| Klon 31.2 | ----- | 860 |
| <i>SWP1</i> | TAATGCTCTTCAAGCAAACAAGAACAATTTTCGTTACATTCTTCACAACTCAAACG | 935 |
| Klon 5.1 | ----- | 226 |
| Klon 6.1 | ----- | 932 |
| Klon 9.1 | ----- | 628 |
| Klon 9.2 | ----- | 628 |
| Klon 10.1 | ----- | 935 |
| Klon 15.1 | ----- | 934 |
| Klon 19.1 | ----- | 301 |
| Klon 19.2 | ----- | 301 |
| Klon 31.1 | ----- | 915 |
| Klon 31.2 | ----- | 915 |

Ergebnisse

| | | |
|-------------|--|------|
| <i>SWP1</i> | ACCAACCTACAGACTGATGTTCAAAATGCTCTTACAGCACTGATTACGGCGCTTA | 990 |
| Klon 5.1 | ----- | 281 |
| Klon 6.1 | ----- | 987 |
| Klon 9.1 | ----- | 683 |
| Klon 9.2 | ----- | 683 |
| Klon 10.1 | ----- | 990 |
| Klon 15.1 | ----- | 989 |
| Klon 19.1 | ----- | 356 |
| Klon 19.2 | ----- | 356 |
| Klon 31.1 | ----- | 970 |
| Klon 31.2 | ----- | 970 |
| <i>SWP1</i> | CAACACTGACAAGTACCACATCAACAGAATTCACACAGTTTGCAAACCTCTGAAAT | 1045 |
| Klon 5.1 | ----- | 336 |
| Klon 6.1 | ----- | 1042 |
| Klon 9.1 | ----- | 738 |
| Klon 9.2 | ----- | 738 |
| Klon 10.1 | ----- | 1045 |
| Klon 15.1 | ----- | 1044 |
| Klon 19.1 | ----- | 411 |
| Klon 19.2 | ----- | 411 |
| Klon 31.1 | ----- | 1025 |
| Klon 31.2 | ----- | 1025 |
| <i>SWP1</i> | TGGAGCACTTACAGGGAGAATCTTTGGATCAAGCGGAAGCGGATCAGGCGGGTCA | 1100 |
| Klon 5.1 | ----- | 391 |
| Klon 6.1 | ----- | 1097 |
| Klon 9.1 | ----- | 793 |
| Klon 9.2 | ----- | 793 |
| Klon 10.1 | ----- | 1100 |
| Klon 15.1 | ----- | 1078 |
| Klon 19.1 | ----- | 466 |
| Klon 19.2 | ----- | 466 |
| Klon 31.1 | ----- | 1059 |
| Klon 31.2 | ----- | 1080 |
| <i>SWP1</i> | TCTGGTGGATCAAGTGGAAGCGGATCAGATGGAAGCGGATCAGGCGGGTCATCTG | 1155 |
| Klon 5.1 | ----- | 446 |
| Klon 6.1 | ----- | 1152 |
| Klon 9.1 | ----- | 848 |
| Klon 9.2 | ----- | 848 |
| Klon 10.1 | ----- | 1155 |
| Klon 15.1 | ----- | 1078 |
| Klon 19.1 | ----- | 521 |
| Klon 19.2 | ----- | 521 |
| Klon 31.1 | ----- | 1059 |
| Klon 31.2 | ----- | 1135 |
| <i>SWP1</i> | GTGGATCAAGTGGAAGCGGATCAGATGGAAGCGGATCAGGCGGGTCATCTGTTGG | 1210 |
| Klon 5.1 | ----- | 501 |
| Klon 6.1 | ----- | 1207 |
| Klon 9.1 | ----- | 903 |
| Klon 9.2 | ----- | 903 |
| Klon 10.1 | ----- | 1210 |
| Klon 15.1 | ----- | 1107 |
| Klon 19.1 | ----- | 576 |
| Klon 19.2 | ----- | 576 |
| Klon 31.1 | ----- | 1059 |
| Klon 31.2 | ----- | 1190 |

Ergebnisse

| | | |
|-------------|---|------|
| <i>SWP1</i> | ATCAAGTGGGAGCGGATCAGATGGAAGCGGATCAGGCGGGTCATCTGGTGGATCA | 1265 |
| Klon 5.1 | ----- | 556 |
| Klon 6.1 | ----- | 1262 |
| Klon 9.1 | ----- | 958 |
| Klon 9.2 | ----- | 958 |
| Klon 10.1 | ----- | 1265 |
| Klon 15.1 | ----- | 1162 |
| Klon 19.1 | ----- | 631 |
| Klon 19.2 | ----- | 631 |
| Klon 31.1 | | 1092 |
| Klon 31.2 | ----- | 1245 |
| | | |
| <i>SWP1</i> | AGTGGGAGCGGATCAGATGGAAGCGGATCAGGCGGGTCATCTGGTGGATCAAGCG | 1320 |
| Klon 5.1 | ----- | 611 |
| Klon 6.1 | ----- | 1317 |
| Klon 9.1 | ----- | 1013 |
| Klon 9.2 | ----- | 1013 |
| Klon 10.1 | ----- | 1320 |
| Klon 15.1 | ----- | 1217 |
| Klon 19.1 | ----- | 686 |
| Klon 19.2 | ----- | 686 |
| Klon 31.1 | ----- | 1147 |
| Klon 31.2 | ----- | 1300 |
| | | |
| <i>SWP1</i> | GAAGCGGATCAGGAGGTGAATCTGGTGGATCTTCTTCATAATCAGAGCCAACCAT | 1375 |
| Klon 5.1 | ----- | 666 |
| Klon 6.1 | ----- | 1372 |
| Klon 9.1 | ----- | 1068 |
| Klon 9.2 | ----- | 1068 |
| Klon 10.1 | ----- | 1375 |
| Klon 15.1 | ----- | 1272 |
| Klon 19.1 | ----- | 741 |
| Klon 19.2 | ----- | 741 |
| Klon 31.1 | ----- | 1202 |
| Klon 31.2 | ----- | 1355 |
| | | |
| <i>SWP1</i> | CCTAATGTGTGAGTCCAAATCTAAATCATCCATAAGGCACAGGGAATACCAACAA | 1430 |
| Klon 5.1 | ----- | 721 |
| Klon 6.1 | ----- | 1427 |
| Klon 9.1 | ----- | 1123 |
| Klon 9.2 | ----- | 1123 |
| Klon 10.1 | ----- | 1430 |
| Klon 15.1 | ----- | 1327 |
| Klon 19.1 | ----- | 796 |
| Klon 19.2 | ----- | 796 |
| Klon 31.1 | ----- | 1257 |
| Klon 31.2 | ----- | 1410 |
| | | |
| <i>SWP1</i> | AGGGGCAAGAATCTCGACAGGTCTTGTGGTTAGATGTACGACCCACATGCTATTT | 1485 |
| Klon 5.1 | ----- | 776 |
| Klon 6.1 | ----- | 1482 |
| Klon 9.1 | ----- | 1178 |
| Klon 9.2 | ----- | 1178 |
| Klon 10.1 | ----- | 1485 |
| Klon 15.1 | ----- | 1382 |
| Klon 19.1 | ----- | 851 |
| Klon 19.2 | ----- | 851 |
| Klon 31.1 | ----- | 1312 |
| Klon 31.2 | ----- | 1465 |

Ergebnisse

| | | |
|-------------|---|------|
| <i>SWP1</i> | TCGTTGGCGTCAGGATTTTTTCACTAGGCTGTAAATAAAACTGATTCCAAAAAAA | 1540 |
| Klon 5.1 | ----- | 831 |
| Klon 6.1 | ----- | 1537 |
| Klon 9.1 | ----- | 1233 |
| Klon 9.2 | ----- | 1233 |
| Klon 10.1 | -----c-- | 1540 |
| Klon 15.1 | ----- | 1437 |
| Klon 19.1 | -----c--g-- | 906 |
| Klon 19.2 | -----g-- | 906 |
| Klon 31.1 | ----- | 1367 |
| Klon 31.2 | ----- | 1520 |
| | | |
| <i>SWP1</i> | AAAAAA..... | 1546 |
| Klon 5.1 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaactcgag..... | 860 |
| Klon 6.1 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaactcgag..... | 1565 |
| Klon 9.1 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagctcgag... | 1271 |
| Klon 9.2 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgag... | 1271 |
| Klon 10.1 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaactcgag..... | 1566 |
| Klon 15.1 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgag..... | 1469 |
| Klon 19.1 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgag..... | 940 |
| Klon 19.2 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgag..... | 939 |
| Klon 31.1 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgag.... | 1404 |
| Klon 31.2 | -----aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgag... | 1558 |

Abb. 15: Vollständiges Alignment der 10 ausgewählten Klone mit *SWP1*. „-“ bezeichnet eine zur ersten Zeile identische Base und „.“ steht für eine nicht vorhandene Base (Deletion).

6 Diskussion

6.1 Rationale des experimentellen Designs

6.1.1 Stand der Technik

In der vorliegenden Arbeit sollten wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung immundiagnostischer Verfahren, insbesondere eines Koproantigen-ELISA, zum Nachweis von Mikrosporidien und Mikrosporidieninfektionen geschaffen werden. Denn bis heute gestaltet sich der Nachweis von Infektionen mit Mikrosporidien schwierig und es ist aktuell noch keine einfache immunologische Testmethode für die Routinediagnostik etabliert. Der Enzym-Immunoassay (EIA), häufig als so genannter „Enzyme linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) bezeichnet, ist in vielerlei Hinsicht eine anerkannt einfache, schnelle, sensitive und billige Methode, die einen hohen Durchsatz erlaubt. Mit ihm werden entweder Antigene des Erregers direkt nachgewiesen oder aber Antikörper, die der Wirt als Antwort auf die Infektion gebildet hat. Bei den enteropathogenen Mikrosporidien, allen voran *Enterocytozoon bieneusi*, der häufigsten beim Menschen gefundenen Mikrosporidienart, kommen Antigene des Erregers in Frage, die mit dem Stuhl ausgeschieden werden, so genannte Koproantigene. Der zugehörige Test wäre dann ein sogenannter Koproantigen-ELISA. Damit sollte es möglich sein, den Erreger direkt nachzuweisen und es könnte auf serologische Verfahren verzichtet werden, die gerade bei Mikrosporidieninfektionen durch die häufige Immunsuppression der Patienten behindert sind.

Leider konnte für Mikrosporidien bis heute kein für die Routine-Diagnostik funktionierender ELISA etabliert werden, mit dem Stuhl eines mit Mikrosporidien infizierten Patienten untersucht werden kann. Hintergrund ist die Wahl eines geeigneten Antigens. Zwar fanden in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen statt, die Identifizierungen eines passenden Antigens für die Routinediagnostik blieb jedoch aus. So wurden in verschiedenen Forschungsarbeiten monoklonale und polyklonale Antikörper erzeugt, die aus dem Serum von mit Mikrosporidien-Sporen infizierten Kaninchen oder Mäusen gewonnen wurden (Zierdt *et al.*, 1993; Aldras *et al.*, 1994; Enriquez *et al.*, 1997; Mo *et al.*, 2004; van Gool *et al.*, 2004). Als Antigen

für die Immunisierung dienten jedoch immer Sporen, also die Gesamtheit aller Antigene der Zelle. Dadurch lässt sich naheliegender auch die mangelnde Spezifität erklären, die die Zuverlässigkeit der Nachweise beeinträchtigte. So wurden größtenteils die Mikrosporidien schlecht erkannt oder es wurden Kreuzreaktionen, beispielsweise mit Hefepilzen, Streptokokken und einigen gramnegativen Bakterien, beobachtet (Zierdt *et al.*, 1993).

Mit dieser Arbeit sollte zum ersten Mal das Spektrum immunogener Proteine bei einem Mikrosporidium erforscht werden, um so ein Panel von Antigenen definieren zu können, mit dem dann spezifische mono- oder polyklonale Antikörper zur Entwicklung eines Koproantigen-ELISA erzeugt werden könnten.

6.1.2 Wahl des zu untersuchenden Mikrosporidiums

Für die Durchführung der immunologischen Studien wurde das Mikrosporidium *Encephalitozoon cuniculi* gewählt. Diese Wahl hat mehrere Gründe: *E. cuniculi* zählt zu den humanpathogenen Mikrosporidien und ist eine der am besten erforschten Mikrosporidienspezies. Außerdem hat *E. cuniculi* den entscheidenden Vorteil, dass es – im Gegensatz zu *Enterocytozoon bieneusi* - in der Zellkultur anzüchtbar ist. Somit konnte der Erreger für die immunologischen Untersuchungen in ausreichender Menge und Reinheit produziert werden.

6.2 Spektrum immunogener Proteine von *Encephalitozoon cuniculi*

Bis heute konnten mehrere Proteine aus der Sporenwand und aus dem Polfaden von *E. cuniculi* isoliert werden. So sind aktuell zwei Sporenwandproteine (*SWP1* und *SWP3*) und 3 Polfadenproteine (*PTP1*, *PTP2*, *PTP3*) bekannt (Bohne *et al.*, 2000; Delbac *et al.*, 2001; Peuvrel *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2006). Allerdings ist die Bedeutung dieser Proteine in der Immunabwehr bisher unklar. In der vorliegenden Arbeit sollten die immunogenen Proteine bei *E. cuniculi* identifiziert werden, um so ein Panel von Antigenen zu definieren, mit dem in weiteren Arbeiten spezifische mono- oder polyklonale Antikörper zur Entwicklung eines Koproantigen-ELISA erzeugt werden können.

Aus einer mit der aus *E. cuniculi*-Sporen isolierten mRNA erstellten Genexpressionsbank konnte nach Screenen mit Serum-Immunglobulinen von immunisierten Kaninchen 31 Klone isoliert werden, die immunogene Proteine bildeten. Ein überraschendes Ergebnis zeigte sich bei der Sequenzierung der Klone. Während zuvor die Arbeitshypothese bestand, dass verschiedene Proteine als Antigene für die Immunantwort eine Rolle spielen, stellte sich hier heraus, dass alle isolierten Klone für Teile der Proteinsequenz des „*Spore Wall Protein 1*“ (*SWP1*) kodierten und dieses Protein damit das immunologisch dominierende Antigen von *E. cuniculi* sein muss.

Diese Schlussfolgerung deckt sich mit den Beschreibungen eines Laborunfalls (van Gool *et al.*, 2004), in der die Immunantwort eines immunkompetenten Laborarbeiters untersucht wurde, der sich bei der Arbeit mit einer *E. cuniculi*-Kultur im Auge infizierte und eine Konjunktivitis und Keratitis entwickelte. Bei dem Patienten wurde die Immunantwort in verschiedenen Zeitabständen nach Infektion serologisch kontrolliert (siehe Tabelle 4).

Tab. 4: IgG-Titerbestimmung gegen *SWP1* und 3 Polfadenproteine (*PTP1*, *PTP2*, *PTP3*) aus dem Serum eines mit *E. cuniculi* infizierten Patienten im Zeitraum von 38 Monaten.

| Zeit in Monaten nach Infektion | <i>E. cuniculi</i> (type 1 strain) | |
|-----------------------------------|------------------------------------|---|
| | Sporenwand (<i>SWP1</i>) | Polfaden (<i>PTP1</i> , <i>PTP2</i> , <i>PTP3</i>) |
| 1 | 1:40 | < 1:20 |
| 20 | 1:320 | 1:160 |
| 32 | 1:160 | 1:80 |
| 38 | 1:160 | 1:80 |

So konnte im Serum des Patienten bereits 1 Monat nach Infektion ein IgG-Antikörper-Titer gegen *SWP1* bestimmt werden, der im Verlauf weiter anstieg, nicht jedoch gegen die Polfadenproteine *PTP1*, *PTP2* und *PTP3*. Diese waren erst in später entnommenen Seren nachweisbar. Außerdem fiel die Immunantwort gegen die Polfadenproteine im Vergleich zu denen der Sporenwandproteine schwächer aus. Von großem Interesse wäre sicherlich der Verlauf des IgG-Titers gegenüber den

Sporenwand- und Polfadenproteinen in den ersten 6 Monaten nach Infektion gewesen. Leider stand der Patient in diesem Zeitraum für die Serologie nicht zur Verfügung.

6.3 Bestimmung der immunogenen Region

Von großem Interesse für eine spätere rekombinante Expressierung ist die Lage der potentiell immunogenen Domäne(n) auf der Proteinsequenz von *SWP1*. Zu deren Bestimmung wurden diejenigen Klone näher untersucht, die Deletionen aufwiesen. Insgesamt wiesen nur 3 der 10 ausgewählten Klone eine vollständige Gensequenz von *SWP1* auf, die restlichen 7 Klone kodierten nur für Teilabschnitte der Proteinsequenz. Die Gründe für die Häufigkeit der gefundenen Deletionsklone sind unklar.

Die Deletionsklone wiesen Deletionen entweder zu Beginn der Proteinsequenz (Klon 5.1, 9.1, 9.2, 19.1 und 19.2) oder interne Deletionen (Klon 15.1 und 31.1) auf. Trotzdem waren diese Klone offensichtlich imstande, immunogene Proteine zu produzieren. Die längste Deletion in der Anfangssequenz (5'-Ende) wurde bei Klon 5.1 nachgewiesen, ihm fehlten die ersten 724 Basen der kodierenden Region. Somit kann dieser Bereich zumindest als alleinige immunogene Region ausgeschlossen werden. Für die Einschränkung der immunogenen Region am 3'-Ende sind die beiden Klone mit internen Deletionen von großem Nutzen. Die Deletionen beginnen bei beiden Klonen bei der Base 1080, wobei bei Klon 15.1 101 Basen und bei Klon 31.1 152 Basen fehlen. Auf Grund der Anzahl der deletierten Basen (nicht durch 3 teilbar) ist bei beiden Klonen eine Verschiebung des Leserasters zu erwarten. Dies bedeutet, dass die im Anschluss an die Deletion gebildete Proteinsequenz nicht mehr mit der Proteinsequenz von *SWP1* übereinstimmt. Somit ist anzunehmen, dass die immunogene Region höchstwahrscheinlich im Bereich zwischen den Basen 725 und 1079 kodiert wird (siehe Abbildung 16). Ein Beweis dieser Schlussfolgerung wäre durch die Klonierung und rekombinante Expression dieses Abschnittes und erneutem Screening dieses Proteins mit Anti-*SWP1*-Serumimmunglobulinen zu erbringen.

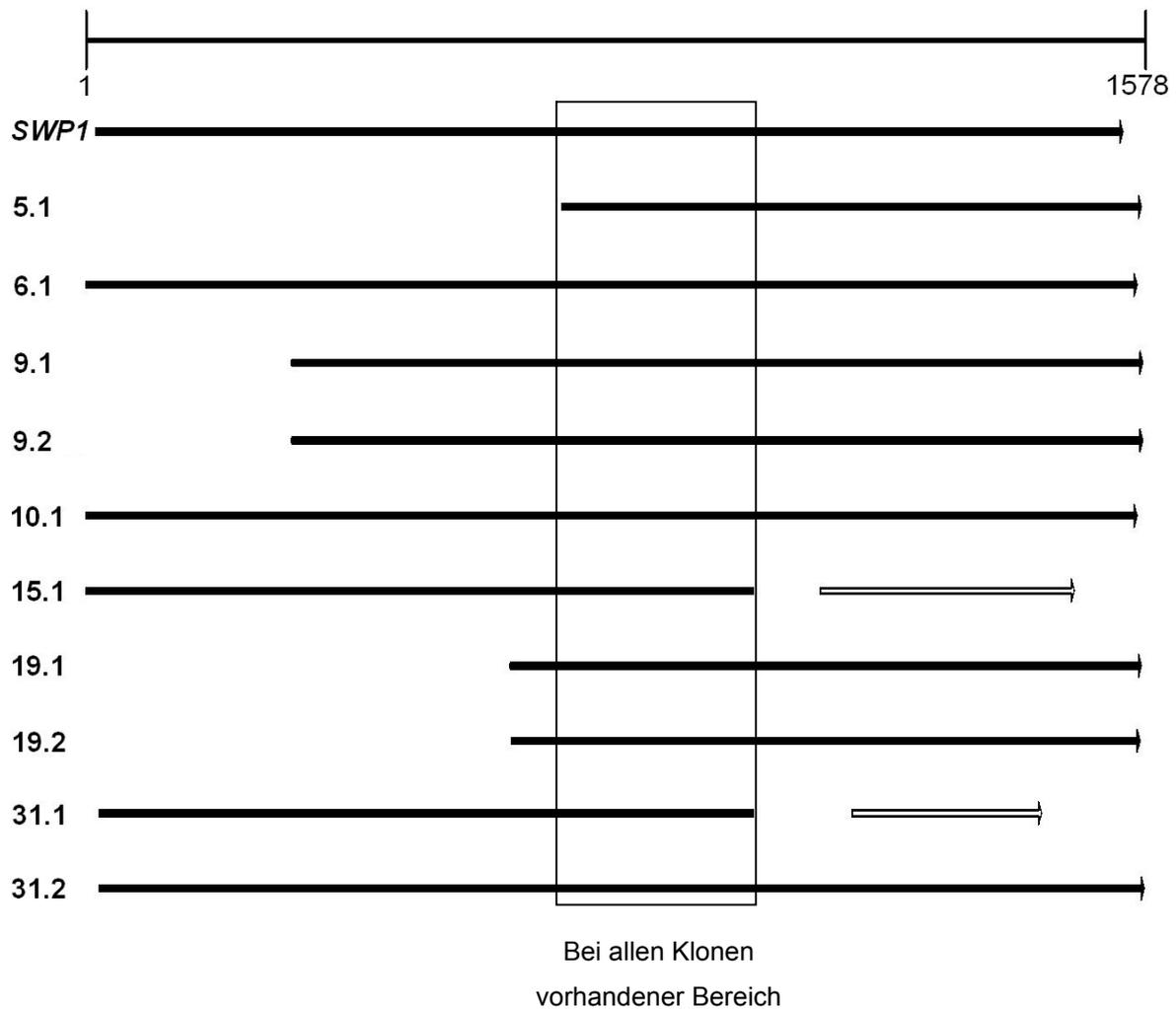


Abb. 16: Schematische Darstellung der mittels Deletionsklone postulierten immunogenen Domäne. Während die vollständig schwarz gefärbten Pfeile eine vollständige Übereinstimmung mit der Proteinsequenz von *SWP1* zeigen, kodieren die innen weißen Pfeile auf Grund einer internen Deletion und der dadurch zu erwartenden Verschiebung des Leserasters für ein verändertes Protein.

6.4 Nutzen der Ergebnisse bei der Entwicklung eines Mikrosporidien-ELISA

Auf Grund der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurde aufgezeigt, dass *SWP1* mit hoher Wahrscheinlichkeit das wichtigste Antigen in der Immunreaktion bei Infektionen mit *E. cuniculi* ist. Somit stellt *SWP1* den wohl aussichtsreichsten Kandidaten für die Entwicklung eines Koproantigen-ELISA dar. Von großer Bedeutung für einen immunologischen Test ist weiter, dass bei einer Infektion schon nach kurzer Zeit Serumimmunglobuline gegen *SWP1* gebildet werden. Außerdem konnte *SWP1* auch in weiteren Mikrosporidienspezies, wie *E. hellem* und *E. intestinalis*, identifiziert werden. Damit liegt der Schluss nahe, dass es sich bei dem Sporenwandprotein um ein evolutionär konserviertes Protein handelt, das auch in dem bei Infektionen des Menschen am häufigsten gefundenen Mikrosporidium *Enterocytozoon bieneusi* vorhanden sein sollte. Mit Hilfe der Ergebnisse der Analyse der Deletionsmutanten kann sich die Entwicklung eines (Koproantigen-) ELISA auf einen relativ beschränkten Abschnitt des Gens von weniger mehr als 350 Basen konzentrieren. Die technische Umsetzung eines Koproantigen-ELISA bedarf allerdings weiterer Arbeiten.

7 Ausblick

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte gefolgert werden, dass das so genannte „*Spore Wall Protein*“ (*SWP*) das immunologisch dominierende Antigen von *E. cuniculi* ist und deshalb zur Entwicklung immundiagnostischer Verfahren verwendet werden sollte. Außerdem wurden durch die Analyse von Deletionsmutanten bereits Bereiche mit potentiell immunogenen Domänen innerhalb des Proteins bestimmt. Damit wurden wichtige Voraussetzungen für weitere Entwicklungen geschaffen, deren Ziel es sein sollte, homologe Genabschnitte auch aus dem *SWP* des häufigsten humanen Mikrosporidiums, *Enterocytozoon bieneusi*, zu klonieren und zu exprimieren.

Als technische Schwierigkeit ist jedoch anzuführen, dass *E. bieneusi* nicht kultivierbar ist. Somit scheint eine Isolation von Sporen in ausreichender Reinheit und Anzahl zur Immunisierung eines Wirtes für die Gewinnung von spezifischen mono- und polyklonalen Antikörpern für einen ELISA, sowie zur Erstellung einer cDNA-Bank jedoch kaum möglich. Allerdings ist bekannt, dass auch die Sporenwand von *E. bieneusi* immunogen ist und es bereits Versuche gab, monoklonale Antikörper gegen *E. bieneusi* zu bilden (Accoceberry *et al.*, 1999). Allerdings konnte bis heute kein einzelnes Sporenwandprotein isoliert und dessen Sequenz bestimmt werden. Es ist jedoch, wie in der Diskussion ausgeführt wurde, anzunehmen, dass die Gene für die Sporenwand homolog zu denen anderer Mikrosporidienarten sind.

Auf Grund der hier vorgestellten Ergebnisse könnte mit Hilfe der PCR versucht werden, die zu den hier beschriebenen Genabschnitten homologen Sequenzen mit Hilfe von degenerierten Primern aus nahe verwandten Organismen zu amplifizieren, zum Beispiel aus *E. intestinalis* und *E. hellem*. Im nächsten Schritt müssten die neuen gefundenen Sequenzen verglichen und auf die in der Evolution konservierten Regionen untersucht werden. Zu diesen Regionen ließen sich nun universielle Primer konstruieren, um homologe Gene aus dem nicht-kultivierbaren Organismus *E. bieneusi* zu amplifizieren und zu klonieren. Die teilweise oder komplette kodierende Region könnte dann für die Produktion großer Mengen und genügend reinem Antigen durch rekombinante Expression benutzt werden. Dieses Antigen

könnte direkt in einem ELISA oder für die Immunisation und Produktion von spezifischen mono- und polyklonalen Antikörpern für einen Koproantigen-ELISA verwendet werden.

8 Zusammenfassung

Der labordiagnostische Nachweis von Mikrosporidieninfektionen bereitet immer noch Probleme. Auf Grund ihrer geringen Größe und ihrer unspezifischen Färbereigenschaften ist der lichtmikroskopische Direktnachweis schwierig. Der elektronenmikroskopische Nachweis ist aufwendig und insbesondere aus dem Stuhl wenig sensitiv. Nicht alle Mikrosporidienarten können in Zellkulturen angezüchtet werden. Molekularbiologische Nachweisverfahren wie die PCR sind aufwendig, noch nicht standardisiert und derzeit noch Speziallaboratorien vorbehalten. Zuverlässige immundiagnostische Tests mit ausreichender Sensitivität und Spezifität fehlen, da das immunogene Spektrum von Mikrosporidien weitgehend unerforscht ist und somit bis heute die Wahl eines geeigneten Antigens das Grundproblem darstellt. Dabei wäre gerade vor dem Hintergrund aktuell zunehmender HIV-Infektionen zum Beispiel die Entwicklung eines Koproantigen-ELISA zum Nachweis von Mikrosporidien aus Stuhl von großem praktischem Nutzen. Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, die Voraussetzungen hierfür durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden zu verbessern.

Als Modellorganismus wurde die kultivierbare Mikrosporidienspezies *Encephalitozoon cuniculi* gewählt und in der Zellkultur angezüchtet und vermehrt. Aus der Kultur wurden die Sporen von *E. cuniculi* in hoher Anzahl und Reinheit gewonnen und aus ihnen die mRNA isoliert, um sie mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA zu transkribieren. Mit dieser cDNA wurde eine Genexpressionsbank angelegt, die mit polyklonalen Serum-Antikörpern gescreent wurde, die durch Immunisierung von Kaninchen mit *E. cuniculi* gewonnen worden waren. Hierbei konnten mehrere Klone identifiziert werden, die immunogene Proteine bildeten. Die Sequenzierung der isolierten Klone und Analyse der cDNA-Sequenzen ergab die vollständige Übereinstimmung mit einer einzigen Konsensussequenz. Durch die Suche in einer Gendatenbank konnte ein Sporenwandprotein als immunogenes Protein identifiziert werden. Des Weiteren war es möglich, mit Hilfe von Deletionsmutanten eine immunogene Domäne auf der gefundenen Sequenz ausfindig zu machen. Schließlich wurde in der Arbeit ein Vorschlag für die

Verwendung dieser Sporenwanddomäne als Antigen für die Entwicklung immundiagnostischer Tests gemacht.

Zusammengefasst wurde in der vorliegenden Arbeit (a) das immunogene Spektrum von *Encephalitozoon cuniculi* als im Wesentlichen auf das Sporenwandprotein beschränkt beschrieben, (b) bei dem identifizierten Protein eine immunogene Domäne charakterisiert und (c) dadurch die Voraussetzungen für die Entwicklung immundiagnostischer Tests bei Mikrosporidieninfektionen verbessert.

9 Literaturverzeichnis

Accoceberry I, Thellier M, Desportes-Livage I, Achbarou A, Biligui S, Danis M, Datry A: Production of monoclonal antibodies directed against the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi*. J Clin Microbiol 1999; 37: 4107-12.

Aldras AM, Orenstein JM, Kotler DP, Shadduck JA, Didier ES: Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1994; 32: 608-12.

Babenko VN, Krylov DM: Comparative analysis of complete genomes reveals gene loss, acquisition and acceleration of evolutionary rates in Metazoa, suggests a prevalence of evolution via gene acquisition and indicates that the evolutionary rates in animals tend to be conserved. Nucleic Acids Research 2004; Vol. 32, No. 17 5029-35.

Biderre C, Pages M, Metenier G, Canning EU, Vivares CP: Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. Mol Biochem Parasitol 1995; 74: 229-31.

Bohne W, Ferguson DJP, Kohler K, Gross U: Developmental expression of a tandemly repeated, Glycine- and Serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. Infect Immun 2000; 68: 2268-75.

Canning EU: Microsporida. In: Kreier JP, Baker JR ed., Parasitic Protozoa, Vol. 6, Academic Press, New York, 1993; pp. 299-370.

Cotte L, Rabodonirina M, Raynal C, Chapuis F, Piens MA, Trepo C: Outbreak of intestinal microsporidiosis in HIV-infected patients in relation with town water distribution system [abstract no. I147]. In: Program and abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Toronto). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1997.

DeGirolami PC, Ezratty CR, Desai G, McCullough A, Asmuth D, Wanke C, Federman M: Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B stains. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 805-10.

del Aguila C, Lopez-Velez R, Fenoy S, Turrientes C, Cobo J, Navajas R, Visvesvara GS, Croppo GP, Da Silva AJ, Pieniazek NJ: Identification of *Enterocytozoon bienewsi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1862-6.

Delbac F, Peuvel I, Metenier G, Peyretailade E, Vivares CP: Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of *ptp1* and *ptp2* genes in three *Encephalitozoon* species. *Infect Immun* 2001; 69: 1016-24.

Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA: Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3138-45.

Didier ES, Snowden KF, Shaddock JA: Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv Parasitol* 1998; 40: 283-320.

Didier ES: Microsporidiosis. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 27: 1–8.

Enriquez FJ, Ditrich O, Palting JD, Smith K: Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 724-9.

Fournier S, Liguory O, Santillana-Hayat M, Guillot E, Sarfati C, Dumoutier N, Molina J, Derouin F: Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 29: 95-100.

Franzen C, Müller A, Hegener P, Salzberger B, Hartmann P, Fatkenheuer G, Diehl V, Schrappe M: Detection of microsporidia (*Enterocytozoon bieneusi*) in intestinal biopsy specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 2294-6.

Franzen C, Müller A: Molecular techniques for detection, species differentiation and phylogenetic analysis of microsporidia. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 243-85.

Haro M, Izquierdo F, Henriques-Gil N, Andres I, Alonso F, Fenoy S, del Aguila C: First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 3153-7.

Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Helse W, Löscher T, Rinder H: Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. Trop Med Int Health 1996; 1: 373-8.

Kotler DP, Orenstein JM: Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Adv Parasitol. 1998; 40: 321-49.

Levaditi C, Nicolau S, Schoen R: L'agent etiologique de l'encéphalite epizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). C.R. Soc Biol Paris 1923; 89: 984-86

Lippert U, Schottelius J, Manegold C: Disseminierte Mikrosporidieninfektionen (*Encephalitozoon intestinalis*) bei HIV-Infektion. Dtsch Med Wochenschr 2003; 128: 1769-72.

Lores B, Lopez-Miragaya I, Arias C, Fenoy S, Torres J, del Aguila C: Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. Clin Infect Dis 2002; 34: 918-21.

Matsubayashi H, Koike T, Mikata I, Takei H, Hagiwara S: A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. AMA Arch Pathol 1959; 67: 181-7.

Mo L, Drancourt M: Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11: 1060-3.

Molina JM, Tourneur M, Sarfati C, Chevret S, de Gouvello A, Gobert JG, Balkan S, Derouin F: Agence Nationale de Recherches sur le SIDA 090 Study Group: Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. N Engl J Med 2002; 346: 1963-9.

Müller A, Bialek R, Kamper A, Fatkenheuer G, Salzberger B, Franzen C: Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. J Clin Microbiol 2001; 39: 1630-2.

Mungthin M, Subrungruang I, Naaglor T, Aimpun P, Areekul W, Leelayoova S: Spore shedding pattern of *Enterocytozoon bieneusi* in asymptomatic children. J Med Microbiol 2005; 54: 473-6.

Nägeli K: Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. Bot Ztg 1857; 15: 760-61

Peuvel I, Peyret P, Metenier G, Vivares CP, Delbac F: The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. Mol Biochem Parasitol 2002; 122: 69-80.

Poles MA, Bini EJ, Cohen J: Gastrointestinal Infections in Patients Infected with HIV-1. Current Treatment Options in Infectious Diseases 2003, 5: 219-35

Raynaud L, Delbac F, Broussolle V, Rabodonirina M, Girault V, Wallon M, Cozon G, Vivares CP, Peyron F: Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. J Clin Microbiol. 1998; 36: 37-40.

Reetz J, Wiedemann M, Aue A, Wittstatt U, Ochs A, Thomschke A, Manke H, Schweps M, Rinder H: Disseminated lethal *Encephalitozoon cuniculi* (genotype III) infections in cotton-top tamarins (*Oedipomidas oedipus*) - a case report. Parasitol Int 2004; 53: 29-34.

Rinder H, Janitschke K, Aspöck H, Da Silva AJ, Deplazes P, Fedorko DP, Franzen C, Futh U, Hunger F, Lehmacher A, Meyer CG, Molina JM, Sandfort J, Weber R, Löscher T and the Diagnostic Multicenter Study Group on Microsporidia: Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of microsporidia in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1814-8.

Rinder H, Katzwinkel-Wladarsch S, Löscher T: Evidence for the existence of genetically distinct strains of *Enterocytozoon bieneusi*. *Parasitol Res* 1997; 83: 670-2.

Schmidt EC, Shadduck JA: Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. *Infect Immun* 1983; 40: 936-42.

Schottelius J, Burchard GD, Sobottka I: Mikrosporidien des Menschen: Parasitologie, Klinik, Therapie. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128: 87-91.

Sharpstone D, Rowbottom A, Nelson M, Gazzard B: The treatment of microsporidial diarrhoea with thalidomide. *AIDS* 1995; 9: 658-9.

Sing A, Tybus K, Heesemann J, Mathis A: Molecular diagnosis of an *Enterocytozoon bieneusi* human genotype C infection in a moderately immunosuppressed human immunodeficiency virus seronegative liver-transplant recipient with severe chronic diarrhea. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2371-2.

Sobottka I, Schmetz DA, Schottelius J: Microsporidia. In: Dionisio D (Ed.) 2003, *Textbook-Atlas of Intestinal Infections in AIDS*, Springer Verlag.

Thomarat F, Vivares CP, Gouy M: Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J Mol Evol* 2004; 59: 780-91.

Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeera-Kitaka S, Ndeezi G, Downing R, Feng X, Akiyoshi DE, Tzipori S: Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73: 921-5.

Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S: *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67: 299-303.

Undeen AH, Frixione E: The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores. *J Protozool* 1990; 37: 561-7.

van Gool T, Biderre C, Delbac F, Wentink-Bonnema E, Peek R, Vivares CP: Serodiagnostic studies in an immunocompetent individual infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *J Infect Dis* 2004; 189: 2243-9.

van Gool T, Hollister WS, Schattenkerk WE, van den Bergh Weerman MA, Terpstra WJ, van Ketel RJ, Reiss P, Canning EU: Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in AIDS patients by recovery of spores from faeces. *Lancet* 1990; 336: 697-8.

van Gool T, Snijders F, Reiss P, Eeftinck Schattenkerk JK, van den Bergh Weerman MA, Bartelsman JF, Bruins JJ, Canning EU, Dankert J: Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J Clin Pathol* 1993; 46: 694-9.

Vavra J, Dahbiova R, Hollister WS, Canning EU: Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidiosis. *Folia Parasitol (Praha)* 1993; 40: 267-72.

Virel A, Backman L: Molecular evolution and structure of alpha-actinin. *Mol Biol Evol* 2004; 21: 1024-31.

Vossbrinck CR, Maddox JV, Friedmann S, Debrunner-Vossbrinck BA and Woese CR: Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 1987; 326: 411-4.

Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS and the Enteric Opportunistic Infections Working Group: Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Engl J Med* 1992; 326: 161-6.

Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL: Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 426-61.

Weber R, Deplazes P, Schwartz D: Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib Microbiol* 2000; 6: 166-92.

Weber R, Deplazes P: New parasitic diseases in man: infections caused by Microsporida and Cyclospora species. *Schweiz Med Wochenschr* 1995; 125: 909-23.

Weber R, Kuster H, Visvesvara GS, Bryan RT, Schwartz DA, Luthy R: Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: pulmonary colonization, microhematuria, and mild conjunctivitis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 415-9.

Weber R, Schwartz DA, Bryan R: Microsporidia. Philadelphia: Churchill Livingstone. In: Dolin R, ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases* 5th ed. 2000: 2920-33.

Weiss LM, Vossbrinck CR: Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. *Adv Parasitol* 1998; 40: 351-95.

Wittner M, Weiss LM: *The microsporidia and microsporidiosis*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 1999.

Xu Y, Takvorian P, Cali A, Wang F, Zhang H, Orr G, Weiss LM: Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi*. Infect Immun 2006; 74: 239-47.

Zierdt CH, Gill VJ, Zierdt WS: Detection of microsporidian spores in clinical samples by indirect fluorescent-antibody assay using whole-cell antisera to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*. J Clin Microbiol 1993; 31: 3071-4.

10 Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| A | Adenin |
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| C | Cytosin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonukleinacid) |
| cDNA | aus mRNA durch reverse Transkription entstandene DNA (copy DNA) |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| Da | Dalton-Einheit |
| dATP | 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| dCTP | 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat |
| DECP | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu gleichen Anteilen |
| dTTP | 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EIA | Enzym Immunoassay |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| FKS | Fötale Kälberserum |
| G | Guanin |
| H ₂ O | Wasser |
| HCl | Wasserstoffchlorid |
| HIV | Humanes Immundefizienz Virus |
| IFT | Immunfluoreszenstechnik |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| KCl | Kaliumchlorid |
| LB | Luria-Bertani |
| mRNA | Boten-RNA (messenger-RNA) |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| NaOH | Natronlauge |
| OD | Optische Dichte |

Abkürzungen

| | |
|----------|---|
| PBS | Phosphat-gepuffertes Saline (Phosphate Buffered Saline) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (Polymerasechainreaction) |
| rATP | ribosomales ATP |
| RNA | Ribonukleinsäure (Ribonukleinacid) |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RNase | Ribonuklease |
| S | Svedberg-Einheit |
| ssRNA | Einzelstrang-RNA (single stranded RNA) |
| SWP | Spore Wall Protein, Sporenwandprotein |
| T | Thymin |
| TBS | Tris-gepuffertes Saline (Tris Buffered Saline) |
| TBST | Tris-gepuffertes Saline mit Tween 20 |
| Tris | Tris[hydroxymethyl]methylamin |
| Tris•HCl | Tris[hydroxymethyl]methylaminhydrochlorid |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid |
| Y | Mischung aus C und T bei degenerierten Primern |

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Maximilian Wiedemann
Geburtsdatum: 03.03.1979
Geburtsort: München

Schulbildung:

09/1985 – 08/1989 Grundschule Utting am Ammersee
09/1989 – 06/1998 Humanistisches und Neusprachliches Rhabanus-Maurus-Gymnasium St. Ottilien
06/1998 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

07/1998 – 04/1999 Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Luftwaffe

Hochschulausbildung:

05/1999 – 10/2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/2005 Ärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang:

11/2005 Approbation als Arzt
seit 04/06 Assistenzarzt für Innere Medizin am Klinikum Traunstein

Wissenschaftliche Tätigkeit:

03/2004 Reetz J, Wiedemann M, Aue A, Wittstatt U, Ochs A, Thomschke A, Manke H, Schwebs M, Rinder H: Disseminated lethal *Encephalitozoon cuniculi* (genotype III) infections in cotton-top tamarins (*Oedipomidas oedipus*) - a case report. Parasitol Int 2004; 53: 29-34.

03/2004

Vortrag auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP) in Würzburg:

Wiedemann M, Propping S, Rinder H: Developing diagnostics for non-culturable parasites: the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* as a model.

12 Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. H. Rinder für die Überlassung des Themas sowie die mir gewährte freundliche Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. med. vet. M. Rinder-Zahler, die mir jederzeit hilfreich zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. med. Th. Löscher danke ich für die großzügige Benützung aller Labore und Geräte in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin.

Herrn Prof. Dr. med. vet. K. Pfister bin ich sehr dankbar, dass ich mich auch im Bereich des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der veterinärmedizinischen Fakultät frei bewegen und alle Einrichtungen benutzen durfte.

Danke an alle Mitarbeiter im Tropeninstitut, die mich in jeglicher Weise unterstützt haben.

Herzlichst möchte ich mich bei meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung bedanken.