

## 7. ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

Anja Joachim: Differenzierung von *Sarcocystis*-Arten des Schafes  
mittels RAPD-PCR

### Problemstellung

Obwohl der Sarkosporidienbefall beim Schaf eine weltweit verbreitete Parasitose darstellt, sind die bisher entwickelten Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von *Sarcocystis*-Arten bei dieser Tierart bisher noch unzureichend. Eine artspezifische Diagnose der Sarkosporidiose am lebenden Tier ist nicht möglich. Auch ist die taxonomische Zusammengehörigkeit dieser Arten noch nicht hinreichend geklärt. Molekulare Methoden werden in der Erforschung protozoärer Parasitosen vielfach angewandt, um die diagnostischen Möglichkeiten zu verbessern und um Organismen auf der Basis ihrer "genetischen Fingerabdrücke", das heißt ihrer Nukleinsäuren, zu charakterisieren und taxonomisch einzuordnen. Die RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction; Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion mit zufällig ausgewählten Primern) ist eine der Methoden, bei der solche "genetischen Fingerabdrücke" durch Amplifikation von Teilen genomischer DNA erstellt werden können. Informationen über das Genom des zu untersuchenden Organismus sind dazu nicht notwendig, weshalb die RAPD-PCR besonders geeignet ist zur Untersuchung von Parasiten, über die in dieser Hinsicht noch wenig bekannt ist.

### Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten drei beim Schaf vorkommende *Sarcocystis*-Arten, *Sarcocystis tenella*, *Sarcocystis arieticanis* und *Sarcocystis gigantea*, sowie eine nahe verwandte Kokzidien-Art, *Toxoplasma gondii*, mittels der RAPD-PCR charakterisiert werden. Aus der unterschiedlichen Verteilung der Bandenmuster bei den einzelnen Parasitenarten ließ sich die genetische Distanz zwischen diesen Arten errechnen. Schwerpunkt der Versuche war es, ein amplifiziertes Genfragment, das nur im Bandenmuster der pathogenen *Sar-*

*cocystis*-Arten *S. tenella* und *S. arieticanis* auftrat, zu isolieren und auf seine Eignung als spezifische Sonde für diese beiden Sarkosporidienarten hin zu prüfen.

### Amplifikation genomischer DNA in der RAPD-PCR

Nach der Optimierung der einzelnen PCR-Bedingungen wurden 37 Primer getestet. Vier davon erwiesen sich als geeignet und amplifizierten zwischen einer und elf Banden von der DNA jeder Parasitenart auf reproduzierbare Weise. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

### Schätzung der genetischen Distanz

Mit Hilfe eines laserintegrierten Densitometers wurden die Anzahl der amplifizierten Banden und deren Größe für jede Parasitenart errechnet. Aus dem Verhältnis der gesamten Bandenzahl zu der Anzahl gemeinsamer Banden ergab sich der Ähnlichkeitskoeffizient zweier Arten. Diese Daten wurden mit Hilfe von Computer-Software verarbeitet, und durch die Anwendung vier verschiedener Algorithmen entstanden zwei Dendrogramme, die zeigen, daß *S. tenella* und *S. arieticanis* die am nächsten verwandten Arten sind und daß *S. gigantea* einen nahen Verwandten von *T. gondii* darstellt.

### Isolierung, Klonierung und Charakterisierung einer DNA-Sonde

Eine RAPD-PCR-Bande von etwa 1300 Basenpaaren, die im Amplifikationsmuster von *S. tenella* und *S. arieticanis*, aber nicht in dem der beiden anderen Arten auftrat, wurde aus der Agarose isoliert und in den Vektor pUC18 inkloniert. Das rekombinante Plasmid "pUC18/STF10" wurde radioaktiv markiert und als Sonde in Hybridisierungsversuchen verwendet. Sowohl ein Filter mit RAPD-PCR-amplifizierten Banden aller vier Parasitenarten als auch ein Southern Blot mit der DNA von *S. tenella*, *S. arieticanis*, *S. gigantea*, *T. gondii*, Schaf und Maus wurden mit der Sonde hybridisiert. Der RAPD-PCR-Filter zeigte Banden, die in der Größe dem inklonierten Fragment entsprachen, sowie schwächere

Banden, deren Identität nicht eindeutig war. Im Southern Blot erwies sich die Sonde als spezifisch für die beiden pathogenen *Sarcocystis*-Arten.

Um zu ermitteln, ob es sich bei "ST/F10" um eine genkodierende Sequenz handelt, wurden zwei Drittel des Inserts mit der Kettenabbruchmethode sequenziert. Der Vergleich der ermittelten Sequenz mit bereits bekannten Sequenzen in GenBank® ergab keine signifikanten Ähnlichkeiten. Mehrere kurze offene Leserahmen wurden ermittelt, die sich teilweise überlappen. Wegen der Kürze dieser Sequenzen und der teilweisen Überlappung handelt es sich wahrscheinlich nicht um genkodierende Sequenzen.

Es konnte gezeigt werden, daß es mit der RAPD-PCR möglich ist, genetische Marker für zystenbildende Kokzidien zu finden, aus denen sich spezifische DNA-Sonden entwickeln lassen. Ein Ausblick auf die Verbesserung der Bedingungen, die einen Routineeinsatz dieser Sonde bei der Diagnose pathogener Sarkosporidien beim Schaf ermöglichen, wird diskutiert.

## 6. SUMMARY

Although *Sarcocystis* spp. in sheep have long been recognised as important parasites in animal health and meat hygiene, their diagnosis is difficult; methods for the routine species-diagnosis are not available. Little is known about their molecular biology, and only recently attempts have been made to further characterise and differentiate these cyst-forming coccidia at the molecular level.

Furthermore, their taxonomy is subject to much controversy, and the results of previous phylogenetic studies indicate that the current taxonomic position of the genus *Sarcocystis* and the closely related *Toxoplasma gondii* might not reflect their phylogeny after all.

In this study, the RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-PCR) technique was used to investigate the molecular biology of three ovine *Sarcocystis* spp., *Sarcocystis tenella*, *Sarcocystis arieticanis* and *Sarcocystis gigantea*, and *T. gondii*. After optimisation of the PCR conditions, four random primers were selected to amplify DNA of the four parasite species. By generating band patterns with RAPD-PCR, it was possible to estimate the genetic relatedness among those species, and dendrograms were constructed in which the pathogenic *Sarcocystis* spp., *S. tenella* and *S. arieticanis*, are grouped together and are clearly distinct from *S. gigantea* and *T. gondii*, which form a separate cluster.

A polymorphic DNA fragment present in the RAPD-fingerprints of the pathogenic *Sarcocystis* spp., but not in those of *S. gigantea* or *T. gondii*, was isolated from the *S. tenella* fingerprint and cloned into pUC18. The recombinant plasmid, termed "pUC18/STF10", was used as a probe in Southern hybridisation studies, where it hybridised to the DNA of pathogenic *Sarcocystis* spp., but not to that of *S. gigantea*, *T. gondii* or mammalian DNA of sheep or mouse. The hybridisation signals obtained from *S. tenella* and *S. arieticanis* show distinct patterns. In order to obtain some information on the nature of the probe, approximately two thirds of it were sequenced. DNA sequences were compared with sequences available in GenBank®. Neither search showed significant similarities with known sequences.

The potential of the developed probe for the in vivo diagnosis of infections with pathogenic *Sarcocystis* spp. in sheep and possibilities to improve the sensitivity and specificity of such a test as well as the advantages and drawbacks of RAPD-PCR in phylogenetic and taxonomic studies of protozoan parasites are discussed.