

## 5 Zusammenfassung

Rekombinante Antigene aus Lungenwurmlarven-cDNA-Banken bieten die Voraussetzung zur Entwicklung neuer Diagnose- und Vakzineverfahren zur Diktyokaulose des Rindes. Die vierten und fünften Larvenstadien sind dabei von vorrangigem Interesse, da ihnen ein entscheidender immunogener Stimulus zugeschrieben wird. Diese Larven kommen natürlicherweise nur im Wirt vor. Ihre Gewinnung mittels *in vitro* Kultivierung oder experimenteller Infektion ist aufwendig. Das so unter vertretbarem Aufwand zu gewinnende Material reicht für die Konstruktion einer cDNA-Bank auf konventionellem Wege nicht aus. Daher wurde ein Verfahren zur unspezifischen Amplifikation und anschließenden Klonierung der aus diesen Parasitenstadien gewonnenen mRNA bzw. cDNA entwickelt. Zudem wurde die *in vitro* Kultivierung von Lungenwurmlarven etabliert und optimiert.

Da dritte Larven relativ zahlreich zur Verfügung standen, kamen diese zunächst als Ausgangsmaterial bei der Entwicklung des cDNA-PCR-Verfahrens zum Einsatz. Zuerst wurde die RNA-Isolierung unter Anwendung verschiedener, teilweise kommerzieller Systeme untersucht. Der durchschnittliche Gesamt-RNA-Gehalt von 1.000 dritten Larven betrug ca. 50 ng und der mRNA-Anteil entsprach dabei ca. 1-3%. Mit dem hier beschriebenen Verfahren isolierte mRNA diente als Vorlage bei der Synthese von cDNA-Fragmenten mit Längen von bis deutlich über 2.000 Nukleotide.

Im Rahmen der cDNA-Synthese kamen als Primer entweder freie homopolymere Thymidinoligonukleotide oder die auch zur mRNA-Isolierung verwendeten Thymidinketten paramagnetischer Partikel (Dynabeads®) zur Anwendung. Dementsprechend entstand ungebundene cDNA oder kovalent an Dynabeads® gebundene *Fest-Phasen-cDNA*. Die ungebundene cDNA als auch die *Fest-Phasen-cDNA* wurden nach der Determination der cDNA-3' Enden durch Anhängen von ca. 30 Guanosinnukleotiden (Oligo-(dG) Tailing) amplifiziert. In einer dritten Variante wurde *Fest-Phasen-cDNA* an ihrem 3' Ende anhand der Ligation eines definierten Oligonukleotids an die cDNA-3' Enden (SLIC) bestimmt und ebenfalls in der PCR vervielfältigt. Im Vergleich dieser drei Verfahren führte die *Fest-Phasen-cDNA-PCR* nach Oligo(dG)-Tailing zu den besten Ergebnissen. Es wurden dadurch cDNA-Fragmente dritter Larven mit einer Länge von über 2.000 bp generiert. Bei Verwendung von cDNA aus vierten/fünften Larven entstanden Produkte bis über 2.500 bp.

Die unidirektionale Klonierung von cDNA-PCR-Produkten dritter Larven führte zur Konstruktion einer cDNA-Bank mit  $1 \times 10^6$  rekombinanten Klonen. Durch ein Plaquescreening mit einer DIG-markierten cDNA-Sonde wurden *Dictyocaulus*-Sequenzen in der Bank nachgewiesen. Die Nukleinsäuresequenzen der cDNA-Inserts zweier Reagenten wurden analysiert. Beide enthielten mRNA-typische Strukturen. Anschließend gelang unter Verwendung der entsprechenden cDNA-PCR-Produkte erstmals die Konstruktion einer cDNA-Bank vierter/fünfter Lungenwurmlarven. Diese Bank bestand aus  $5 \times 10^5$  unabhängigen Klonen. Elf zufällig gepickte Klone enthielten Inserts zwischen ca. 200 und 600 bp mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 350 bp. Anhand eines Sequenzhomologievergleichs konnte bei einem dieser Klone eine hohe Homologie zu einem konservierten Gen anderer Helminthen ermittelt werden.

Die *in vitro* Kultivierung entscheideter Lungenwurmlarven geschah unter 5%iger, 10%iger und 20%iger CO<sub>2</sub>-Inkubation. Während sich bei der 5%igen Inkubation durchschnittlich 8,3% (SD±7,76) der eingesetzten Larven weiterentwickelten, waren dies bei der 10%igen 21,8% (SD±13,09) und bei der 20%igen CO<sub>2</sub>-Inkubation 37,9% (SD±15,62). Diese Unterschiede waren statistisch signifikant.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Konstruktion einer cDNA-Bank vierter/fünfter Lungenwurmlarven bietet die Voraussetzung für vielversprechende Untersuchungen auf dem Weg zur verbesserten Lungenwurmdiagnostik und -vakzine. Dazu soll zunächst die cDNA-Bank einem Immunoscreening unter Verwendung definierter Antiseren unterzogen werden. Das Ziel ist dabei die Isolierung diagnostisch verwendbarer und/oder protektiver rekombinanter Antigene. Grundsätzlich können die hier entwickelten Techniken zur RNA-Isolierung und unspezifischen Amplifikation von cDNA aus Lungenwurmlarven jedoch auch bei der Arbeit mit anderen Nematodenlarven oder isoliertem Gewebe angewendet werden.

## Summary

Georg von Samson-Himmelstjerna (1995)

### **PCR-based construction of cDNA libraries from minute amounts of *Dictyocaulus viviparus* larvae.**

Recombinant antigens from *D. viviparus* larvae cDNA libraries could be useful for the development of new techniques for both diagnosis and vaccination. The fourth and fifth larvae are of major interest for they are supposed to play a major role in the stimulation of immunity. These larvae occur naturally only within the host. The production of those larvae by *in vitro* cultivation or experimental infection is expensive. With reasonable effort the resulting material is not sufficient for the conventional construction of a cDNA library. Therefore a strategy for the unspecific amplification and the subsequent cloning of mRNA or cDNA from those parasites was developed. Furthermore the *in vitro* cultivation of lungworm larvae was established and optimized.

As third stage larvae were available in high numbers, these stages were used to first develop the technique of the cDNA-PCR-procedure. At the beginning the RNA isolation was examined using different systems including commercially available kits. The average total RNA content of 1.000 third stage larvae was 50 ng containing 1-3% mRNA. Messenger RNA isolated by using the procedure described in this study served as template for the synthesis of cDNA fragments of clearly up to more than 2.000 nucleotide length.

For the cDNA synthesis either homopolymeric thymidinoligonucleotids or the oligo(dT)-chains of paramagnetic beads (Dynabeads®) were used resulting in unbound cDNA or solid-phase-cDNA covalently linked to the Dynabeads®. The unbound cDNA as well as the solid-phase-cDNA was amplified after determination of the cDNA-3' ends by terminal ligation of approximately 30 guanosinnucleotids (Oligo(dG)-tailing). In a third way solid-phase-cDNA was determined at its 3' end by ligation of a defined oligonucleotide to the cDNA-3' ends (SLIC) and also amplified. Comparing these procedures the best results were achieved by the solid-phase-cDNA-PCR after oligo(dG)-tailing. Thereby cDNA fragments from third stage larvae with more than 2.000 bp in length were generated. With the use of cDNA from fourth/fifth stage larvae even products of more than 2.500 bp were produced.

The unidirectional cloning of cDNA-PCR products from third stage larvae led to the construction of a cDNA library with  $1 \times 10^6$  recombinant clones. *Dictyocaulus* sequences were detected by phagescreening with a cDNA probe. The sequences of cDNA inserts from two reactive clones were analyzed. Both contained structures typical for mRNAs. After the technique had been established with third stage larvae, the first existing cDNA library from fourth/fifth stage larvae was constructed. The library consisted of  $5 \times 10^6$  independent clones. Eleven randomly chosen clones contained inserts between about 200 and 600 bp with an average of about 350 bp. The sequence from the insert of one of these clones showed high homology to an actin sequence of other helminth species.

The *in vitro* cultivation of exsheathed lungworm larvae was performed in 5%, 10% and 20% CO<sub>2</sub> atmosphere. During the 5% incubation an average of 8.3% (SD±7,76) of the larvae developed to fourth stage larvae, with 10% incubation 21.8% (SD±13,09) and with 20% incubation 37.9% (SD±15,63). These differences were statistically significant.

The construction of a cDNA library of fourth/fifth stage lungworm larvae described here provides the prerequisite for future investigations towards an improved lungworm diagnosis and vaccine. The cDNA library will be immunoscreened using defined antisera, to isolate recombinant antigens with potential for diagnosis and/or vaccine. The techniques for RNA isolation and unspecific amplification of cDNA from lungworm larvae presented here may also be applied to other parasitic stages or isolated target tissues.