

6. SUMMARY

In the present study the entire small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) nucleotide sequences of three coccidian parasites, *Sarcocystis moulei*, *Sarcocystis capracanis* and *Isoospora felis* were determined by manually sequencing of amplified PCR products. The sequences were aligned with other coccidian parasites by creating three groups of taxa, using full-length alignment and alignment according to the conserved secondary structure of the gene. Consequently six groups for phylogenetic analysis were formed and submitted to several computer algorithms, using both distance- and discrete character-based approaches (Neighbor-joining, Maximum likelihood and Maximum parsimony).

The results of these analyses placed the two species of the family of the Sarcocystidae into the genus *Sarcocystis*. *S. moulei* proved to be more closely related to *S. gigantea* and together with *S. fusiformis*, they form a monophyletic group of non-pathogenic species with felids as definitive hosts. *S. capracanis* is a sister-taxon to *S. tenella* and together with *S. arieticanis* they form a monophyletic group of pathogenic *Sarcocystis* species with canids as definitive hosts. The question of monophyly or paraphyly for all the members of the genus *Sarcocystis* tested can not unambiguously be solved but it is suggested to rely on the results obtained by secondary structure alignment which support monophyly for the genus *Sarcocystis*.

I. felis was consistently placed as a sister-taxon to *T. gondii* and *N. caninum* within all the performed analyses. Since also some of the morphological and biological features of *I. felis* are contradictive to its present placement into the family of the Eimeriidae, its reclassification should be considered.

7. ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

Beate E. Schnitzler: Phylogenetische Untersuchungen an den beiden Kokzidiengattungen *Sarcocystis* und *Isoospora*

Problemstellung

Die beiden zystenbildenden Kokzidienarten *Sarcocystis moulei* und *Sarcocystis capracanis* sowie *Isoospora felis*, eine Kokzidienart, die keine extraintestinalen Zysten bildet, sind parasitische Protozoen, die zum Stamm der Apicomplexa gehören. Ursprünglich wurden Protozoen anhand ihrer Entwicklungszyklen, ihrer Wirtsspezifität und ihrer Morphologie klassifiziert. Da sich viele Arten morphologisch nicht voneinander unterscheiden lassen und bei den 122 beschriebenen *Sarcocystis*-Arten (LEVINE 1986) nur von weniger als der Hälfte die Entwicklungszyklen bekannt sind, sind Klassifikationen immer wieder Gegenstand widersprüchlicher Diskussionen geworden. Erst seit kurzer Zeit werden in zunehmendem Maße molekularbiologische Methoden, zum Beispiel Vergleiche von DNA-Sequenzen, zur Klassifizierung und zur Untersuchung phylogenetischer Verwandtschaften von Protozoen herangezogen. SSU rRNA (small subunit ribosomal RNA) Gensequenzen werden vorzugsweise zur Untersuchung phylogenetischer Verwandtschaften eingesetzt, da diese Gene in fast allen Organismen vorkommen und hochkonservative Regionen besitzen, die als Startregionen für Polymerase-Kettenreaktionen genutzt werden können, sowie semikonservative Regionen, die phylogenetisch interessante Informationen enthalten. Entsprechende Analysen sind bereits bei verschiedenen Arten aus dem Stamm der Apikomplexa durchgeführt worden, u. a. bei den Gattungen *Sarcocystis* (TENTER *et al.* 1992, ELLIS *et al.* 1995, ELLIS und MORRISON 1995), *Eimeria* (BARTA *et al.* 1991) sowie *Toxoplasma* und *Neospora* (ELLIS *et al.* 1994a, HOLMDAHL *et al.* 1994).

Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten die kompletten SSU rRNA Gensequenzen von *Sarcocystis moulei*, *Sarcocystis capracanis* und *Isoospora felis* sequenziert und mit bereits bekannten Sequenzen verglichen werden, um nähere Informationen über den Verwandtschaftsgrad zueinander und zu anderen Kokzidienarten und -gattungen zu erhalten.

PCR, Sequenzierung und Methodik der phylogenetischen Analyse

PCR-Amplifikationen von doppelsträngigen DNA-Fragmenten des SSU rRNA-Gens sind mit Hilfe universeller Primer durchgeführt worden. Die doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden gereinigt und anschließend sequenziert. Die Sequenzierungen sind mit einem Sequenase-Kit und einem der universellen Primer durchgeführt worden, wobei die Sequenzfragmente mit ^{32}P markiert worden sind, um ein Sichtbarmachen der Banden mittels Autoradiographie zu ermöglichen. Die Sequenzmuster der Autoradiographien wurden mit einem Computerprogramm automatisch gelesen, und die sich überlappenden Fragmente wurden zu einer gesamten Gensequenz zusammengesetzt, die dann mit bereits bekannten SSU rRNA-Gensequenzen (Genbank) verglichen werden konnten. Dazu wurden die Computerprogramme „Multiple Alignment Program (ClustalW)“ und „Alignment anhand der Sekundärstruktur der SSU rRNA-Gene (DCSE)“ benutzt. Auf der Basis dieser beiden Methoden sind verschiedene phylogenetische Bäume mit Computerprogrammen (Neighbor-joining, Maximum likelihood, Maximum parsimony) erstellt worden. Die Sequenzen von *S. moulei*, *S. capracanis* und *I. felis* sind mit denen anderer Arten und Gattungen zu drei Gruppen kombiniert worden. Durch die Anwendung von zwei unterschiedlichen Methoden des Alignments ergaben sich sechs Gruppen, deren phylogenetische Verwandtschaft mit verschiedenen Computerprogrammen analysiert werden konnte.

Resultate und Interpretation der phylogenetischen Analyse

Die Resultate dieser Analysen bestätigten, daß die beiden *Sarcocystis*-Arten *S. moulei* und *S. capracanis* der Gattung *Sarcocystis* angehören. Es wurde gezeigt, daß *S. moulei* und *S. gigantea* den größten Verwandtschaftsgrad zueinander aufweisen und zusammen mit *S. fusiformis* eine monophyletische Gruppe bilden. Diese drei Arten haben gemeinsam, daß sie nicht pathogen sind und Katzen als Endwirte haben. Des weiteren bilden *S. capracanis* und *S. tenella* eine Schwester-Gruppe mit *S. arieticanis* als nächstem Verwandten. Diese drei pathogenen Arten mit Kaniden als Endwirten bilden ebenfalls eine monophyletische Gruppe. In der vorliegenden Studie konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Gattung *Sarcocystis* mono- oder paraphyletisch ist. Die Ergebnisse des Alignments anhand der Sekundärstruktur des SSU rRNA Gens deuten aber sehr auf die Monophylie der Gattung hin.

I. felis zeigte sich in allen durchgeführten Analysen als nächster Verwandter von *T. gondii* und *N. caninum*. Die Resultate der phylogenetischen Analysen entsprechen auch den morphologischen und biologischen Gegebenheiten von *I. felis* und nahe verwandter Gattungen, und sie belegen die Hypothese von TADROS und LAARMAN (1982), daß mehrwirtige zystenbildende Kokzidien von einwirtigen Vorfahren abstammen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sowie die Analyse der morphologischen und biologischen Eigenschaften lassen die Zugehörigkeit von *I. felis* zur Familie der Fimeriidae als zweifelhaft erscheinen.