
Charakterisierung des *Eimeria bovis*
Mikronemenproteins 4 (EbMIC4)
und
erste Studien zur Modulation des
Wirtszell-Proteoms durch *Eimeria bovis*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von Kathleen Lutz

Gießen, November 2008

Aus dem Institut für Parasitologie des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan des Fachbereiches Biologie und Chemie: Prof. Dr. P. R. Schreiner

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Clauss
Institut der Tierphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Zahner
Institut für Parasitologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Disputation: 16. Januar 2009

„Das Können, nicht das Wissen, durch die Wissenschaft geübt“

Der Wert davon, dass man zeitweilig eine *strenge Wissenschaft* streng betrieben hat, beruht nicht gerade auf deren Ergebnissen: denn diese werden, im Verhältnis zum Meere des Wissenswerten, ein verschwindend kleiner Tropfen sein. Aber es ergibt einen Zuwachs an Energie, an Schlussvermögen, an Zähigkeit der Ausdauer; man hat gelernt, einen *Zweck zweckmäßig* zu erreichen. Insofern ist es sehr schätzbar, in Hinsicht auf Alles, was man später treibt, einmal ein wissenschaftlicher Mensch gewesen zu sein.)
(Friedrich Nietzsche)

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.2 Entwicklungszyklus von <i>Eimeria bovis</i>	2
1.3 Der Apikalkomplex	4
1.4. Mikronemenproteine und ihre Bedeutung	7
1.5 Invasion der Wirtszelle	10
1.6 „Das Glideosom“ – Der Motor der Fortbewegung	12
1.7 Einfluss der Apikomplexa auf ihre Wirtszelle	14
1.8 Bearbeitete Fragestellungen	16
 Kapitel 2: Material und Methoden	 19
2.1 Chemikalien und Standardpuffer	19
2.2 Kulturmedien	19
2.3 Antibiotika	20
2.4 Bakterien- und Hefenstämmen	20
2.5 Vektoren	21
2.6 Verwendete Primer	21
2.7 Gewinnung des biologischen Untersuchungsmaterials	25
2.7.1 Versuchstiere	25
2.7.2 Maßnahmen vor Ankunft der Kälber in den institutseigenen Stallungen	25
2.7.3 Infektion der Versuchstiere	25
2.7.4 Gewinnung der <i>E. bovis</i> Oozysten	25
2.7.5 Gewinnung der <i>E. bovis</i> -Sporozoiten	26
2.7.6 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	27
2.7.6.1 Zelllinien	28
2.7.6.1.1 Bovine Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (BUVEC)	28
2.7.6.1.2 Bovine fetale Gastrointestinalzellen (BFGC)	29
2.7.6.2 <i>In vitro</i> -Infektion	29
2.7.6.3 Subkultivierung der Zellen	29
2.7.6.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen sowie von invasiven Stadien von <i>E. bovis</i>	30
2.7.6.5 Bestimmung der Infektionsrate bei <i>E. bovis</i> -infizierten Wirtszellen	30
2.7.6.6 Gewinnung von Gesamtprotein aus <i>E. bovis</i> -infizierten Wirtszellen	31

2.7.7 In vitro-Gewinnung der <i>E. bovis</i>-Merozoiten I	31
2.7.8 Gewinnung von Seren	31
2.8 Molekularbiologische Methoden	32
2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren	32
2.8.1.1 Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus <i>E. bovis</i> -Merozoiten	32
2.8.1.1.1 Isolierung mittels QIAamp® DNA Mini Kit für Gewebeprobe (QIAGEN)	32
2.8.1.1.2 Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	32
2.8.1.2 Isolierung und Behandlung von Total-RNA	33
2.8.1.2.1 Isolierung von Total-RNA aus <i>E. bovis</i> mittels Trizol® (Invitrogen)	33
2.8.1.2.2 Isolierung von Total-RNA aus eukaryotischen Wirtszellen mittels RNeasy® Mini-Kit (QIAGEN)	33
2.8.1.2.3 RNA-Cleanup mit RNeasy® Micro-Kit (QIAGEN)	34
2.8.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA (pDNA) aus Bakterien	34
2.8.1.3.1 Isolierung mit Miniprep Kit I Gold (PheLab)	34
2.8.1.3.2 Isolierung über alkalischer Lyse	35
2.8.1.4 Spektrophotometrische Messung von DNA und RNA	35
2.8.2 Herstellung einer genomischen DNA-Bank von <i>E. bovis</i>	35
2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.8.3.1 Allgemeine Anmerkungen	39
2.8.3.2 Testen von Bakterienklonen (Kolonie-PCR)	40
2.8.3.3 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mittels PCR	40
2.8.4 Reverse Transkriptase (RT⁺)-PCR	40
2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese	41
2.8.5.1 Agarosegele zum Nachweis von DNA	41
2.8.5.2 Agarosegele zum Nachweis von RNA	42
2.8.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	42
2.8.7 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen	42
2.8.7.1 Analytischer Verdau mit Restriktionsenzymen	42
2.8.7.2 Präparativer Verdau mit Restriktionsenzymen	43
2.8.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	43
2.8.9 Ligation	43
2.8.9.1 Ligation von PCR-Produkten mittels pDrive Vektor Kit (Qiagen)	43
2.8.9.2 Ligation von Produkten aus dem Restriktionsverdau	43
2.8.10 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	44
2.8.10.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen (Qiagen Protokoll)	44
2.8.10.2 Bestimmung der Transformationskompetenz	45
2.8.10.3 Überprüfung der Qualität der kompetenten Bakterienzellen	45
2.8.11 Transformation kompetenter Bakterien	45
2.8.12 Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung	45
2.8.13 Analyse vorhandener <i>E. bovis</i>-Merozoiten I-cDNA-Phagenbanken	46
2.8.13.1 Herstellung von kompetenten Bakterien für die Amplifikation der Phagen	46
2.8.13.2 Untersuchung der Phagenbanken auf positive Klone	46
2.8.13.3 Hybridisierung der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde mit den Replika	47

2.8.13.4 Nachweisreaktion	47
2.8.13.5 Isolierung positiver Klone	48
2.8.13.6 Cre <i>loxP</i> -vermitteltes Umklonieren von Plasmiden	48
2.8.14 Southern Blot und Hybridisierung von Nukleinsäuren	49
2.8.14.1 Nukleinsäuretransfer	49
2.8.14.2 Hybridisierung der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde	50
2.8.14.3 Nachweisreaktion	50
2.8.15 Gezielte Hefe-Doppelhybridexperimente	50
2.8.15.1 Präparation der Hefen für die Transformation	52
2.8.15.2 Kotransformation der Hefen	52
2.9 Proteinchemische und immunologische Methoden	54
2.9.1 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	54
2.9.2 Mini-Expressionsanalyse	55
2.9.3 Präparative Proteinexpression	55
2.9.4 Reinigung rekombinanter Proteine	55
2.9.4.1 Isolierung des GST-Fusionproteins über Glutathion Sepharose™ 4B	56
2.9.4.2 Spaltung des GST-Fusionproteins mit Thrombin	56
2.9.4.3 Reinigung der Eluate über Benzamidin-Säulchen (Amersham Biosciences)	57
2.9.4.4 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)	57
2.9.5 Antikörperherstellung	57
2.9.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	58
2.9.7 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	58
2.9.8 Proteintransfer	60
2.9.8.1 Semidry-Verfahren	60
2.9.8.2 Tank-Blotting	60
2.9.8.3 Proteinfärbung und Dokumentation	61
2.9.9 Immunnachweis transferierter Proteine (Immun-Blot)	61
2.9.10 Verwendete Antikörper	63
2.10 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	63
2.10.1 Fixierung des Probenmaterials	63
2.10.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFAT)	64
2.10.3 Verwendete Antikörper	65
2.10.4 Lichtmikroskopie	66
2.10.5 Elektronische Bildbearbeitung	66
2.11 Behandlung von <i>E. bovis</i>-Sporozoiten mit verschiedenen Substanzen zum Auslösen der Mikronemensekretion	67
2.12 Proteomics	68
2.12.1 Vorbereitung der Proteinproben	68

2.12.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese	69
2.12.2.1 Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung (IEF)	69
2.12.2.2 Zweite Dimension	70
2.12.3 Western Blot	71
2.12.3.1 Transfer (Tankblot)	71
2.12.3.2 Immunologischer Nachweis	72
2.12.4 Massenspektrometrie (MS)-kompatible Coomassiefärbung	73
2.12.5 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel	73
2.12.6 Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)	74
 Kapitel 3: Ergebnisse	 75
3.1 Identifizierung der DNA-Sequenz von Ebmic4	75
3.1.1 Grundlagen für die Identifizierung der Ebmic4-Sequenz	75
3.1.2 Vervollständigung der DNA-Sequenz mittels PCR	76
3.1.2.1 Amplifikation mit spezifischen Primern	76
3.1.2.2 Amplifikation mit degenerierten Primern	77
3.1.3 Überprüfung vorhandener cDNA-Phagenbanken von <i>E. bovis</i> auf Sequenzen von Ebmic4	78
3.1.4 Ermittlung weiterer Ebmic4-Teilabschnitte mittels „Genome Walking“	79
3.1.4.1 Herstellung der „Genome Walking“-Banken	79
3.1.4.2 Identifizierte Sequenzabschnitte von Ebmic4	80
3.1.5 <i>In silico</i> -Analyse der bisher identifizierten Sequenz von Ebmic4	82
3.1.6 Identifizierung der kodierenden Sequenz von Ebmic4 über RT ⁺ -PCR	82
3.2 In silico-Analyse der Ebmic4-DNA-Sequenz	84
3.3 In silico-Analyse der EbMIC4-Proteinsequenz	85
3.3.1 Allgemeine Charakterisierung von EbMIC4	85
3.3.2 Der C-Terminus von EbMIC4	89
3.3.3 Extrazellulärer Bereich von EbMIC4	90
3.3.4 Homologievergleiche	92
3.4 Bestimmung der Anzahl der Genkopien vom Ebmic4 im <i>E. bovis</i>-Genom	95
3.5 Transkription des Ebmic4-Gens in verschiedenen <i>E. bovis</i>-Stadien	97
3.5.1 Transkription von Ebmic4 in Sporozoiten und Merozoiten	97
3.5.2 Transkription von Ebmic4 während der ersten Merogonie	98
3.6 Expression von EbMIC4 in <i>E. bovis</i>-Entwicklungsstadien	104
3.6.1 Herstellung und Prüfung geeigneter Antikörpern zum Nachweis von EbMIC4	104
3.6.1.1 Herstellung eines rekombinanten Fragments von EbMIC4	104

3.6.1.2 Expression, Aufreinigung und Kopplung von EbMIC4-Cterm	105
3.6.1.3 Immunisierung	106
3.6.2 Nachweis von EbMIC4 in <i>E. bovis</i>-Entwicklungsstadien	107
3.6.2.1 Immunoblot-Analysen	107
3.6.2.2 Nachweis im IIFAT	108
3.6.3 Nachweis von EbMIC4 in <i>E. bovis</i>-infizierten Wirtszellen	112
3.6.3.1 Nachweis im Immunoblot	112
3.6.3.2 Nachweis im IIFAT	113
3.7 Immunologische Kreuzreaktionen zwischen EbMIC4 und EtMIC4	119
3.8 Untersuchungen zur Sekretion und Oberflächenverteilung von EbMIC4	121
3.9 Suche nach potentiellen Interaktionspartnern des C-Terminus von EbMIC4	125
3.9.1 GST-Fusionsprotein-Pull-Down-Experiment	125
3.9.2 Untersuchungen mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems (YTH-System)	125
3.9.2.1 Klonierung der prey (Beute)- und bait (Köder)-Konstrukte für <i>T. gondii</i>	125
3.9.2.2 Klonierung der prey (Beute)- und bait (Köder)-Konstrukte für <i>E. bovis</i>	127
3.9.2.2.1 Identifizierung der DNA-Sequenz von EbAldolase	127
3.9.2.2.2 Klonierung des bait-Konstruktes für <i>E. bovis</i>	129
3.9.2.2.3 Klonierung des prey-Konstrukte für <i>E. bovis</i>	129
3.9.2.3 Kotransformation in Hefen und Selektion	130
3.10 Untersuchungen zum Einfluss von <i>E. bovis</i> auf seine Wirtszelle	131
3.10.1 Suche nach einem Referenzprotein	131
3.10.1.1 Überprüfung der Proteinexpression potentieller Referenzproteine	131
3.10.1.2 Transkription des bovinen Vimentin-Gens in <i>E. bovis</i> -infizierten und nicht-infizierten BFGC am 17. Tag p. i.	134
3.10.2 Vergleich der Gesamtzell-Proteome von <i>E. bovis</i>-infizierten und nicht-infizierten BFGC-Wirtszellen	135
3.10.2.1 Probengewinnung	135
3.10.2.2 Normierung der Proben über bovines Vimentin	135
3.10.3 Ergebnis der 2D-Gelelektrophorese	137
3.10.4 Auswertung der MALDI-TOF-Analysen	140
Kapitel 4: Diskussion	153
4.1 Das Mikronemenprotein EbMIC4	153
4.2 Die Interaktion von <i>E. bovis</i> mit seiner Wirtszelle	171
Kapitel 5: Zusammenfassung	181
Kapitel 6: Summary	183

Kapitel 7: Anhang	185
A: Klonsequenzen	185
Zu 3.1.2.1 Ebmic4 Klon10 (1076 bp, pDrive Vektor)	185
Zu 3.1.3 partielle cDNA-Sequenzen der Phagenbankklone von Ebmic4	186
Zu 3.1.4 partielle gDNA-Sequenzen von Ebmic4	189
Zu 3.1.5 zusammengesetzte DNA-Sequenz von Ebmic4 (gDNA-Sequenzen und cDNA-Sequenzen, 8718 bp)	194
Zu 3.1.6 Verifizierung der EbMIC4-Sequenz (RT-PCR)	197
Zu 3.4 Teilsequenz von Ebhsp70	202
Zu 3.8.2 Teilsequenz von Ebaldolase	202
B: Proteomik	206
1. Referenzprotein bovines Vimentin (BtVIM)	206
2. Auswertung der zweidimensional aufgetrennten Proteinproben mit dem Programm Proteomweaver	207
3. Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse und vergrößerte Darstellung von Abb. 3.53 und Abb. 3.54	217
 Literaturverzeichnis	 227
Abkürzungsverzeichnis	247
Abbildungsverzeichnis	250
Tabellenverzeichnis	254
Veröffentlichungen und Stipendium	256

Kapitel 1: Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Seit der Antike beschäftigt sich der Mensch mit Erkrankungen, deren Ursachen lange unentdeckt blieben. Erst mit der Erfindung des Mikroskops im 17. Jahrhunderts und dessen weitreichenden Verbesserungen klärten sich viele Phänomene auf. 1880 entdeckte der französische Militärarzt Charles L. A. Laveran (1845-1922) die Ursache der Malaria: „...*pigmenthaltige kugelförmige Körperchen von verschiedener Größe, die sich amöbenartig bewegten, frei oder an Erythrozyten geklebt; außerdem nichtpigmentierte Körperchen, die leichte Flecken in den Erythrozyten verursachten, und schließlich pigmentierte halbmondartig geformte Elemente, die meine besondere Aufmerksamkeit erregten: Ich ging von der Annahme aus, dass dies die Parasiten seien...*“ (aus: Die parasitäre Natur der Malariaanfälle, Beschreibung eines neuen, im Blut von Malariapatienten entdeckten Parasiten, Paris 1881). Trotz der Fortschritte in der Malariaforschung sterben laut Angaben des Robert-Koch-Instituts in Berlin immer noch 1,5 bis 2,7 Millionen Menschen weltweit jährlich an Malaria.

Neben der Malaria gibt es weitere Protozoen des Stammes der Apikomplexa, die eine enorme medizinische und veterinärmedizinische Bedeutung haben. So werden Erkrankungen wie die Toxoplasmose, Neosporose, Kryptosporidiose oder die Kokzidiose ebenfalls von solchen Erregern verursacht. Alle diese Erkrankungen können unter bestimmten Umständen schwere Schäden im Wirt verursachen und bis hin zum Tode führen. Verursacher sind eukaryotische Einzeller, die während ihres komplizierten Lebenszyklus in anderen Organismen parasitieren und mit spezialisierten, zellinvasiven Stadien unterschiedlichste Zellen des Wirtes befallen, um sich zu vermehren. Sie sind gekennzeichnet durch mehrere Organellen und Strukturen im apikalen Bereich (sog. Apikalkomplex), die den invasiven Stadien das Finden und Eindringen in eine passende Wirtszelle sowie das Ausbilden einer parasitophoren Vakuole ermöglichen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit *Eimeria (E.) bovis* einem der pathogensten Erreger der bovinen Kokzidiose neben *Eimeria zürnii* (Bürger, 1983; Ernst and Benz, 1986). *E. bovis* ist ein intrazellulär lebender Darmparasit des Rindes und verursacht akut bis chronisch verlaufende, katarrhalische bis hämorrhagische Enteritiden bei Kälbern und Jungrindern (Bürger, 1983). Auch wenn es selten zum Totalverlust des erkrankten Tieres kommt, bilden wirtschaftliche Einbußen aufgrund der schlechten Futtermittelverwertung sowie der mangelnden Gewichtszunahmen ein entscheidendes Kriterium für den Tierhalter, diese Parasitose zu bekämpfen (Gräfner et. al., 1985). Untersuchungen aus dem Jahre 1980 bezifferten die

jährlichen Verluste durch das Auftreten der Kokzidiose bei Rindern weltweit auf 723 Millionen US \$ (Fitzgerald, 1980).

1.2 Entwicklungszyklus von *Eimeria bovis*

Wichtig für die Suche nach Bekämpfungsstrategien ist die Kenntnis über den Entwicklungszyklus. Wie bei anderen einwirtigen Kokzidien besteht dieser bei *E. bovis* generell aus drei Phasen (Long, 1978), der exogenen Sporogonie und den endogen verlaufenden Phasen Merogonie und Gamogonie (Abb. 1.1). Die durch die Fäzes ausgeschiedenen unsporulierten, nur eine diploide Zelle enthaltenden Oozysten (Levine, 1982) sporulieren innerhalb weniger Tage unter der Bildung von vier Sporozysten mit jeweils zwei Sporozoiten in der Außenwelt, wobei eine ausreichende Feuchte, Temperaturen über 12°C und genügend Sauerstoff notwendig sind (Ernst and Benz, 1986; Graat et. al., 1994). Die sporulierten Oozysten sind infektiös und werden von den Tieren oral aufgenommen. Durch das spezielle Milieu des Verdauungstraktes kommt es zur Freisetzung der Sporozoiten (Nyberg and Hammond, 1965), die dann im Ileum das Darmepithel durchdringen, um aktiv in die Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren der Mikrovilli einzudringen. In der zellabgrenzenden parasitophoren Vakuole erfolgt die erste ungeschlechtliche Vermehrung in einem Zeitraum von 14-18 Tagen post infectionem (p. i.) (Hammond et. al., 1965). Ergebnis sind Makromeronten von einer mittleren Größe von 280 x 300 µm (Hammond et. al., 1946; Hammond and Fayer, 1968), die jeweils bis zu 120.000 Merozoiten enthalten können (Hammond et. al., 1946). Die über Ruptur der Wirtszelle freigesetzten Merozoiten I dringen in die Epithelzellen von Kolon und Zäkum ein und durchlaufen innerhalb von zwei Tagen die zweite Merogonie mit 10 µm großen Meronten, die ca. 36 Merozoiten II beinhalten (Hammond et. al., 1963). Mit der Umformung der Merozoiten II zu Mikro- und Makrogametozyten in den Epithelzellen von Zäkum und Kolon beginnt die Gamogonie (Hammond et. al., 1946). Die Gamonten reifen zu Mikro- und Makrogameten heran, die nach Verschmelzung (Syngamie) die Zygote bilden, die sich zum Sporont weiterentwickelt. Diese, umgeben von einer widerstandsfähigen Hülle, wird als unsporulierte Oozyste mit dem Kot ausgeschieden. Die Oozysten werden erstmals zwei bis fünf Tage nach der Reifung der 2. Merozoiten im Kot nachgewiesen (Hammond et. al., 1963), d. h. die Präpatenz dauert insgesamt ca. 18-21 Tage (Rommel, 1992).

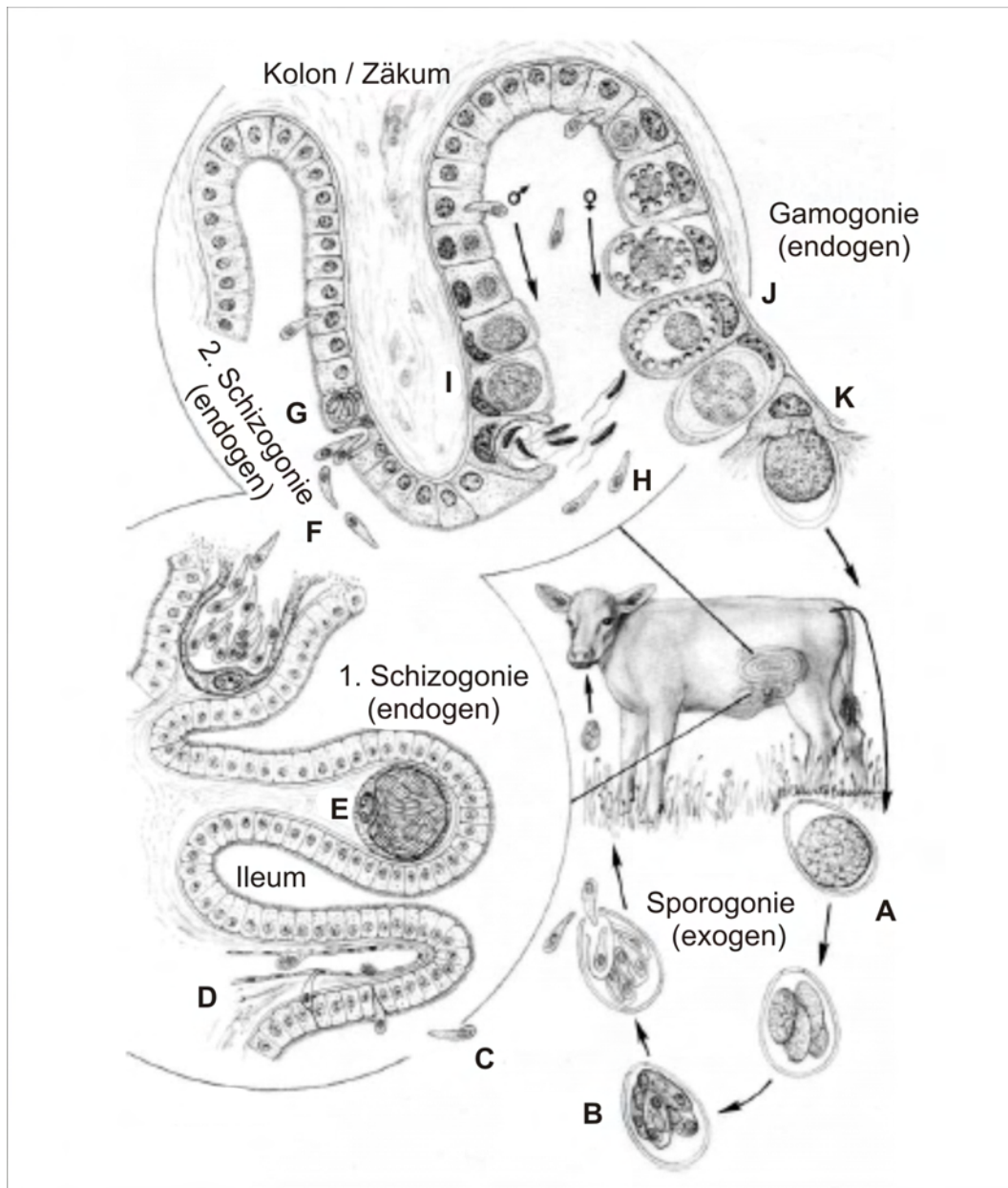


Abb.: 1.1: Entwicklungszyklus von *Eimeria bovis* (modifiziert nach Bowman, 1999).

A – unsporulierte Oozyste, B – sporulierte Oozyste, C – freier Sporozoit, D – befallende Endothelzellen der Lymphkapillaren der Mikrovilli im Ileum, E – Makromeront der 1. Schizogonie, F – Merozoiten I, G – Meront II, H – Merozoit II, I & J – männliche und weibliche Gamonten, K - neugebildete Oozyste

1.3 Der Apikalkomplex

Die Wirtszellinvasion ist ein dreiphasiger Prozess, bei dem vor allem die Organellen und Strukturen des Apikalkomplexes beteiligt sind. Alle Mitglieder der Apikomplexa besitzen neben den typischen Strukturen und Organellen (Roberts and Hammond, 1970) von eukaryotische Zellen in den invasiven Stadien besondere Komponenten, die unter dem Begriff Apikalkomplex zusammengefasst werden und eine klare Abgrenzung gegenüber anderen Protozoen ermöglichen (Abb. 1.2). Dazu gehören zum einen die strukturellen Elemente Konoid, Polarring-System und subpellikuläre Mikrotubuli und zum anderen die sezernierenden Organellen Mikronemen, Rhoptrien und Dichte Granula (Levine, 1970; Levine, 1973; Chobotar and Scholtyseck, 1982; Barta, 1989).

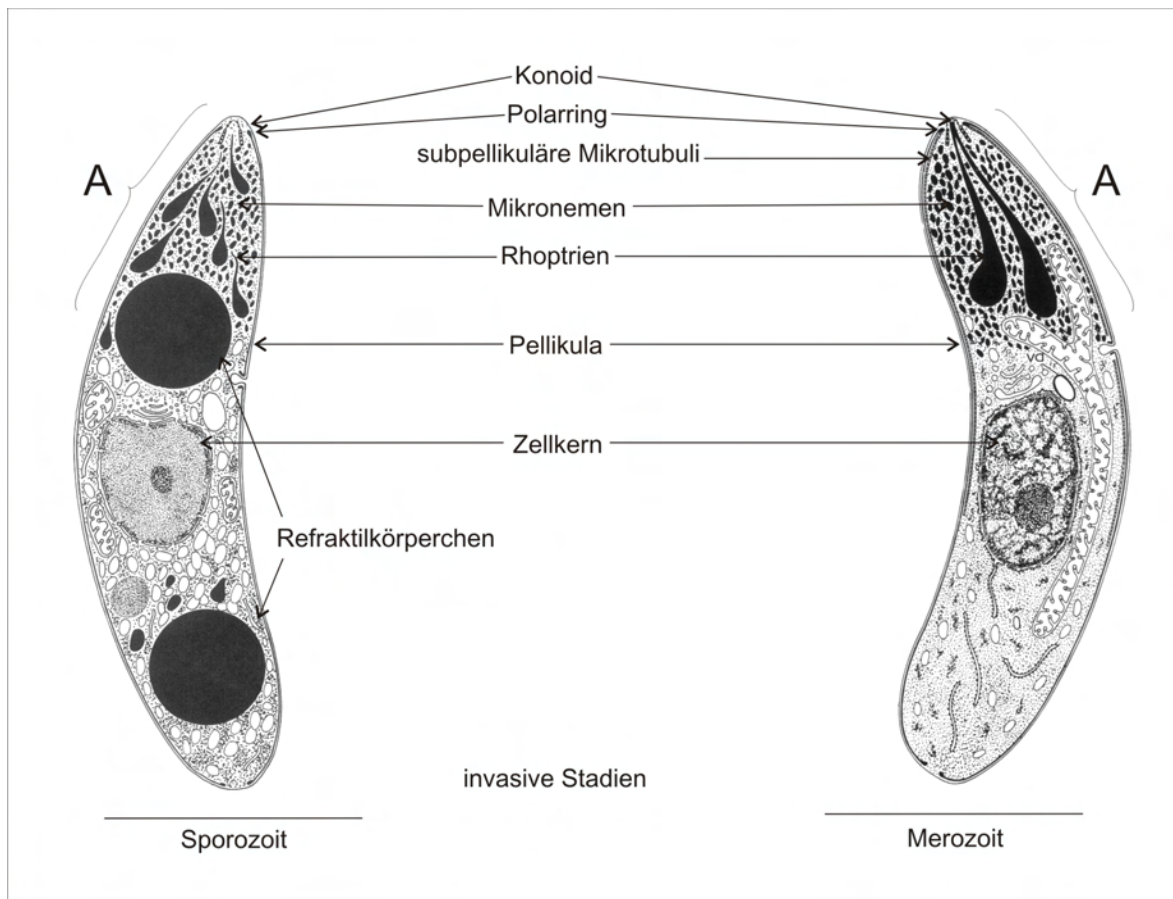


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Apikalkomplexes von *Eimeria*-Sporozoit und -Merozoit (modifiziert nach Scholtyseck, 1979).

A – Apikalkomplex; Gekennzeichnet wurden weiterhin die Refraktilkörperchen der Sporozoiten, der Zellkern sowie die Pellikula.

Das Konoid, erstmals beschrieben von Gustafson (1954) bei *T. gondii*, ist ein hohler kegelförmiger Stumpf am apikalen Ende des Parasiten, der aus einer speziesspezifischen Anzahl spiralförmig angeordneter Mikrotubuli aufgebaut ist (Long, 1982). Verbunden ist das

Konoid mit den präkonoidalen Ringen und dem Polarringkomplex (Morrisette and Sibley, 2002). Der Polarring-Komplex, eine osmiophile, ringförmig verlaufende Verdickung am apikalen Ende des inneren Membrankomplexes (IMC) dient der Verankerung der subpellikulären Mikrotubuli (Nichols and Chiappino, 1987). Bestehend aus zwei Ringen dient der posterior liegende als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (Nichols and Chiappino, 1987). Die subpellikulären Mikrotubuli erstrecken sich in einer regelmäßigen Anordnung von den Polarringen nach posterior bis auf Höhe des Zellkerns unterhalb der ICM (Long, 1982). Sie verleihen dem Parasiten dessen spezifische Form und legen die Polarität fest. Dabei variiert die Anzahl der Mikrotubuli stadien- und speziensspezifisch (Scholtyseck et. al., 1972). Die sezernierenden Organellen Mikronemen, Rhoptrien und Dichte Granula geben im Laufe der Invasion ihre Proteine in einer zeitlich definierten Reihenfolge mittels Exozytose ab (Carruthers and Sibley, 1997). Die sezernierten Proteine sind beteiligt an dem sogenannten „gliding“, dem Eindringen in die Wirtszellen sowie der Modifikation der parasitophoren Vakuole (PV) und der Wirtszelle (Dubremetz et. al., 1998; Dubremetz, 2007).

Die Mikronemen sind kleine, zylindrisch-längliche Organellen (Jacobs, 1967) im apikalen Teil des Parasiten. Bei den verschiedenen Apikomplexa wurden bisher unterschiedlich viele Mikronemenproteine identifiziert, die in einem gesonderten Kapitel (siehe 1.3) näher erläutert werden. Sie sind die zuerst sezernierten Proteine und beteiligt am Gleiten des Parasiten über die Wirtszelloberfläche (Sibley et. al., 1998) sowie der Invasion in eine geeignete Wirtszelle. Bei der Betrachtung der Gesamtmenge an Mikronemen pro Parasit bei den unterschiedlichen Apikomplexa stellte sich heraus, dass die Anzahl der vorhandenen Mikronemen mit der Gleitfähigkeit korreliert, d. h. je mehr Mikronemen vorhanden sind, desto weiter und desto schneller können sich die motilen Stadien über die Zelloberfläche der Wirtszellen bewegen (Tomley and Soldati, 2001).

Die Rhoptrien (Begriff 1964 von Senaud eingeführt) bezeichnet paarig vorkommende Organellen von verschiedener Anzahl und großer morphologischer Variabilität. Sie können keulenförmig, tropfenförmig, länglich oder gedrunken ausgeprägt sein und ihr vorderer Abschnitt erscheint immer verjüngt in Richtung Konoid zeigend. Das apikale Halsende ist schlecht definierbar und die Kontaktstelle am Konoid bisher nicht identifiziert (Porchet and Torpier, 1977; Dubremetz, 2007). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Rhoptrien modifizierte, sekretorische Lysosomen darstellen (Ngo et. al., 2004), da die Rhoptriengenese der Endosomenbildung stark ähnelt. Die Sekretion des Rhoptrieninhaltes erfolgt nach der Orientierung des Parasiten mit dem apikalen Pol zur Wirtszellmembran und während des Eindringens in die Wirtszelle. Sezerniert werden u. a. proteolytische Enzyme, die beim eigentlichen Invasionsvorgang eine Rolle spielen könnten (Scholtyseck and Mehlhorn, 1970). Eine Beteiligung von Rhoptrienproteinen wurde bei der Ausbildung von den „moving junctions“ bei *T. gondii* nachgewiesen (Lebrun et. al., 2005; Alexander et. al., 2005). Weitere

Experimente bei *T. gondii* zeigten, dass bestimmte Rhoprienproteine entweder im Lumen oder in der Membran der entstehenden parasitophoren Vakuole (PV) akkumulieren. Teilweise werden sie auch in die Wirtszelle abgegeben, wo sie beispielsweise in dem Kern wiederzufinden sind (Boothroyd and Dubremetz, 2008).

Dichte Granula sind membranbegrenzte, kugelige Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 0,2 μm , die nicht nur im apikalen Teil, sondern im gesamten Zytoplasma der invasiven Stadien zu finden sind (Scholtyseck, 1979; Carruthers and Sibley, 1997). Die gesamte Matrix ist sehr elektronendicht, was auf eine hohe Proteindichte hinweist (Souza, 2006). Kinetische Studien mit *T. gondii* zeigten, dass die Sekretion der Dichte Granula erst nach der Zellinvasion des Parasiten stattfindet und zwar dann, wenn die PV schon einige Minuten ausgebildet war (Carruthers and Sibley, 1997). Der Inhalt wird mittels Exozytose an lateralen Regionen über die Pellikula in die PV entlassen (Souza, 2006). Die sezernierten Proteine assoziieren mit der Membran der PV (PVM) oder mit dem intravakuolären Membrannetzwerk und modifizieren so die PV (Dubremetz et. al., 1998; Souza, 2006). Identifiziert als Moleküle der Dichte Granula bei *T. gondii* wurden bisher die GRA-Proteine 1-9, Isoenzyme von Nukleotid-Triphosphatase (NTPasen) sowie zwei Proteaseinhibitoren (Morris et. al., 2002; Pszenny et. al., 2002). GRA 1 und 2 verbinden sich mit dem Membrannetzwerk innerhalb der Vakuole (Cesbron-Delauw et. al., 1989; Mercier et. al., 1993; Mercier et. al., 1998). GRA 3 wird in die Membran der PV integriert (Henriquez et. al., 2005). Die Proteine GRA 4-8, jedes mit einer vorhergesagten Transmembrandomäne, bilden ein molekulares Sieb innerhalb der Membran der PV, das von Molekülen $< 19 \text{ kDa}$ passiert werden kann (Schwab et. al., 1994). GRA 9 bindet ans tubuläre Netzwerk innerhalb der PV (Adjogble et. al., 2004). Die identifizierten NTPasen sind beteiligt an der Verwertung von Purinen des Wirtes (Asai et. al., 1983; Sibley et. al., 1994; Asai et. al., 1995), der Freisetzung des Parasiten aus der PV (Stommel et. al., 1997; Silverman et. al., 1998) sowie in Prozessen zur Verringerung von ATP und Erhöhung der internen Ca^{2+} -Konzentrationen (Stommel et. al., 1997; Silverman et. al., 1998).

Untersuchungen an *T. gondii* zeigten, dass die Proteinsekretion der drei Organellen durch unterschiedliche Regulationsmechanismen gesteuert wird, wodurch eine zeitlich versetzte Sekretion innerhalb kürzester Zeit ermöglicht wird (Ngo et. al., 2000). Dabei spielen sowohl, die räumliche Trennung der Sekretionsorte als auch die Nutzung unterschiedlicher Signalkaskaden eine Rolle. Die Mikronemenproteine werden vom Trans-Golgi-Netzwerk durch ein Tyrosin-abhängiges zytoplasmatisches Signal zu den Mikronemen gebracht und über eine Ca^{2+} -vermittelte Exozytose am apikalen Ende des Konoids freigesetzt (Carruthers and Sibley, 1999). Die Dichte Granula- und Rhoprien-Sekretion ist dagegen Ca^{2+} -unabhängig. Die unreifen Rhoprienproteine werden mittels Signalpeptid vom

Trans-Golgi-Netzwerk zu immaturren Rhoptrien geschleust, wo sie weiter prozessiert werden (Soldati et. al., 1998; Ngo et. al., 2004), um dann zu den reifen Rhoptrien über ein Tyrosin-abhängiges Signal transportiert zu werden. Die Sekretion erfolgt ebenfalls am apikalen Ende des Konoids (Ngo et. al., 2000). An der Freisetzung der Dichte Granula-Inhalte, die im Detail noch nicht genau geklärt wurde und die wohl über mehreren Mechanismen vermittelt wird, ist unter anderem der NSF/SNAP/SNARE/Rab-Signalweg beteiligt (Chaturvedi et. al., 1999).

Ein weiteres morphologisches Charakteristikum der invasiven Stadien ist eine dreischichtige Membran, die Pellikula. Die äußere Membran, auch Plasmalemma genannt, umgibt den Parasiten vollständig. Die mittlere und die innere Membran bilden den inneren Membrankomplex (IMC), der nur an den Polarringen und den Mikroporen unterbrochen ist (Scholtyseck, 1979; Long, 1982). Bedeutend ist der IMC für die Verankerung des Glideosoms, das die Fortbewegung des Parasiten ermöglicht und in einem gesonderten Kapitel näher erläutert wird.

1.4. Mikronemenproteine und ihre Bedeutung

Mittlerweile sind insgesamt mehr als 40 Mikronemenproteine (MIC) von verschiedenen Apikomplexa identifiziert und beschrieben; alleine von *T. gondii* sind bisher 17 MICs bekannt (Abb. 1.3). Ein Großteil der Proteine beinhaltet Bereiche, die zu adhäsiven Domänen in Proteinen höherer Eukaryoten homolog sind. Einige dieser adhäsiven Domänen wurden nur in bestimmten Apikomplexa-Gattungen beschrieben, wie z. B. Mucin-ähnliche Domänen bei *Cryptosporidium parvum* GP900 oder Cystein-reiche Regionen bei *Theileria parvum* p104 (Tomley and Soldati, 2001). Andere, wie Thrombospondin Typ-1 (TSP-1)-Regionen und degenerierte Formen von TSP-1, von Willebrand-Faktor (vWF)-Typ-A-Domänen (I-Domäne), „epidermal growth factor“ (EGF)-ähnliche Domänen sowie Apple-Domänen fand man in mehr als einer Gattung. *In vitro*-Experimente zeigten, dass mikronemale I-Domänen an Moleküle binden, die für die *in vivo*-Interaktion mit der Wirtszelle wichtig sind. Beispielsweise bindet die rekombinant hergestellte I-Domäne von PfTRAP von *P. falciparum* an Heparin (McCormick et. al., 1999). „Apple“-Domänen wurden vor der Beschreibung bei Mikronemenproteinen nur in zwei löslichen Plasma-Glykoproteinen identifiziert: den Blutgerinnungsfaktor (FXI) und das Plasma-Prokallikrein, die an der Blutgerinnungskaskade beteiligt sind (Tomley and Soldati, 2001). Das Protein TgMIC4 von *T. gondii*, welches „Apple“-Domänen beinhaltet, wird vom Parasiten sezerniert und bindet sehr stark an humane Fibroblasten, wobei der eigentliche Mechanismus der Interaktion noch nicht geklärt wurde (Tomley and Soldati, 2001). EGF-ähnliche Domänen kommen in einer Vielzahl von Proteinen vor und spielen eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen. Sie besitzen Ca^{2+} -bindende Sequenzen, die für die

korrekte Faltung und Funktion der Proteine benötigt werden und die auch bei vielen Mikronemenproteinen identifiziert wurden. Bei einigen Proteinen, wie EtMIC4 von *E. tenella* und EmHSP250 von *E. maxima* (Tomley et. al., 2001; Witcombe et. al., 2003), wurde eine vielfache Aneinanderreihung dieser Domäne gefunden.

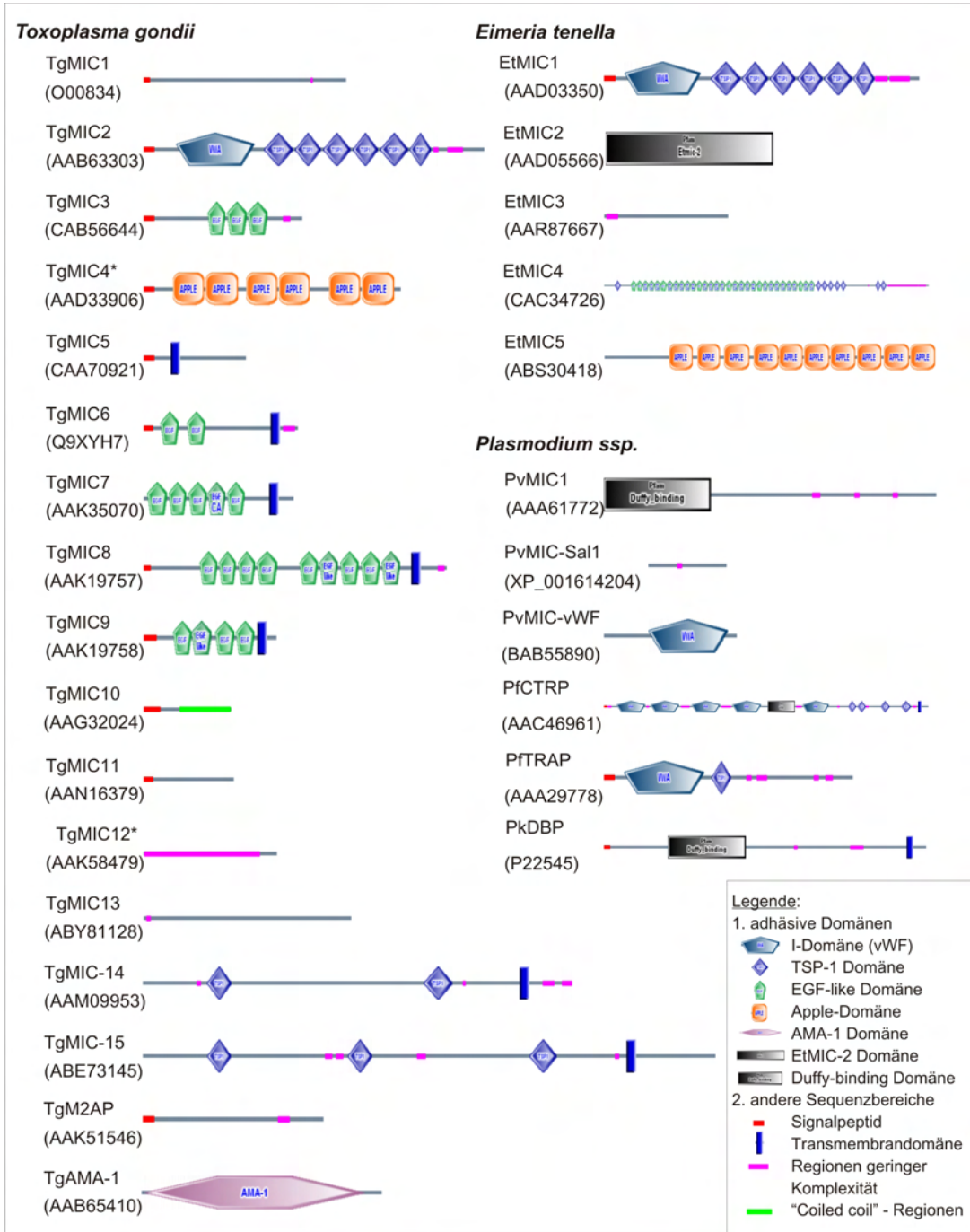


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus verschiedener Mikronemenproteine aus unterschiedlichen Apikomplexa, modifiziert nach Tomley and Soldati (2001).

Für die Gattungen *Toxoplasma*, *Eimeria* und *Plasmodium* werden repräsentative Mikronemenproteine beispielhaft aufgeführt. Angegeben sind ferner die Zugangsnummern (Zugangsnummer) unter der sie in der NCBI-Datenbank registriert sind. Mit Stern gekennzeichnete Proteine sind bisher nicht vollständig sequenziert.

Abk.: Pf – *P. falciparum*, Pv – *P. vivax*, Pk – *P. knowlesi*

Eine weitere wichtige Gruppe ist die Familie der TRAP-Proteine („thrombospondin-related anonymous protein“). Gekennzeichnet ist diese Gruppe durch das Vorhandensein von einer oder mehrerer Kopien der Typ-1-Wiederholung des humanen Blutplättchen-Thrombospondins (TSP-1 Domain). Identifiziert wurde dieses Motiv zuvor in vielen Proteinen der Vertebraten wie F-Spondin, TSP-1, TSP-2, Properdin und Mindin (Naitza et. al., 1998; Adams and Tucker, 2000; Adams and Lawler, 2004; Tucker, 2004). Homologe fand man bei *Drosophila melanogaster* (Umemiya et. al., 1997; Adolph, 2001) und *Caenorhabditis elegans* (Leung-Hagesteijn et. al., 1992). Durch den Vergleich unterschiedlicher Proteine ließ sich die Konsensussequenz „---W--W--W--CS-TCG-G---R-R-C“ ableiten (Adams and Tucker, 2000). Aus der Anwesenheit von TSP-1-Domänen in Proteinen unterschiedlichster, nicht verwandter Arten kann geschlussfolgert werden, dass das Motiv eine entscheidende funktionelle Bedeutung besitzt. Außerhalb der Apikomplexa wurden für die TSP-1-Domäne vielfältige Funktionen nachgewiesen: Bindungspartner für verschiedene Proteine, Heparin und Zellen, Beteiligung am Neuronenwachstum, TGF β -Aktivierung, Inhibierung der Angiogenese und der Proliferation sowie Induktion der Apoptose (Adams, 1997). Als Rezeptoren wurden CD36, HSPG, β_1 -Integrine sowie kleine Proteine identifiziert (Chen et. al., 2000). Bei den Apikomplexa sollen diese Domänen eine entscheidende Rolle bei der Lokomotion und der Invasionmaschinerie besitzen, wo sie ein entscheidendes Bindeglied zwischen der Oberfläche der Wirtszelle und dem Motorkomplex des Parasiten bilden (Naitza et. al., 1998). EtMIC4 von *E. tenella* (Tomley et. al., 2001) und TSP250 von *E. maxima* (Witcombe et. al., 2003) sind zwei bisher beschriebene TRAP-Proteine bei den Eimerien, die eine hohe Ähnlichkeit zu dem hier beschriebenen Protein EbMIC4 besitzen.

In der Tabelle 1.1 wurde Mikronemenproteine von *T. gondii* zusammengefasst, deren Funktion durch zahlreiche Untersuchungen schon genauer analysiert wurde (modifiziert nach Dowse and Soldati (2004). Dabei stellt sich heraus, dass viele Mikronemenproteine als Mikronemenproteinkomplexe vorliegen. Transmembranproteine dienen dabei als Begleiter (TgMIC2, TgMIC6, TgMIC8) für lösliche Mikronemenproteine, die ohne diesen Rückhalt nach der Exozytose in den Extrazellularraum diffundieren würden. Die meisten dargestellten Mikronemenproteine sind an der Bindung der Wirtszelle während der Fortbewegung oder Invasion beteiligt (TgMIC1-4, TgAMA1). Einige unterstützen die korrekte Faltung und den Transport anderer Mikronemenproteine (TgMIC1, TgM2AP).

Für die Mikronemenproteine EtMIC4 und EmTSP250 wurde die Funktion bisher nicht genauer untersucht. Es wurde bisher nur gezeigt, dass EtMIC4 einen hochmolekularen Komplex mit dem Protein EtMIC5 eingeht (Periz et. al., 2007), einem homologen Protein zu TgMIC4, das an die Wirtszelloberfläche bindet.

Tabelle 1.1: Ausgewählte Mikronemenproteine von *T. gondii*, ihre Funktion, homologe Proteine bei anderen Apikomplexa und die Bildung von Proteinkomplexen (modifiziert nach Dowse and Soldati (2004)).

Name	Komplexbildung	Homologe	Funktion
TgMIC1	MIC4-MIC1-MIC6	EtMIC3	Transport und Faltung von TgMIC4 und TgMIC6, binden der Wirtszelle
TgMIC2	M2AP (Hexamer)	EtMIC1, NcMIC2, PfTRAP	Transport von TgM2AP, binden der Wirtszelle, Fortbewegung
TgMIC3	MIC3-MIC8 Dimerisierung von MIC3	-----	binden der Wirtszellen
TgMIC4	MIC4-MIC1-MIC6	EtMIC5	binden der Wirtszellen
TgMIC6	MIC4-MIC1-MIC6	-----	Begleiter von TgMIC1 und TgMIC4
TgMIC8	MIC3-MIC8	-----	Begleiter von TgMIC3
TgMIC12	-----	EtMIC4, EbMIC4, EmTSP250	?
TgM2AP	MIC2 (Hexamer)	EtMIC2, NcM2AP	Transport und Faltung von TgMIC2
TgAMA1	?	EtAMA1, PfAMA1	Wirtszellinvasion

1.5 Invasion der Wirtszelle

Für obligat intrazelluläre Protozoen sind die Suche nach einer geeigneten Wirtszelle und die Invasion überlebenswichtige Prozesse. Unabhängig von Zellanhängen wie Zilien oder Flagellen ist es den invasiven Formen der Apikomplexa über ungewöhnliche, substratabhängige Bewegungen möglich, sich fortzubewegen, durch biologische Barrieren zu migrieren, in Wirtszellen einzudringen und wieder auszutreten. Die dreiphasige Invasion, beginnt mit der typischen, als „gliding motility“ titulierten Fortbewegung während der ersten Phase. Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass sich die Gleitbewegung bei *T. gondii* aus drei Bewegungsformen zusammensetzt (Hakansson et. al., 1999):

- kreisförmigem Gleiten gegen den Uhrzeigersinn
- aufgerichtetem Herumwirbeln („twirling“)
- helikalem Rotieren

Auch bei *E. bovis* konnten diese Bewegungen beobachtet werden (pers. Mittlg von C. Hermosilla). In dieser Phase sucht der Parasit nach einer geeigneten Wirtszelle und stellt einen Kontakt zwischen dem apikalen Pol und der Wirtszelloberfläche her. Die Bewegung ist vor allem durch die Translokation von Mikronemenproteinen angetrieben, die am apikalen Pol sezerniert werden. Dort werden sie Bestandteil eines Motorkomplexes, des Glideosoms (siehe Kapitel 1.6) und stellen die Verbindung zwischen der Wirtszelloberfläche und dem intrazellulären Motor dar. Durch den posterioren Transport der Mikronemenproteine wird die Vorwärtsbewegung des Parasiten erzeugt. Sind die Mikronemenproteine am distalen Ende des Parasiten angekommen, werden die Transmembranproteine proteolytisch gespalten und so vom Motorkomplex getrennt (Opitz and Soldati, 2002; Opitz et. al., 2002).

Ist eine geeignete Wirtszelle, für die Besiedlung gefunden, beginnt der Parasit mit der Invasion. Untersucht bei *T. gondii*, ist dieser Prozess innerhalb kürzester Zeit abgeschlossen (ca. 30 s) (Opitz and Soldati, 2002) und startet mit der Herstellung eines festen Kontaktes zwischen dem apikalen Pol des Parasiten und der Plasmamembran der Wirtszelle. Gleichzeitig werden sogenannte „moving junctions“ (MJ) gebildet, die als Ring den Parasiten umgeben und an der Fortwärtsbewegung des Parasiten in die Wirtszelle beteiligt sind (Michel et. al., 1980; Lebrun et. al., 2005). „Gliding motility“ und MJ benutzen den gleichen Motorkomplex, woraus man schließen kann, dass die Mikronemenproteine auch an den MJ beteiligt sind. Bei *T. gondii* wurde gezeigt, dass für die Bildung der MJ ein Komplex aus Mikronemenprotein und Rhoptrienproteinen gebildet wird, der an der Invasion beteiligt ist (Alexander et. al., 2005). Während der Bildung der parasitophoren Vakuole, dem dritten Schritt der Invasion, gleiten die MJ nach posterior und der Parasit wird nach vorn in die sich bildende Vakuole geschoben. Nun werden weitere Rhoptrienproteine sezerniert, die u. a. in die Membran der PV integriert werden (Saffer et. al., 1992; Carruthers and Sibley, 1997). Auch wenn die PVM ursprünglich von der Plasmamembran der Wirtszelle abstammt, sind viele Parameter verändert. So sind bei *T. gondii* z. B. viele Oberflächenantigene der Wirtszelle nicht mehr nachweisbar, was höchstwahrscheinlich auf eine aktive Eliminierung zurückzuführen ist. Auch ist die Anordnung der Lipide verändert, wodurch wohl die Diffusion von Wirtszell-Membranproteinen in die PVM verhindert werden soll (Dubremetz and Schwartzman, 1993).

Sind der Parasit vollständig eingedrungen und die PVM geschlossen, sezernieren die Dichte Granula ihren Inhalt in die PV, wo die Moleküle unterschiedlichste Funktionen übernehmen. So sollen die Proteine der Dichte Granula in der PVM am Stoffaustausch zwischen Wirtszelle und Parasit beteiligt sein (Sinai et. al., 1997)

1.6 „Das Glideosom“ – Der Motor der Fortbewegung

Die Fortbewegung der invasiven Stadien von Apikomplexa wird über ein einzigartiges System bewerkstelligt, dass hochkomplexe Interaktion diverser Moleküle voraussetzt. Aus den Ergebnissen der Untersuchungen bei *T. gondii* und *Plasmodium* spp. ließ sich ein Modell über den Aufbau des Glideosoms und dessen Funktionsweise erstellen (Abb. 1.4). Das Glideosom ist ein Komplex aus Makromolekülen, dessen Herzstück der Aktomyosinmotor ist. Fixiert zwischen zwei Verankerungen, treibt er die Fortbewegung an. Untersuchungen zum Nachweis des filamentösen Aktins (F-Aktin) zeigten, dass die Polymerisation des Aktins in den invasiven Stadien ein hochdynamischer und -regulierter Prozess ist, der von einem kontinuierlichen Umbau von Mikrofilamenten gesteuert wird (Kappe et. al., 2004). Das am Aktomyosinkomplex beteiligte Myosin A (MyoA) gehört zur unkonventionellen Myosin-Klasse XIV, die bisher nur bei Apikomplexa identifiziert und erstmals bei *T. gondii* (Heintzelman and Schwartzman, 1997) und *P. falciparum* beschrieben wurde (Pinder et. al., 1998). Bei *T. gondii* ist MyoA ca. 93 kDa groß und zeigt die typische Unterteilung einer schweren Myosinkette in Kopf- und Schwanzdomäne, folgt aber nicht der TEDS-Regel (Heintzelman and Schwartzman, 1997), die die Phosphorylierung der schweren Kette des Myosins als Regulationsmechanismus beschreibt (Bement and Mooseker, 1995). Eine Bindung von leichten Ketten an die schwere Myosinkette ist höchstwahrscheinlich nicht möglich, da die von konventionellen Myosinen bekannte Halsdomäne, definiert durch das Vorhandensein von IQ-Motiven, nicht erkennbar war (Heintzelman and Schwartzman, 1997). Damit stellt sich die Frage der Regulation von MyoA, da dies bei anderen Myosinen durch die leichten Ketten erreicht wird (Mooseker and Cheney, 1995; Sellers et. al., 1996). Die Kopfdomäne weist eine hohe Übereinstimmung zu konventionellen Myosinen bezüglich der ATP-, Aktin-Bindedomänen und anderen hochkonservierten Domänen auf. Wie in Abb. 1.4 erkennbar, ist MyoA über seine Schwanzdomäne mit einem Proteinkomplex an die äußere Membran des inneren Membrankomplexes (IMC) gebunden. Yeast-Two-Hybrid-Untersuchungen an Sporozoiten von *Plasmodium* sp. identifizierten ein Protein (MTIP: MyoA-IMC Schwanzdomäne-Interaktionsprotein), das mit der Schwanzdomäne von MyoA und der IMC interagiert (Bergman et. al., 2003). Bei *T. gondii* wurde das Pendant – das periphere IMC-Protein TgMLC1 identifiziert (Herm-Gotz et. al., 2002). Zwei weitere Proteine des Ankerkomplexes vervollständigen das Modell bei *T. gondii*: TgGAP45, ein integrales Membranprotein im IMC und TgGAP50, ein Protein, das das MyoA offensichtlich am IMC verankert (Gaskins et. al., 2004). Die Homologe dieser Proteine wurden auch bei *P. falciparum*-Merozoiten identifiziert (Jones et. al., 2006). Die zweite Verankerung wird durch verschiedene Mikronemenproteine, die mit Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche interagieren, erreicht. Als Mittler zwischen dem intrazellulären Motorkomplex und der

extrazellulären Matrix wurde ein Mitglied der TRAP-Proteinfamilie identifiziert. Bei *Plasmodium sp.*-Sporozoiten ist es das Protein TRAP, bei *Plasmodium sp.*-Ookineten das Protein CTRP (circumsporozoite-TRAP-Protein) und bei *T. gondii* wurde entsprechend TgMIC2 identifiziert (Menard, 2001; Kappe et. al., 2004). Alle Proteine zeigen eine Aneinanderreihung von extrazellulären, adhäsiven Domänen: (1) A-Domänen und (2) TSP-1 Wiederholungen (Menard, 2001) sowie einer sauren zytoplasmatischen Domäne mit einem subterminalen Tryptophan. Verschiedene Mutationsexperimente am zytoplasmatischen Teil mit und ohne Austausch von Tryptophan gegen Alanin resultierten in nicht-invasiven Sporozoiten (Kappe et. al., 1999). Der zytoplasmatische Teil dieser Proteine interagiert mit einem tetrameren Aldolasekomplex, der an F-Aktin bindet und somit das fehlende Bindeglied zwischen dem Aktinomyosinkomplexes und der äußeren Verankerung darstellt (Jewett and Sibley, 2003).

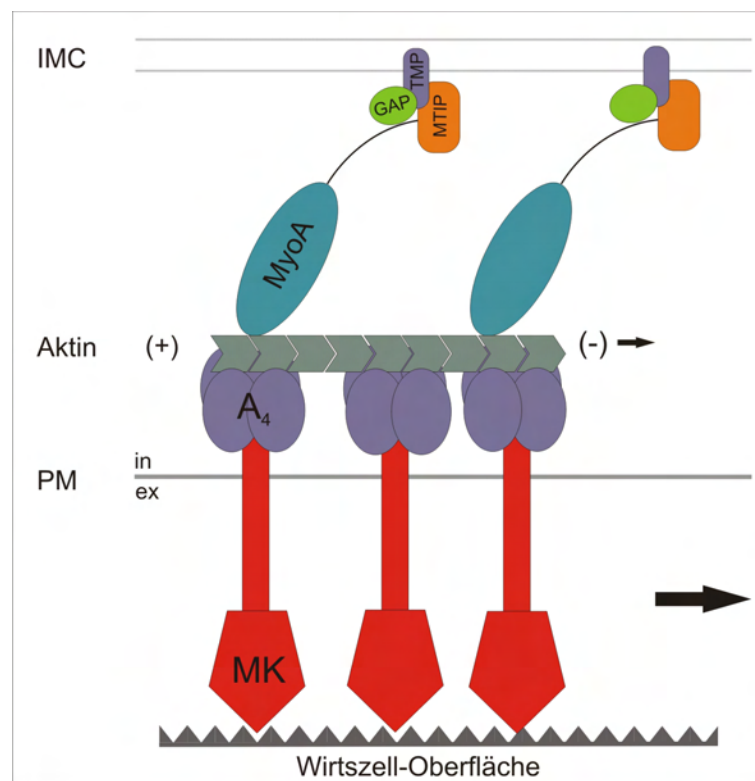


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Aufbaus des Glideosoms in den invasiven Stadien der Apikomplexa [modifiziert nach Kappe et. al. (2004), Jones et. al. (2006)].

Anordnung der Komponenten des Motorkomplexes. Dabei wird MyosinA durch einen Proteinkomplex (GAP, MTIP und TMP), der an den MyoA-Schwanz bindet, mit der äußeren Membran des IMC verbunden und immobilisiert. Der nach außen zeigende Myosinkopf interagiert mit dem filamentösen Aktin. Das F-Aktin interagiert mit einem tetrameren Aldolase-Komplex, der fest mit bestimmten Mikronemenproteinen verbunden ist, die mit der Wirtszelloberfläche interagieren und so den zweiten Anker bilden. [IMC – Innerer Membrankomplex, PM– Plasmamembran, M – Mikronemenprotein-Komplex (TRAP-Proteine), A₄ – Aldolase-Tetramer, MyoA – Myosin A, GAP – MyoA-Bindeprotein, MTIP – MyoA-Schwanzdomäne-Interaktionsprotein, TMP – Transmembranprotein in der äußeren Membran der IMC]

1.7 Einfluss der Apikomplexa auf ihre Wirtszelle

Die Wirtszelle während seiner Entwicklung zu manipulieren, ist höchstwahrscheinlich ein wichtiger Punkt, um als obligat intrazellulär lebenden Parasit erfolgreich zu sein. Als Parasiten profitieren sie von der Wirtszelle, entziehen Nährstoffe und nutzen die Zelle als Vermehrungsort. Um dies abzusichern, entwickelten sie eine Vielzahl von Organellen, Prozessen oder Signalwegen, die eine Umstrukturierung der Wirtszelle erzwingen. Beispielsweise ist *T. gondii* für bestimmte Stoffe auxotroph (Tryptophan, Arginin, Polyamine, Purine, Cholesterol), weshalb er diese aus seiner Umgebung - der Wirtszelle - aufnehmen muss. Für kleine lösliche Metaboliten (13-19 kDa) wie Glucose, Aminosäuren, Nukleotide oder Eisen ist die PVM dementsprechend mittels Poren durchlässig, so dass eine Diffusion ermöglicht wird (Laliberte and Carruthers, 2008). Für größere oder unlösliche Metaboliten werden Trägerproteine benötigt, die mittels aktiven Transports die Stoffe über die PVM transportieren. Diese Trägerproteine stammen bei *T. gondii* aus den Rhoptrien und den Dichte Granula und sind nicht nur in vielen Prozessen der Nährstoffrekrutierung involviert, sondern interagieren auch mit Mitochondrien und ER oder strukturieren das Zytoskelett des Wirtes neu (Martin et. al., 2007; Laliberte and Carruthers, 2008). Mittels TgROP2 rekrutiert der Parasit Wirtsmitochondrien in die Nähe der PV (Sinai and Joiner, 2001). Neben der Positionierung der Rhoptrienproteine an der PVM, ist ein weiterer Manipulationsort der Wirtszellkern. Dort kommt es zu einer Modulation von Signalwegen der Wirtszelle, die unter anderem in einer verminderten Immunreaktivität der Wirtszelle resultiert (Laliberte and Carruthers, 2008). Auch greift der Parasit aktiv in die Apoptosefähigkeit seiner Wirtszelle ein, indem er den Proteinspiegel von aktiver Kaspase 8 mittels proteolytischem Verdau oder Degradierung nach unten reguliert, wodurch der apoptotische TNFR/Fas-Rezeptorweg ausgeschaltet wird (Vutova et. al., 2007). Auch der intrazelluläre Apoptoseweg, der vor allem durch Stress oder Verletzung der Zelle ausgelöst und durch die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol aktiviert wird, zeigt nur eine geringe Aktivität (Keller et. al., 2006). Weiterhin induziert *T. gondii* die Expression anti-apoptotischer Moleküle wie Bcl2, die zu einer Degradierung von pro-apoptotischen Faktoren wie Bax und Bad führen (Molestina et. al., 2003; Laliberte and Carruthers, 2008). Außer bei *T. gondii* wurden auch bei anderen Parasiten wie *T. parva* (Heussler et. al., 2002; Dessauge et. al., 2005), *T. cruzi* (Nakajima-Shimada et. al., 2000) *Leishmania* sp. (Aga et. al., 2002), *C. parvum* (Chen et. al., 2001) sowie *Plasmodium* sp. die Interaktion mit der Wirtszellapoptose beschrieben. Untersuchungen an *P. berghei* zeigen, dass trotz Behandlung mit Apoptose-Induktoren keine Apoptose in den befallenden Hepatozyten induziert werden konnte (van de Sand et. al., 2005). Es zeigte sich, dass der HGF („hepatocyte growth factor“)/MET-Signalweg eine wichtige Rolle der Inhibierung der Apoptose in den infizierten Wirtszellen spielt (Leiriao et.

al., 2005). Neben der Beeinflussung der Apoptose wurde das CS („circumsporozoite“)-Protein von *Plasmodium* sp. im Zytoplasma und in der PM der Wirtszelle nachgewiesen, ein Hinweis, dass parasitäre Proteine in die Wirtszelle abgegeben werden (Hamilton et. al., 1988). Mit der Blockierung des Kerntransportes von NFκB durch das CS-Protein, kommt es zu einer Runterregulation von NFκB kontrollierten Genen (Singh et. al., 2007), womit der Parasit seine Wirtszelle beeinflusst.

Untersuchungen zu Manipulationen ihrer Wirtszelle bei den Eimerien wurden bisher nur wenig durchgeführt. Untersuchungen an *E. tenella* und *E. necatrix* zeigten, dass sie in der Lage sind, die Wirtszelle zu manipulieren um sich so vor einer Apoptose zu schützen. So kam es zu einer erhöhten Expression von den Inhibitoren Bcl-xL, wodurch der mitochondrialen Weges der Apoptose gestört wird (del Cacho et. al., 2004). Auch zu *E. bovis* gibt es mittlerweile Daten, die sich mit der Immunmodulation und Apoptose beschäftigen. Die Immunmodulation dürfte von besonderer Bedeutung sein, da im Gegensatz zu den rasch proliferierenden Arten wie *T. gondii* die erste Merogonie wesentlich länger dauert (*in vivo* ca. 14-18 Tagen, s.o.). Vergleichende Untersuchungen an *T. gondii*- und *E. bovis*-infizierten bovinen Endothelzellen zeigten, dass unterschiedliche immunevasive Strategien vorzuliegen scheinen (Taubert et. al., 2006a). Die Transkription von Adhäsionsmolekülen in befallenden Endothelzellen *in vitro* ist bei *E. bovis* wesentlich schwächer ausgeprägt als bei *T. gondii* (Hermosilla et. al., 2006; Taubert et. al., 2006a; Taubert et. al., 2006b). Weiterhin zeigte sich, dass auch eine über TNFα-induzierte Hochregulation von Adhäsionsmolekülen in *E. bovis*-infizierten Endothelzellen gehemmt ist (Hermosilla et. al., 2006). Dies kann als eine aktive Manipulation der unspezifischen Immunabwehr der Wirtszellen gewertet werden, um eine vollständige Ausreifung der ersten Meronten zu gewährleisten. Unterschiede zu *T. gondii* zeigen auch Untersuchungen der Transkriptionsmuster von immunmodulierenden Genen von *in vitro*-infizierten Endothelzellen. Dabei wurden die mRNA-Level von CXC-Chemokinen wie GRO-α („growth-related oncogene protein α“), IL-8 und IP-10 („10 kDa interferon-inducible protein“), CC-Chemokinen MCP-1 („monocyte chemotactic protein“) und RANTES („regulation upon activation normal T cell expressed and secreted“) sowie GM-CSF („granulocyte-macrophage colony stimulating factor“), COX-2 („cyclooxygenase 2“) und iNOS untersucht. Im Gegensatz zu *T. gondii*, der sich als hochpotenter Induktor von allen untersuchten Chemokinen erwies, ist keine oder nur eine gering erhöhte Transkription bei *E. bovis*-infizierten Endothelzellen zu beobachten. Die Induktion von CXC-Chemokinen und COX-2 unterblieb bei *E. bovis* bzw. war nur gering (Taubert et. al., 2006c).

Erste Untersuchungen zur Apoptose zeigten, dass *E. bovis* auch den programmierten Zelltod seiner Wirtszelle unterbinden kann (Lang, 2008), ebenfalls eine wichtige Voraussetzung dafür, dass die Makromeronten voll ausreifen können.

Insgesamt zeigen die Daten erste Hinweise, dass *E. bovis* wie *T. gondii* und andere intrazelluläre Parasiten diverse Vorgänge in der Wirtszelle beeinflusst. Es wird aber auch erkennbar, dass aufgrund der unterschiedlichen Entwicklung eine andere Evasionsstrategie verfolgt wird als bei sich schnell entwickelnden Arten. Aufgrund dieser ersten Ergebnisse zu *E. bovis* und den Ergebnisse zu den anderen Apikomplexa wollten wir im Rahmen dieser Dissertation neben der Charakterisierung eines *E. bovis*-Mikronemenproteins in einem Proteomic-Ansatz erste Erkenntnisse über den Gesamtproteinstatus der Wirtszelle erhalten. Dafür wurden die Gesamtproteome von *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten Wirtszellen am 14. Tag p. i. miteinander verglichen.

1.8 Bearbeitete Fragestellungen

Wie alle Kokzidien dringt auch *E. bovis* aktiv in seine Wirtszellen ein, um sich in diesen weiter zu entwickeln. Während der Suche nach einer geeigneten Wirtszelle und der anschließenden Invasion werden eine Reihe von Molekülen aus den sekretorischen Organellen des Apikalkomplexes des Parasiten freigesetzt (Carruthers and Sibley, 1997; Dubremetz et. al., 1998). Vor allem die Mikronemenproteine spielen dabei eine sehr wichtige und entscheidende Rolle wie Studien bei *T. gondii* und *Plasmodium* spp. herausstellten (Tomley and Soldati, 2001). Um zu untersuchen, ob ähnliche Proteine an der Invasion von *E. bovis* zum Tragen kommen, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das erste Mikronemenprotein von *E. bovis* (EbMIC4) identifiziert und beschrieben. Namensgebend war der Umstand, dass die zuerst identifizierte Sequenz von EbMIC4 die höchste Homologie zur Sequenz von EtMIC4 besaß. Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Sequenz von EbMIC4 sequenziert, charakterisiert und homologe Proteine bei anderen Apikomplexa gesucht, wobei sich zeigte, dass bisher nur homologe Proteine bei zwei Hühnerkokzidien beschrieben wurden.

Als vermeintliches Protein der Invasion sollte es vermehrt in den invasiven Stadien nachgewiesen werden. Um dies zu untersuchen wurden die Transkriptionsprofile und die Proteinexpression in den einzelnen Entwicklungsstadien untersucht. Aus vorangegangenen Untersuchungen bei anderen Kokzidien war bekannt, dass die mRNA von verschiedenen Mikronemenproteinen, die in den Sporozoiten nachgewiesen wurden, schon früh in der Sporogonie gebildet wird (Ryan et. al., 2000). Aus diesem Grund sollten unsporulierte und sporulierte Oozysten, Sporozoiten sowie Merozoiten I im Verlauf der ersten Merogonie, die verhältnismäßig lange dauert, untersucht werden. Für die Untersuchungen der Proteinexpression sollten Antisera gegen EbMIC4 rekombinant hergestellt werden, die dann für die Analyse der Proteinexpression sowie in Behandlungsstudien mit unterschiedlichen Substanzen Anwendung finden sollten. Die Behandlung von invasiven Stadien mit

unterschiedlichen Substanzen zeigte eine distale Wanderung verschiedener Mikronemenproteine bei verschiedenen Apikomplexa (Carruthers and Sibley, 1999; Bumstead and Tomley, 2000)

Neben diesen Studien sollte versucht werden Moleküle, die mit dem zytoplasmatischen Teil von EbMIC4 interagieren, zu identifizieren. Dafür standen zwei methodische Ansätze zur Verfügung: 1) GST-Pulldown-Assay und 2) gezielte Hefe-Doppelhybrid-Experimente. Untersuchungen an *T. gondii* zeigten das der zytoplasmatische Teil von TgMIC2 mit der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase von *T. gondii* interagiert. Dieses Protein ist das Verbindungsglied zwischen TgMIC2 und dem Aktinomyosin-Motorkomplex des Parasiten (Jewett and Sibley, 2003). Der Nachweis einer Interaktion wäre ein erster Hinweis auf einen ähnlichen Ablauf der Fortbewegung des Parasiten, was aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades nicht überraschend wäre.

Als intrazellulärer Parasit nutzt *E. bovis* seine Wirtszelle nicht nur als Ort der Vermehrung. Studien an anderen Kokzidien zeigte, dass die Parasiten viele Vorgänge der Wirtszelle modulieren und beeinflussen können, damit eine reibungslose Entwicklung stattfinden kann. Eine Besonderheit bei *E. bovis* ist die lange Verweildauer während der ersten Merogonie in Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren des Ileums. Um erste Erkenntnisse über mögliche Modulationen der Wirtszelle zu erhalten sollten im zweiten Teil der Arbeit erste Proteomik-Studien durchgeführt werden, bei denen die Gesamtproteome von *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten Wirtszellen am Ende der ersten Merogonie miteinander verglichen werden sollten.

Kapitel 2: Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Standardpuffer

Laborchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen und hatten Analysequalität. Weitere Angaben finden sich bei den verwendeten Substanzen. Mehrfach verwendete, allgemeine Standardpuffer werden in der Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Allgemein verwendete Lösungen und Puffer.

Lösung	Zusammensetzung
Etbr-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O _{dd}
Etbr-Gebrauchslösung	0,5 µg/ml Ethidiumbromid
H ₂ O _{DEPC}	H ₂ O _{dd} mit 0,1% Diethylpyrocarbonat mindestens 1 h gerührt, anschließend autoklaviert
LB-Medium	25 g/l Luria Broth Base Medium (Invitrogen), autoklaviert
LB-Agar	1 l LB-Medium, 15 g Agar, autoklaviert,
MOPS-Puffer (10x)	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7,2
Phosphate buffered saline Puffer (10x, PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 6,5 mM NaHPO ₄ ·2H ₂ O, pH 7,4, autoklaviert
Probenpuffer (DNA, 10x)	60 mM EDTA, 30% (v/v) Glycerol, 0,5 ng/ml Bromphenolblau
Probenpuffer (RNA, 5x)	900 µl Formamid (deionisiert), 100 µl MOPS, 161 µl Formaldehyd, 20 µl Bromphenolblau (1% in H ₂ O _{DEPC}), 20 µl Xylencyanol (1% in H ₂ O _{DEPC}), 10 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl), 4°C, dunkel
Roti-Load, reduzierender Probenpuffer (Protein, 4x)	verbrauchsfertig von Roth
RNaseA-Stammlösung	10 mg/ml RNaseA in H ₂ O _{dd}
20% (w/v) SDS-Stammlösung	20 g SDS mit H ₂ O _{dd} ad 100 ml, üN gerührt, leicht erwärmt
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl, 0,3 M Na ₃ Citrat, pH 7,0, autoklaviert
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris, 50 mM EDTA, 0,5 Na-Acetat, pH 8,3 (mit Essigsäure)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

2.2 Kulturmedien

Die Zusammensetzung der Kulturmedien, die für mikrobiologische Arbeiten und für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen verwendet wurden, wird entweder im allgemeinen Teil (siehe 2.1) oder bei der Beschreibung der einzelnen Methoden aufgeführt. Medien, Lösungen und Wasser wurden, wenn nötig, in einem Varioklav Dampfsterilisator bei 121°C und einem Betriebsdruck von 1,0 bar für 45 min sterilisiert.

2.3 Antibiotika

Antibiotika wurden dem zuvor autoklavierten Nährmedium vor der Verwendung stets frisch zugesetzt.

Tabelle 3.2: Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Endkonzentration
Carbenicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml

2.4 Bakterien- und Hefenstämmen

Die verwendeten Stämme in ihrer Verwendung sind in den Tabellen 2.3 und 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme mit ihrem Einsatzgebiet.

Bakterienstamm	Genotyp	Verwendung
<i>E. coli</i> DH5α (TAKARA):	F ⁻ , ø80d/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	DNA-Klonierung
<i>E. coli</i> XL1blue (STRATAGENE)	<i>endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^q ΔM15Tn10 (Tet ^r)]	DNA-Klonierung Phagenscreen
<i>E. coli</i> BIOBlue (Bioline)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^q ΔM15 Tn10(Tet ^r)]	DNA-Klonierung
<i>E. coli</i> a-Select (Bioline)	F ⁻ <i>deoR endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>phoA supE44 thi-1</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 Φ80δ/ <i>lacZ</i> ΔM15	DNA-Klonierung
<i>E. coli</i> BL21 (Novagen)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysE (Cm ^R)	Proteinexpression
<i>E. coli</i> ER1647 (Novagen)	F ⁻ <i>thiA2</i> Δ(<i>lacZ</i>)r1 <i>supE44 recD1014 trp31 mcrA1272::</i> Tn10(TcR) <i>his-1 rpsL104</i> (strR) <i>xyfI mt2 metB1</i> Δ(<i>mcrCmrr</i>) 102:: Tn10(TcR) <i>hsdS</i> (rk12- mk12-)	Phagenscreen
<i>E. coli</i> BM25.8 (Novagen)	<i>supE44, thi</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36, proAB+</i> , <i>lacqZ</i> ΔM15] λimm434 (kanR)P1 (camR) <i>hsdR</i> (rk12- mk12-)	Phagenscreen

Tabelle 2.4: Verwendeter Hefestamm für gezielte Hefe-Doppelhybridexperimente.

Hefestamm	Genotyp	Verwendung
<i>S. cerevisiae</i> AH109 (Clontech)	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2</i> : : <i>GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3</i> , <i>GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2</i> , <i>URA3</i> : : <i>MEL1UAS-MEL1 TATA-lacZ</i>	Yeast-Two Hybrid

2.5 Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vektoren verwendet (Tab. 2.5), die auf Standardplasmiden basieren.

Tabelle 2.5: Verwendete Vektoren und ihre Einsatzgebiete.

Vektor	Firma	Verwendung
pDrive-Vektor	QIAGEN	Bakterien, DNA-Klonierung
pGEX-2T	GE Healthcare	Bakterien, Proteinexpression
pBridge	Clontech	Hefe, Yeast-Two Hybrid Screen
pAct2	Clontech	Hefe, Yeast-Two Hybrid Screen
λ -SREEN™	Novagen	Phagenbank, λ -Screen™

2.6 Verwendete Primer

In der folgenden Tabelle (Tab. 2.6) werden alle in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 2.6: Verwendete Primer.

Benennung	Sequenz (5' → 3')	T _M (°C)
Allgemeine Primer		
T7-Promotor-Primer / T7promPrimer	GTAATACGACTCACTATAG	43
T7prom-pDrive	TCTAATACGACTCACTATAGGG	54
SP6_Primer_pDrive	GCCATTTAGGTGACACTATAG	55
pGEX-Vektor-3end	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	76
pGEX-Vektor-5end	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	78
Phagenscreen		
MIC4_S1_f	GGTTCGTATACCTGCACTTG	57
MIC4_S1_r	GACCAAGCAGTCCACGAC	58
Mic4_S3_f	CTTGTGGCAAAGGTTATACGG	63
Mic4_S3_r	TTCTTCTCCATCTCGGCATC	64
Mic4_S4_f	AACGGAGACACGCGAATGC	69
Mic_S4_r	TTGCCTTCAAACTCGACTTGC	67
Mic4_S5_f	CATGTGACTCAAACCCATGC	62
Mic4_S5_rev	ACACTTCGACCAAGCAGTCC	64
PS-SondeMIC4-S6-for(5')	CAAGACATGCGAGGCATTCCG	69
PS-SondeMIC4-S6-rev(3')	GAGCGTGTTGACGCATTTGG	69
HSP70_S1_f	TGTCGGTGGTTCAACTCGTA	64
HSP70_S1_r	GCTGCTTGTTAGCCTCATCC	64
Identifizierung von EbMIC4 (GW)		
SpecPr01_rev	TTTGAGTCACATGGTCCAACGGTCTTC	73
SpecPr_nested01_rev	AACTGCCGTCAGTGTTCTTGACAGACAG	74

SpecPr01_for	ATGTCTCACCGTCAAAGGGAGAGGTTT	72
SpecPr_nested01_for	TGGAGTTTGAGGAGTGCTCTACCGAAG	72
SpecPr02_rev	CACTTCGCTCCTTGCAAGTCAATC	73
SpecPr_nested02_rev	CACGTTTCATATCCATCCATGCAAGAGC	73
SpecPr03_rev	CTGATAACCTGCTGCGCACTTACAGAC	71
SpecPr_nested03_rev	ATTGACGTCAGAGCAGCTTTTCTTGCT	71
GW_EbMIC4_SpecPr04_rev	GACAAGAGACGTCAGTGCCTAACCAAAG	71
GW_EbMIC4_SpecPr_nested04_rev	GACTTGCTATTGACGCAACCGAAAAGTA	71
GW_EbMIC4_SpecPr05_rev	ACCCACCATACGCCTAAACCGTAAACT	71
GW_EbMIC4_SpecPr_nested05_rev	CTGCCCCGGTGCCATTACAGTATTAAAG	71
GW_EbMIC4_SpecPr06_rev	CTGTGCACCTTCACTACCAAGTTCTCTC	72
GW_EbMIC4_SpecPr_nested06_rev	CCTGGTTTTGCAGACTCACCAGTAGGT	71
GW_3'terminal_for-out	CTGAGCTACCGAAAGGTCCTGGTGAAG	73
GW_3'terminal_for-nested	GCAGGAAGGGGACACTGTTATTGACAT	71
GW_EbMIC4_3Terminator_03_5end	AGGAACCTGGTAGTGAAGGTGCACAG	71
GW_EbMIC4-08rev	GCTTGCACTGCCAATTAACTAGTATCCTTCT	72
GW_EbMIC4-09rev	GGTAAGTCAGGTAAAGCTAGTGGCAAAAATGGA	73
GW_EbMIC4-10rev	CTGCCAATTAACTAGTATCCTTCTTCTTGAACC	72
GW_EbMIC4-11rev	CTGTAACTGCAAAGCGTATATTGCCGAAGAAGTAG	73
GW_EbAldolase_SpecPr01_outer_rev	ATCCGTAAGAAATTTGGCAATGGACT	71
gW_EbAldolase_SpecPr01_nested_rev	GGATATGCTCTAGCCCCCTTGCCACTT	71
GW_EbAldolase_SpecPr01_outer_for	CCCAGGAAATTGCCTTCTTTCACAGTAA	71
GW_EbAldolase_SpecPr01_nested_for	ATCCGCTCACAATTCCACACAACATAC	71
GW_EbAldolase_SpecPr02_outer_rev	CAGGAAATTGCCTTCTTTCACAGTAAGG	69
GW_EbAldolase_SpecPr02_nested_rev	ATGATTAGATTGACGCACCTTCTTGCT	71
GW_HSP70_01out_for	GAAAAGACCTTGCCGCTCTATCAATC	72
GW_HSP70_01nested_for	TACAGGCTGCTATTTTGAAGGGTGTGA	71
GW_HSP70_01out_rev	GCTCCCCCTCAAACACTTGAATCAATA	71
GW_HSP70_01nested_rev	TTTGAGATTCTTCGTGGGGATAGTGG	71
Sequenzierprimer		
MiddlePrimer_klonIII-2-1a1-f	GGGTTATGTGCAAAAACGTC	62
GW_EbMIC4_1Fr#5_m	GGGTTCTCGCACTCGT	60
GW_EbMIC4_1Fr#5_m2	CTTCTTGCTGGGTCGTCT	61
GW_EbMIC4_4Dr1_m	ACCGACGGATCTTACAGGTG	64
GW_EbAldolase_4Nr-9_middle	CTGCTCTGCACCTTACCACA	64
GW_2S#29_middle_SP6_for	TCATACGTGCGCACTCACA	64
GW_4V_58_middle2	CGCATGTGACCATTTTAGGT	62
GW_4V_58_middle3	GTCATCCACAAGCATTTTCC	62
GW_2W_23_middle1	GCTGCACTGTTTCTCCATGA	64
GW_EbAldo-Klon4-middlePr	GCGGCTGCAAAATCTAAAAG	63
PCR mit degenerierten Primer		
degPr_Aldolase01_for	TTCGAGGAGACYTCTTCCARAAG	63
degPr_Aldolase01_rev	GCATCCTCCTCRSWYTGRCCRC	65

RT-PCR		
OligoT(20)CT	TCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	55
OligoT(20)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	53
RT-PCR_01_5end	TGCAGCAACGATACTGGTCT	63
RT-PCR_01_out_3end	TCTGCAGTCAGGTTGCACTC	64
RT-PCR_01_nested_3end	AACTCGCATTGTGCCTTTCT	64
EbMIC4_RT-PCR01_5for	TCGAAGGACCTACTGGTGAG	62
EbMIC4_RT-PCR01_3rev	ACGAGAATACGCAGCATAGC	62
SpecPr02revcomp_for	GATTGACCACTGCAAGGAGACGAAGTG	73
SpecPr03revcomp_for	GTCTGTAAGTGCAGCAGGTTATCAG	71
GW_EbMIC4_SpecPr04revcom_for	CTTTGGTTAGGCACTGACGTCTCTTGTC	71
EbMIC4_RT-PCR_Verif_02_rev	CTTCGTCTCCTTGCACTG	60
EbMIC4_RT-PCR_Verif_03_rc_f	GCGCAGCAGGTTATCAG	61
EbMIC4_RT-PCR_Verif_03_rev	CTGATAACCTGCTGCGC	61
EbMIC4_RT-PCR_Verif_04_rc_f	GGCACTGACGTCTCTTGTC	61
EbMIC4_DegPr_RT-PCR01_5for	ATGCTGCAWCGCAACCCGCGG	80
EbMIC4_DegPr_RT-PCR02_5for	GGGCGCTTTGYGCRRCCTYGC	76
EbMIC4_5Ende_RT-PCRnest_3rev	AGACCAGTATCGTTGCTGCA	63
EbMIC4_5Ende_RT-PCRout_3rev	TTGCACTTCAACCCACGTCTCGCAC	76
EbMIC4_RT-PCR3'end_rev	TGCAATGAGTTTTAGACTATCTGC	61
EbMIC4_5Ende_RT-PCRout172_3rev:	AACTCGCATTGTGCCTTTCT	64
EbMIC4_5Ende_RT-PCRout68_3rev:	TGAACTTCAGGGCAGGAATC	64
Proteinexpression Ab-Herstellung		
FP_EbMIC4_(pGEX, <i>Bam</i> H I)	GGATCCATGGGAGGCGGCTATGCT	67
RP_EbMIC4_(pGEX, <i>Eco</i> R I)	GATTCCTGAATATCGCCACTATCTGC	60
RP_EbMIC4_(pGEX, <i>Hind</i> III)	AAGCTTCTGAATATCGCCACTATCTGC	61
FP_EbMIC4_(pGEX, <i>Hind</i> III)	AAGCTTATGGGAGGCGGCTATGCT	67
RP_EbMIC4_(pGEX, <i>Xho</i> I)	CTCGAGCTGAATATCGCCACTATCTGC	61
FP_EbMIC4_(pGEX, <i>Xho</i> I)	CTCGAGCTGAATATCGCCACTATCTGC	61
FP_EbMIC4_(pGEX, <i>Spe</i> I)	ACTAGTATGGGAGGCGGCTATGCT	67
RP_EbMIC4_(pGEX, <i>Spe</i> I)	ACTAGTCTGAATATCGCCACTATCTGC	61
RP_EbMIC4_(pGEX, <i>Nco</i> I)	CCATGGCTGAATATCGCCACTATCTGC	61
RP_EbMIC4_(pGEX, <i>Nco</i> I)	CCATGGATGGGAGGCGGCTATGCT	67
Yeast Two Hybrid		
HeScEbAldo_pBridge_for(5' <i>Bam</i> HI)	GGGATCCGTATGTCTGGTTATGGTGCAGAGTTACCGCAGGAAGTCG	80
HeScEbAldo_pBridge_rev(<i>Pst</i> I)	CTGCAGATAAATGTATTTCTTTTCAAAAAGAGAAGC	63
HeScEbMIC4_pACT2_for(5' <i>Bam</i> HI)	GGATCCGTATGGGAGGCGGCTATGCT	67
HeScEbMIC4_pACT2_rev(3' <i>Xho</i> I)	CTCGAGGCTGAATATCGCCACTATCTGC	65
HeScTgMIC2-pACT2for(<i>Eco</i> RI)	CGAATTCGAATGAGACTCCAACGCGAGGCCGTTTTTCGG	82
HeScTgMIC2-pACT2rev(<i>Xho</i> I)	CTCTCGAGCCTACTCCATCCACATCACTATCGTCATCCACGGGCAC	82
HeSCTgMIC2m-pACT2for(<i>Nco</i> I, <i>Eco</i> RI)	ATGGAATTCGCGCCCATGGGAAGGACT	70
HeSCTgMIC2m-pACT2rev(<i>Nco</i> I, <i>Xho</i> I)	CTCTCGAGAGTCCTTCCCATGGGCGCA	72
HeScTgAldo-pBridgefor(<i>Bam</i> HI)	GGGATCCCATGTCGGGATACGGTCTTCCATT	75

HeScTgAldo-pBridgerev(<i>Pst</i> I)	GCTGCAGGGTTAGTACACGTAGCGTTTCTCGAA	67
HeScTgMIC25'-pACT2for(<i>Sma</i> I)	GCCCCGGGGATGAGACTCCAACGCGAGGCCGTTTTCGG	82
HeScTgMIC23'm-pACT2for(<i>Sma</i> I)	GGCCCCGGGCGCCCATGGGAAGGACTTGC	73
Zellkultur		
MycoplasmenPr1	GGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	64
MycoplasmenPr2	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	70
Vimentin-Referenz (Proteomik)		
BtVimentin_for	AGGAGAGGAGAGCAGGATTTCT	63
BtVimentin_rev	GGTGTTGGTTCAAGAACTAGGG	63

2.7 Gewinnung des biologischen Untersuchungsmaterials

2.7.1 Versuchstiere

Zur Erhaltung des Stammes H von *E. bovis* (Feldisolat aus Norddeutschland, Fliege et. al., 1992) und zur Oozystengewinnung wurden regelmäßig Bullenkälber infiziert. Zwei Wochen alte, konventionell gezüchtete Kälber der Rasse Deutsche Holstein (Schwarzbunt) wurden bei ortsansässigen Tierhaltern gekauft und im institutseigenen Stall unter SPF-Bedingungen untergebracht, um akzidentielle Kokzidieninfektionen zu vermeiden. Anfänglich erfolgte die Fütterung der Kälber zweimal täglich mit Milchaustauscher (200 g/Mahlzeit, RCG, Münster). Im Alter von vier Wochen wurde zusätzlich pelletiertes Ergänzungsfutter (Raiffeisen Warenzentrale Rhein Main eG Werk, Wiesbaden) *ad libitum* zugefüttert. Außerdem standen Wasser und autoklaviertes Heu in ausreichender Menge zur Verfügung.

2.7.2 Maßnahmen vor Ankunft der Kälber in den institutseigenen Stallungen

Die Kälber wurden bereits auf dem landwirtschaftlichen Betrieb in Einzelboxen untergebracht, da sie aus Tierschutzgründen (Tierschutztransportverordnung §3, Absatz 2) erst im Alter von mindestens 14 Tagen transportieren werden durften. In der zweiten Lebenswoche wurden die Tiere prophylaktisch mit Toltrazuril (20 mg/kg Körpergewicht; Baycox®) gegen Eimerien und mit Halofuginon (1 mg/kg Körpergewicht; Halocur®) gegen Kryptosporidien per os behandelt.

2.7.3 Infektion der Versuchstiere

Im Alter von ca. sieben Wochen wurden die Kälber mit je 4×10^4 - 5×10^4 sporulierten und gereinigten *E. bovis*-Oozysten infiziert. Dafür wurde die entsprechende Oozystenmenge bei $400 \times g$ 10 min zentrifugiert. Danach wurden die Oozysten dreimal mit Leitungswasser gewaschen ($400 \times g$, 10 min), um das in der Suspension enthaltene Kaliumdichromat vollständig zu entfernen. Abschließend wurden die Oozysten in 80 ml Leitungswasser resuspendiert und den Kälbern per os appliziert. Ab dem 18. Tag p. i. (post infectum) wurde täglich die Oozystenkonzentration im Kot mit der MacMaster-Methode bestimmt.

2.7.4 Gewinnung der *E. bovis* Oozysten

Die Gewinnung unsporulierter *E. bovis*-Oozysten erfolgte nach der von Jackson (1964) beschriebenen Methode. Die Fäzes mit einem OPG-Wert ≥ 1.000 wurden gesammelt und aufgearbeitet. Dafür wurde der Kot zuerst durch Siebe unterschiedlicher Maschenweite

(300 µm, 150 µm, 80 µm) mit Leitungswasser gewaschen, um grobe Partikel aus der Suspension zu entfernen. Anschließend sedimentierten die Oozysten in der wässrigen Lösung für mindestens zwei Stunden. Nach dieser Zeit wurde der Überstand (dieser entsprach ca. ½ des Gesamtvolumens) verworfen. Das Sediment wurde dann mit einer gesättigten Zuckerlösung (Dichte von 1,3) mittels eines Aräometers auf eine Dichte von 1,15 eingestellt (ca. 1:1).

Für die Flotation wurde diese Kot-Zucker-Suspension in flache Plastikwannen verbracht, die waagrecht justiert waren und randvoll gefüllt wurden. Anschließend erfolgte das luftblasenfreie Aufschieben von Glasplatten, mit Hilfe derer die flotierten Oozysten abgenommen werden konnten. Nach jeweils zwei Stunden wurden die Glasplatten vorsichtig abgenommen und die Oozysten mit warmem Wasser abgespült und aufgefangen. Nach dem Umrühren der verbliebenen Suspension wurden die Flotation und die Oozystengewinnung bis zu 24-mal wiederholt, je nach Anzahl der gewonnenen Oozysten in den Stichproben. Die gesammelten Oozysten wurden zunächst bei 4°C gelagert.

Für die Sporulation der Oozysten wurden die Oozystensuspension zentrifugiert (400 x g, 10 min), die Oozysten in Wasser resuspendiert und dann 1:1 mit einer 4%-igen (w/v) Kaliumdichromatlösung gemischt. Diese Suspension wurde wiederum in flache Schalen in ca. 3 cm hoher Schicht gefüllt, damit eine ausreichende Sauerstoffstoffzufuhr gewährleistet werden konnte. Durch mehrmaliges, tägliches Einblasen von Luft mittels einer Pipette wurde die Belüftung der Suspension zusätzlich verbessert. Bei nach mikroskopischer Überprüfung ausreichender Sporulation wurden die Oozysten abermals pelletiert (400 x g, 10 min) und in 2%-iger (w/v) Kaliumdichromatlösung bis zur weiteren Verwendung in belüfteten 75 cm² Zellkulturflaschen bei 4°C aufbewahrt.

2.7.5 Gewinnung der *E. bovis*-Sporozoiten

Spezielle Lösungen:

4%ige Natriumhypochloritlösung (FLUKA)

Percollgradienten

Percoll-Stammlösung: 9 Teile Percoll und ein Teil 1,5 M NaCl

60%ige Percoll-Lösung: 6 Teile Percoll-Stammlösung und 4 Teile 0,15 M NaCl

50%ige Percoll-Lösung: 5 Teile Percoll-Stammlösung und 5 Teile 0,15 M NaCl

Inkubationsmedium: (steril filtriert)

2 mM L-Cystein, 20 mM Natriumhydrogencarbonat

Exzystiermedium:

0,4% (w/v) Trypsin 1:250 (SIGMA), 8% (v/v) Rindergalle (aus

(nach Hibbert and Hammond, 1968),
(steril filtriert)

dem örtlichen Schlachthof), in HBSS (Hank's balanced salt solution, GIBCO)

Für die Sporozoitengewinnung wurden die Oozysten zuerst aufgereinigt und anschließend exzystiert. Dies beinhaltet einen mehrstufigen Prozess, in dessen Verlauf Sporozoiten unter sterilen Bedingungen gewonnen werden können:

Durch die Behandlung einer Oozystensuspension mit Natriumhypochloritlösung wurden zunächst anhaftender Schmutz und andere grobe Bestandteile entfernt. Dazu wurde eine bestimmte Menge der gelagerten Oozystensuspension zentrifugiert (400 x *g*, 10 min) und die pelletierten Oozysten nach Resuspension in Natriumhypochloritlösung aufgenommen. Dieses Gemisch wurde dann im Eisbad ca. 20 min gerührt und anschließend zentrifugiert (200 x *g*, 5 min). Die im Überstand befindlichen Oozysten wurden abgenommen und 1:1 mit Wasser gemischt. Nach Pelletierung (400 x *g*, 10 min) wurde dieses Sediment in einer geringen Menge Wasser aufgenommen und auf den ersten Percollgradienten (60%) vorsichtig aufgeschichtet. Der Gradient wurde in einem Schwenkbecher-Rotor zentrifugiert (400 x *g*, 20 min), wodurch sich die Oozysten in spezifischen Bereichen des Dichtgradienten ansammelten. Dieser Bereich wurde vorsichtig entnommen, auf den zweiten Percollgradienten (50%) geschichtet und abermals zentrifugiert. Dadurch entstand eine deutliche Bande, die wiederum entnommen wurde. Mittels Zentrifugation (400 x *g*, 20 min) wurden die enthaltenen Oozysten sedimentiert.

Zur Exzystierung wurden die pelletierten Oozysten mit sterilem Inkubationsmedium versetzt und in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter CO₂-Atmosphäre (100%) bei 37°C 20 h inkubiert. Danach wurden die Oozysten sedimentiert (400 x *g*, 10 min), in vorgewärmten sterilen Exzystiermedium aufgenommen und abermals in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. In der Regel waren nach einer Inkubationszeit von 3-4 h 70-90% der Sporozoiten exzystiert. Eine längere Inkubation in Exzystiermedium wurde vermieden, da ansonsten eine Schädigung der Sporozoiten nicht ausgeschlossen war.

Nach abgeschlossener Exzystierung wurden die Sporozoiten dreimal in sterilem PBS gewaschen (400 x *g* für 15 min). Anschließend wurden die Sporozoiten in einem geringen Volumen PBS oder Zellkulturmedium aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.7.6 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Für *in vitro*-Experimente und für die Gewinnung der Merozoiten I standen mehrere bovine Zelllinien zu Verfügung, in denen sich *E. bovis* bis zum reifen ersten Meront erfolgreich entwickelt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in belüfteten, sterilen Zellkulturflaschen (ZKF) unterschiedlicher Größe oder auf Glasplättchen in 6-/12-Lochplatten. Für die BUVEC-Linien

mussten die Glasplättchen vorher mit Fibronectin beschichtet werden (10 ng/ml, 2 h, Raumtemperatur). Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag, ansonsten wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.7.6.1 Zelllinien

Spezielle Lösungen:

HBSS-Lösung	HBSS (1x Hank's balanced salt solution, GIBCO) mit 2% FKS, 1% PS, pH 7,4
H/H ⁺⁺ -Puffer (steril)	HBSS-Lösung, 6 g/l Hepes (Sigma), pH 7,4 mit NaOH
Kollagenase-Lösung (0,025%, steril)	0,025 g Kollagenase Typ II (Worthington Biochemical Corp.), 100 ml PSA-Puffer (Puck's saline A buffer, Gibco)
Medium 199 (Gibco)	
Pen-Strep-Stammlösung (PS)	Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (100x Konzentrat, PAA Laboratories GmbH)
FKS-Stammlösung (Biochrom)	Fötales Kälberserum Stammlösung portioniert bei -20°C gelagert
ECGM-Medium (Promocell)	ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) mit Supplement
Modifiziertes ECGM-Medium	150 ml ECGM mit Supplement, 350 ml Medium 199 mit 1% PS und 2% FKS, pH 7,3
Substituiertes IMDM-Medium	IMDM (Iscove's modified dulbecco's medium, GIBCO) mit 1% PS, 1% L-Glutamin, 10% FKS, pH 7,0

2.7.6.1.1 Bovine Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (BUVEC)

Für die Gewinnung der BUVEC-Primärzelllinien wurden Nabelschnüre von durch Sectio caesarea geborenen Kälbern verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Klinik für Geburtshilfe der Tierärztlichen Hochschule Hannover). Diese wurden in sterilem H/H⁺⁺-Puffer gekühlt gelagert und versendet.

Die Gewinnung der Endothelzellen aus der Umbilikalvene erfolgte nach der von Jaffe et. al. (1973) beschriebenen Methode. Unter sterilen Bedingungen wurde die Nabelschnur aus dem Transportgefäß entnommen und mit einer sterilen Mullkompressen abgetupft. Anschließend wurde die Umbilikalvene mittels Schere und Pinzette präpariert. Eine kurze Braunüle wurde in ein Ende der freigelegten Umbilikalvene eingeführt und befestigt. Nun erfolgte mit Hilfe einer Spritze, befestigt an der Braunüle, eine gründliche Spülung der Vene mit 20 ml H/H⁺⁺-Puffer. Anschließend wurde das noch freie Ende mit einer Klemme fest verschlossen. Um Endothelzellen aus dem Zellverband herauszulösen, wurde die Vene mit der sterilen Kollagenase-Lösung (0,025%, vorgewärmt auf 37°C) befüllt und 20 min bei 37°C und

5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde die Umbilikalvene leicht massiert und die Kollagenase-Lösung wurde in ein steriles, mit 1 ml FKS gefülltes 50 ml-Röhrchen unter Spülung mit 20 ml Medium 199 überführt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die so gewonnenen Zellen pelletiert (400 x g, 10 min), in 25 ml ECGM-Medium resuspendiert und für die Kultivierung in 75 cm³-ZKF überführt. Die Vermehrung der Endothelzellen erfolgte in ECGM-Medium bis zur Konfluenz. Danach wurden die Zellen entweder subkultiviert (2.7.5.3) oder kryokonserviert (2.7.5.4).

Die Kultivierung der BUVEC-Linien erfolgte je nach Fragestellung entweder in reinem ECGM-Medium oder in modifiziertem ECGM-Medium. Sollten die Zellen eine längere Zeit gehalten werden (mehr als 10 Tage), mussten sie in reinem ECGM-Medium kultiviert werden, da sich der Zellrasen ansonsten ablöste.

2.7.6.1.2 Bovine fetale Gastrointestinalzellen (BFGC)

Die Zelllinie aus bovinen fetalen Gastrointestinalen wurde ursprünglich aus dem Gastrointestinaltrakt 4-6 Monate alter Rinderfeten isoliert und immortalisiert (Hermosilla et. al., 2002). Sie wurde vor allem für die Gewinnung von *E. bovis* Merozoiten I verwendet, da sie sehr anspruchslos über einen langen Zeitraum kultivierbar ist.

Die Kultivierung der BFGC-Linie erfolgte mit substituiertem IMDM-Medium wie unter 2.7.5.1.1 beschrieben.

2.7.6.2 *In vitro*-Infektion

Die *in vitro*-Infektion erfolgte in Zellkulturflaschen mit nahezu konfluent gewachsenen Zellen. Je nach Fragestellung wurden 25 cm³ große ZKF mit 3x 10⁵-5x 10⁵ Sporozoiten, die 75 cm³ großen ZKF mit 5x 10⁵-1,5x 10⁶ Sporozoiten und Glasplättchen mit 2,5x 10³-5x 10⁴ Sporozoiten infiziert.

2.7.6.3 Subkultivierung der Zellen

Spezielle Lösungen:

Versenpuffer (steril)	137 mM NaCl, 2 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , 5,3 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
Gepufferte Trypsinlösung (pH 7,2, steril filtriert, portioniert bei -20°C)	137 mM NaCl, 5 mM KCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 5,5 mM Glukose, 0,8 mM Tris-Base, 2,5 g Trypsin 1:250 (SIGMA)
Trypsin-Versen-Puffer	1 Teil gepufferte Trypsin-Lösung, 4 Teile Versenpuffer

Um adhärenzte Zellen vom Boden der ZKF abzulösen, wurde der konfluente Zellverband mit Trypsin-Versen-Puffer auf der 37°C-Wärmeplatte inkubiert (4 ml für 25 cm³-ZKF, 12 ml für 75 cm³-ZKF). Durch leichtes Aufklopfen der ZKF wurde das Ablösen der Zellen beschleunigt und unterm Mikroskop kontrolliert. Nach spätestens 5-10 min wurde die Zellsuspension in 50 ml-Röhrchen überführt, in denen das gleiche Volumen des entsprechenden Zellkulturmediums vorgelegt war. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 480 x *g*) waren die Zellen pelletiert, der Überstand wurde verworfen, die Zellen in entsprechendem Zellkulturmedium resuspendiert und in der Regel in vier neue, mediumbefüllte ZKF überführt (1 ZKF → 4 ZKF). Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um evtl. noch vorhandenes Trypsin zu entfernen.

2.7.6.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen sowie von invasiven Stadien von *E. bovis*

Spezielle Lösungen:

Einfriermedium (steril)

Zelltypisches Kultivierungsmedium mit 10% DMSO

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie unter 2.7.5.3 beschrieben abgelöst und pelletiert. Dann wurden die Zellen mit eiskaltem Einfriermedium versetzt und in vorbereitete Kryoröhrchen (Nunc) überführt. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 4°C gekühlt und bei -80°C gelagert.

Merozoiten und Sporozoiten wurden je nach späterer Verwendung in unterschiedlichen Medien (Einfriermedium, PBS, Zellkulturmedium) bei -80°C gelagert. Dafür wurde vor der endgültigen Verdünnung die Parasitenzahl bestimmt. Anschließend wurden die Parasiten für 30 min bei 4°C gekühlt und bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Proben in einem Wasserbad bei 37°C schnellstmöglich aufgetaut, in mit Medium gefüllte 15 ml-Röhrchen (1 Teil Probe und 9 Teile Medium) überführt und gemischt. Danach wurden die Zellsuspension zentrifugiert (400 x *g*, 10 min), der Überstand abgenommen und das Zellpellet resuspendiert.

2.7.6.5 Bestimmung der Infektionsrate bei *E. bovis*-infizierten Wirtszellen

Für sämtliche weitere Analysen wie RT-PCR oder 2D-Analysen musste die Anzahl der infizierten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt werden. Dafür wurden am ersten oder zweiten Tag nach der Infektion der Wirtszellen mit dem Mikroskop Phasenkontrastbilder in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. Diese Bilder wurden dann mit dem Grafikprogramm Micrografx Picture Publisher 10 ausgewertet. Dafür wurden die Anzahl der

infizierten Zellen sowie die Gesamtzellzahl ermittelt und die Infektionsrate (siehe Formel) bestimmt.

$$\frac{\text{Anzahl der infizierten Zellen} \cdot 100\%}{\text{Gesamtzellzahl}} = \text{prozentualer Anteil der infizierten Zellen (\%)}$$

2.7.6.6 Gewinnung von Gesamtprotein aus *E. bovis*-infizierten Wirtszellen

Für die Gewinnung von Gesamtprotein für proteinchemischen Analysen wurden die kultivierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber in 10 ml PBS abgeschabt, in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und pelletiert (600 x *g*, 15 min). Das Proteinpellet wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.7 *In vitro*-Gewinnung der *E. bovis*-Merozoiten I

Die Zellkulturüberstände mit den enthaltenen Merozoiten I wurden in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen gesammelt und zentrifugiert (10 min, 600 x *g*). Anschließend wurden der Überstand verworfen und die im Pellet befindlichen Merozoiten resuspendiert. Da neben Merozoiten auch Verunreinigungen wie Zelldebris etc. enthalten waren, wurden die Merozoiten nachfolgend bei niedrigen *g*-Zahlen zentrifugiert. Dabei wurden größere/schwerere Anteile wie tote Zellen von den Merozoiten getrennt und somit die Merozoiten insgesamt aufgereinigt. Dafür wurden die Merozoiten in jeweils 20 ml PBS resuspendiert und 1 min bei 200 x *g* zentrifugiert. Die nun im Überstand befindlichen Merozoiten wurden gesammelt. Das Pellet wurde aufgeklopft, erneut mit 20 ml PBS aufgefüllt und abermals bei 200 x *g* 1 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt und die drei Überstände wurden vereinigt. Der so gesammelte Überstand wurde dann bei 600 x *g* 15 min zentrifugiert. Nun standen die im Pellet befindlichen Merozoiten für die weitere Verwendung zur Verfügung.

2.7.8 Gewinnung von Seren

Für die Serumgewinnung wurde das gewonnene Blut zur Gerinnung bei RT mindestens 4 h belassen. Zur weiteren Retraktion des Gerinnsels wurden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Serum durch Zentrifugation (3.000 x *g*, 5 min) abgetrennt und gesammelt. Gelagert wurde das aliquotierte Serum bei -20°C mit oder ohne Glycerol (1:1).

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.8.1.1 Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus *E. bovis*-Merozoiten

2.8.1.1.1 Isolierung mittels QIAamp® DNA Mini Kit für Gewebeproben (QIAGEN)

Für die Isolierung von gDNA aus *E. bovis* wurden Merozoiten I aus der Zellkultur, gelagert bei -80°C , verwendet. Dafür wurden pro Isolierung 5×10^8 – 1×10^9 Merozoiten I pelletiert ($3.500 \times g$, 3 min), in 540 μl ATL-Puffer plus 60 μl Proteinase K (20 mg/ml) aufgenommen und resuspendiert. Über die Inkubation bei 56°C für 5-16 h auf dem Wärmeinkubationschüttler erfolgte die Lyse der Parasiten. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 40 μl RNase A (10 mg/ml, 4 min, 37°C) zerstört. Nach Inkubation in 400 μl AL-Puffer (70°C , 10 min) und kurzer Zentrifugation (2 min, $8.000 \times g$) wurden 400 μl Ethanol (96%) hinzugegeben und die Probe gut gemischt. Die Säulchen wurden beladen, zentrifugiert ($6.000 \times g$, 1 min) und jeweils mit 500 μl AW1-Puffer und AW2-Puffer gewaschen ($20.000 \times g$, 1 min). Abschließend erfolgten eine Trockenzentrifugation ($20.000 \times g$, 1 min) und die Eluierung der genomischen DNA in 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$.

Die Konzentration der genomischen DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Im Agarosegel wurde nachfolgend die Integrität der genomischen DNA bestimmt.

2.8.1.1.2 Isolierung mittels Phenol-Choroform-Extraktion

Spezielle Lösungen:

Extraktionspuffer	20 mM Tris, pH 8,0, 100 mM EDTA
Proteinase K -Stammlösung	20 mg Proteinase K (Qiagen) in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Zuvor bei -80°C gelagerte Merozoiten (5×10^8) wurden in 475 μl Extraktionspuffer aufgenommen und 15 s auf Eis mittels eines Stabhomogenisator homogenisiert. 25 μl einer 20%igen SDS-Lösung und 20 μl Proteinase K Lösung (20 mg/ml) wurden zugefügt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurden 520 μl Phenol zu der Probe gegeben. Nach mehrmaligem Mischen und einer anschließenden Zentrifugation ($21.000 \times g$, 5 min) wurde die obere (wässrige) Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dann wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroformgemisch (1:1) dazugegeben, die Probe gemischt und zentrifugiert ($21.000 \times g$, 5 min). Der Überstand wurde abermals in ein neues Gefäß

überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt und zentrifugiert. Der Überstand der Chloroformbehandlung wurde in ein neues Gefäß überführt und unter Zugabe von ½ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Ethanol (100%, eiskalt) über Nacht bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die gDNA pelletiert (30 min, 21.000 x *g*, 4°C). Das Pellet wurde ein- bis zweimal mit 750 µl 70% Ethanol gewaschen und im Eppendorfgefäß luftgetrocknet. Abschließend wurde die so pelletierte DNA in 50-100 µl H₂O_{dd} (DNase frei) unter leichter Erwärmung (bis 50°C) gelöst.

Die Qualität und Quantität der erhaltenen genomischen DNA wurden spektrophotometrisch und über Analyse im Agarosegel bestimmt.

2.8.1.2 Isolierung und Behandlung von Total-RNA

2.8.1.2.1 Isolierung von Total-RNA aus *E. bovis* mittels Trizol® (Invitrogen)

Die Isolierung der Total-RNA aus verschiedenen Stadien von *E. bovis* erfolgte mit Trizol®. Dafür wurde eine definierte Menge an Parasiten (2,5 - 5x10⁸ Merozoiten I, 5x10⁷ Sporozoiten oder 2x10⁷ Oozysten) mit 1 ml Trizol® durch Pipettieren vermischt und kurz zentrifugiert (12.000 x *g*, 1 min, 4°C), um partikuläre Verunreinigungen zu pelletieren. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 1/5 Volumen Chloroform, das durch kräftiges Schütteln (15 s) mit der Probe gut vermischt wurde. Nach 3-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben 15 min zentrifugiert (4°C, 12.000 x *g*). Anschließend wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, mit gleichem Volumen Isopropanol (1:1, bezogen auf die wässrige Phase) 10 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (10 min, 12.000 x *g*, 4°C). Dadurch pelletierte die RNA und nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet einmal mit 75% Ethanol (mit DEPC-H₂O_{dd}) gewaschen und zentrifugiert (7.500 x *g*, 5 min, 4°C). Abschließend wurde das Pellet an der Luft getrocknet und die RNA in 30 µl RNase-freiem H₂O_{dd} aufgenommen. Konzentration und Reinheit der RNA-Präparation wurden mittels Agarosegelelektrophorese und/oder spektrophotometrisch bestimmt (siehe 2.8.1.4).

2.8.1.2.2 Isolierung von Total-RNA aus eukaryotischen Wirtszellen mittels RNeasy® Mini-Kit (QIAGEN)

Der Zellrasen wurde entweder sofort in 600 µl Lysispuffer (594 µl RTL-Puffer plus 6 µl Mercaptoethanol) lysiert oder zuerst mit Trypsin-Versen-Puffer abgelöst, pelletiert und dann im Lysispuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C zwischengelagert. Für die Weiterverarbeitung wurden das Lysat auf Eis aufgetaut und mit 600 µl 70% Ethanol schlierenfrei vermischt. Anschließend wurden die RNA-Säulchen mit der Suspension

beladen (2x 600 µl) und jeweils 30 s bei 9.500 x *g* zentrifugiert. Dann wurden die Säulchen mit 350 µl RW1-Puffer beladen und gewaschen (30 s, 9.500 x *g*). Die anschließende DNase I-Behandlung (RNase-Free DNase I Set, for use with RNeasy®/QIAamp® Columns, Qiagen) auf der Säule (10 µl DNase plus 70 µl RDD-Puffer) wurde nach Herstellerangaben für 15 min bei RT durchgeführt. Die Zugabe von 350 µl RW1-Puffer und anschließende Zentrifugation (9.500 x *g*, 30 s) beendeten den DNase I-Verdau. Anschließend wurden die Säulchen noch zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und nach dem letzten Waschschrift 3 min bei 9.500 x *g* zentrifugiert. Vor der Elution der RNA (in 35 µl H₂O_{dd}) wurden die Säulchen trocken zentrifugiert (9.500 x *g*, 30 s).

Die Konzentration wurde spektrophotometrisch ermittelt und die RNA anschließend bei -80°C gelagert.

2.8.1.2.3 RNA-Cleanup mit RNeasy® Micro-Kit (QIAGEN)

Die Reinigung der über Trizol® isolierten RNA aus unterschiedlichen *E. bovis* Stadien erfolgte mit dem RNeasy® Micro-Kit (QIAGEN). Dafür wurde die Probe mit RNase-freiem H₂O_{dd} auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 350 µl RTL-Puffer und 250 µl 100% Ethanol zugegeben und die Probe gut gemischt. Die Säulchen wurden beladen, zentrifugiert (15 s, 20.000 x *g*) und anschließend mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen (20.000 x *g*, 15 s). Um evtl. noch vorhandene DNA zu beseitigen, wurde ein Verdau mit DNase auf der Säule für 15 min bei RT durchgeführt (10 µl DNase I plus 70 µl RDD-Puffer, im Kit enthalten). Dann wurde die Säule mehrmals gewaschen und zwar 1x mit 350 µl RW1-Puffer, 1x mit 500 µl RPE-Puffer, 1x mit 500 µl 80% Ethanol. Zur Trocknung der Membran wurden die Säulchen zuerst 2 min (zur vollständigen Entfernung von Restflüssigkeit) und dann 5 min (mit geöffnetem Deckel) zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden 14 µl RNase-freies H₂O_{dd} auf die Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, 20.000 x *g*). Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte spektrophotometrisch. Gelagert wurde die RNA bei -80°C, nachdem sie vorher für 5 min auf 65°C erhitzt worden war.

2.8.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA (pDNA) aus Bakterien

2.8.1.3.1 Isolierung mit Miniprep Kit I Gold (PeqLab)

Für die Gewinnung reiner pDNA wurde das Miniprep Kit I Gold (PeqLab) verwendet. Dafür wurden die Plasmid-tragenden *E. coli*-Bakterien von 3-6 ml LB-Übernachtskultur mittels Zentrifugation (1 min, 10.000 x *g*) pelletiert. Die Isolierung der pDNA wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die so gewonnene pDNA wurde in 50 µl H₂O_{dd} oder

Elutionspuffer resuspendiert und nach spektrophotometrischer Messung bei -20°C aufbewahrt oder zur Sequenzierung weitergeleitet.

2.8.1.3.2 Isolierung über alkalischer Lyse

Spezielle Lösungen:

Lösung I	25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose
Lösung II	0,2 M NaOH, 1 % SDS
Lösung III	3 M Kaliumacetat, pH 4,8, eingestellt mit Eisessig

Für die Überprüfung der Klonierungen mittels Restriktionsverdau wurde die pDNA durch alkalische Lyse isoliert. Dafür wurden ebenfalls 3-6 ml einer Bakterien-Übernachtskultur verwendet. Die pelletierten Bakterien wurden zuerst in 100 µl Lösung I resuspendiert und anschließend mit 200 µl von Lösung II denaturiert. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte die Neutralisation mit 150 µl von Lösung III. Durch Zentrifugation (20.000 x *g*, 10 min) kam es zur Sedimentation hochmolekularer Zellbestandteile wie Proteine und gDNA. Die pDNA verblieb im Überstand, der gewonnen und mit 300 µl Isopropanol (Verhältnis 1,5:1) versetzt wurde. Die Fällung der pDNA erfolgte bei -20°C über 2-3 h. Anschließend wurde die so gewonnene pDNA pelletiert (20 min, 20.000 x *g*). Das pDNA-Pellet wurde zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in 30 µl H₂O_{dd} und 1 µl RNase A (40 µg/ml) resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.8.1.4 Spektrophotometrische Messung von DNA und RNA

Die Konzentration von RNA und DNA wurde mit einem Spektralphotometer durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Extinktion der Proben bei 280 nm wurde zudem herangezogen, um durch Berechnung eines Reinheitsfaktors (Quotient aus den Extinktionswerten bei 260 und 280 nm) den Grad der Verunreinigung mit Proteinen abschätzen zu können. Nur Lösungen mit einem Reinheitsfaktor $\geq 1,8$ wurden für weitere Experimente verwendet. Für die Berechnung wurde zugrunde gelegt, dass doppelsträngige DNA mit einer Konzentration von 50 µg/ml bei der Wellenlänge von 260 nm eine optische Dichte von 1,0 aufweist. Die Konzentration von RNA entspricht unter den angegebenen Bedingungen 40 µg/ml.

2.8.2 Herstellung einer genomischen DNA-Bank von *E. bovis*

Mit der einfachen Methode des „Genome Walking“ lassen sich unbekannte gDNA-Sequenzen, die an bekannte DNA-Sequenzen angrenzen, identifizieren (Siebert et. al.,

1995). Dazu wird ein Pool von ungeklonten, Adapter-ligierten genomischen DNA-Fragmenten benötigt. Für die Herstellung der Bank benötigt man gDNA von hoher Qualität. Diese gDNA wird über verschiedene Schritte enzymatisch verdaut und die resultierenden Fragmente werden mit flankierenden Adaptern bekannter Sequenz versehen, mit deren Hilfe spätere PCR-Analysen durchgeführt werden können. Zur Methode siehe Abbildung 2.1.

Für die Herstellung der Bank wurde die gDNA (siehe 2.8.1.1), in getrennten Ansätzen mit den Restriktionsendonukleasen *Dra* I, *Eco*R V, *Pvu* II und *Stu* I verdaut, wodurch Fragmente mit Enden ohne Überhang erzeugt wurden. Für jeden Restiktionsverdau (Abb. 2.1. A) wurden in einem Volumen von 100 µl 3 µg gDNA, 80 U Enzym, 10 µl entsprechender Reaktionspuffer (10x) über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Erfolg des Verdaus wurde visuell nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA (0,7% Agarosegel) und Färbung mit Ethidiumbromid kontrolliert. Die Aufreinigung der geschnittenen genomischen DNA-Fragmente erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Fällung mit Ammoniumacetat (siehe 2.8.1.1.2). Die so gewonnene gDNA wurde in 20 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) aufgenommen. An die geschnittene und gereinigte gDNA wurden im nächsten Schritt die Adapter ligiert (Abb. 2.1 B). Dazu wurden je Ansatz 4 µl der gDNA (150 ng/µl) mit 1,9 µl Adaptor (25 µM), 1,6 µl 10x Ligationspuffer und 0,5 µl T4 DNA Ligase (6 U/µl) gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Ligation wurde dann durch 5-minütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Abschließend wurde der Reaktionsansatz mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) auf ein Gesamtvolumen von 80 µl erhöht.

Die fertige Bank bestand nun aus vier Pools unterschiedlich geschnittener gDNA, inklusive ligierter Adapter mit bekannter Sequenz. Durch die unterschiedlichen Schnittmuster der Restriktionsenzyme kam es zu einer Überlappung der genomischen DNA-Fragmente, wodurch die Identifizierung großer Sequenzbereiche ermöglicht wurde. Dies erfolgte mit Hilfe eines konventionellen PCR-Ansatzes und einer sich anschließenden Nested PCR zur Erhöhung der Spezifität. Eingesetzt wurde das PCR Extender System (VHR). Für die PCR wurden Primerpaare verwendet, bei denen ein Primer an die flankierende Adaptersequenz bindet (AP, im Kit enthalten) und der andere Primer an die angrenzende, bekannte Sequenz (GSP, Abb. 2.1 C). Diese Primer mussten bestimmte Bedingungen erfüllen, wie beispielsweise eine Länge von 26-30 Nukleotiden, eine Annealingtemperatur von mindestens 67°C und einen GC-Gehalt von 40-60%. Für die erste PCR wurden die

„äußeren“ Primer (AP1 und GSP1) verwendet. In der nachfolgenden Nested PCR wurden dann die „inneren“ Primer (AP2 und GSP2) unter Verwendung der Amplifikate aus der ersten PCR als Template eingesetzt (siehe Abb. 2.1 C). Die PCR-Ansätze und die Bedingungen sind in den Tabellen 2.7 und 2.8 angegeben.

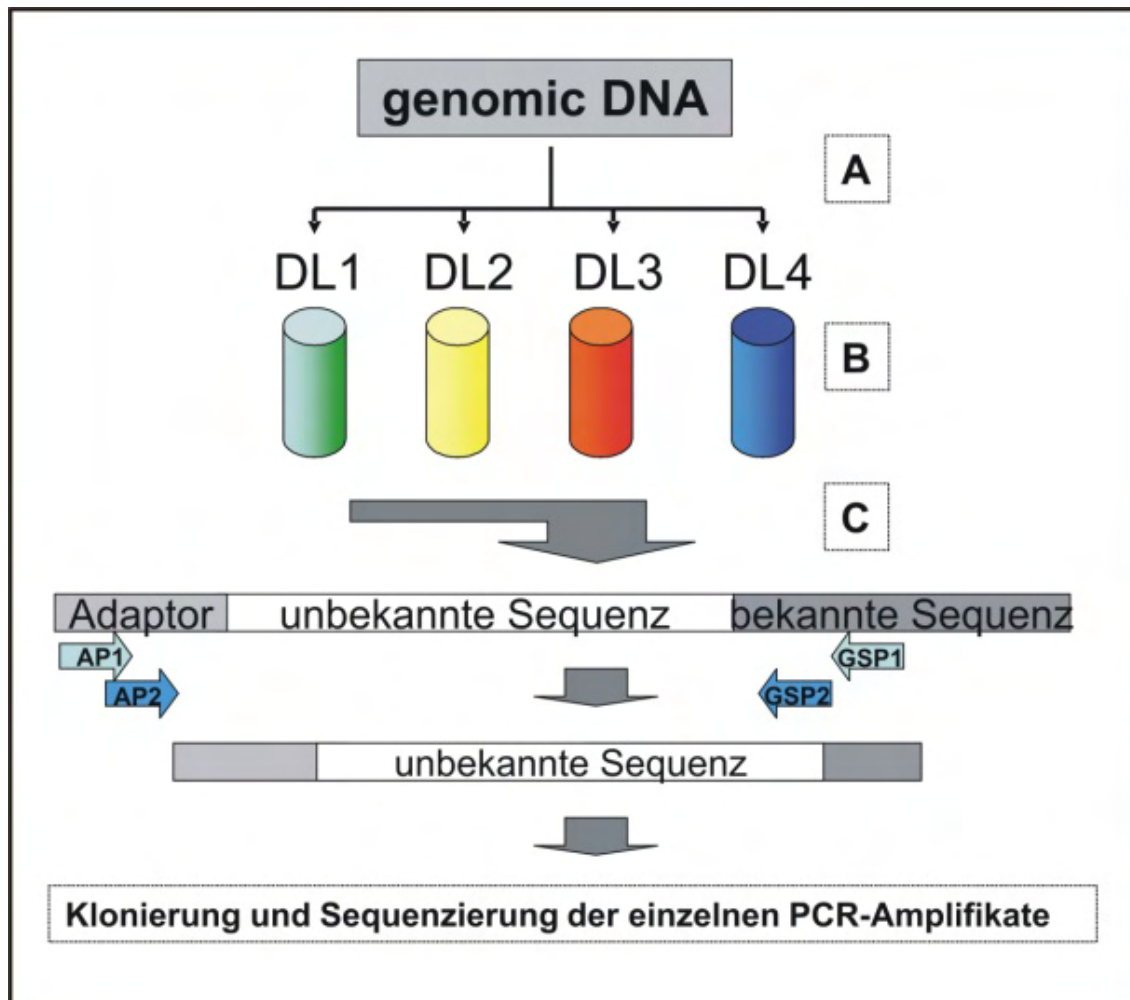


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Herstellung einer gDNA-Bank mit dem Universal Genome Walker Kit (modifiziert nach Clontech, BD GenomeWalker Universal Kit).

A-Restriktionsverdau der gDNA mit vier unterschiedlichen Restriktionsenzymen

B-Herstellung der Banken, DL1-4, die vier Pools mit unterschiedlich geschnittenen, Adapter-ligierten gDNA-Fragmenten repräsentieren.

C-Identifizierung unbekannter Sequenzen mittels konventioneller PCR unter Verwendung von Adapterprimern und Primern gegen bekannte Sequenzabschnitte.

Tabelle 2.7: Pipettierschema und Laufbedingungen der ersten (äußeren) PCR.

Komponenten	Volumen (µl)
DNA (DL1-4 Banken)	1 µl
AP1 (10 mM)	1 µl
GSP 1 (10 mM)	1 µl
dNTPs (jedes 10 mM)	1 µl
10x High fidelity Puffer	5 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{dd} ad 50 µl	40,5 µl

Laufbedingungen:

94°C – 25 sec → 72°C – 3 min → 94°C – 25 sec → 67°C – 3 min → 67°C – 7 min

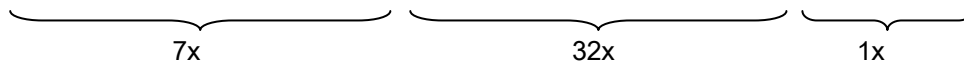
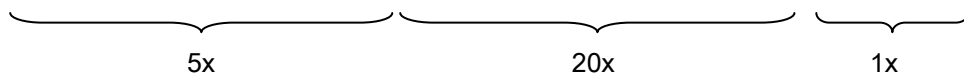


Tabelle 2.8: Pipettierschema und Laufbedingungen der zweiten (nested) PCR.

Komponenten	Volumen (µl)
DNA (DL1-4 → Produkt der ersten Amplifikation)	1 µl
AP2 (10 mM)	1 µl
GSP2 (10 mM)	1 µl
dNTPs (jedes 10 mM)	1 µl
10x High fidelity Puffer	5 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{dd} ad 50 µl	40,5 µl

Laufbedingungen:

94°C – 25 sec → 72°C – 3 min → 94°C – 25 sec → 67°C – 3 min → 67°C – 7 min



Die erhaltenen PCR-Amplifikate wurden aus dem Agarosegel eluiert (siehe 2.8.6), mittels pDrive Vektor Kit (QIAGEN) (siehe 2.8.9.1) ligiert, in kompetente Bakterien transformiert (siehe 2.8.11) und sequenziert (Agowa).

2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.8.3.1 Allgemeine Anmerkungen

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et. al., 1986; Saiki et. al., 1988) wurde unterschiedlichsten Fragestellungen nachgegangen. Die jeweiligen Bedingungen waren abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase, den Oligonukleotiden und der zu amplifizierenden Sequenz. Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt entweder 100 ng gDNA bei „single copy“-Fragmenten oder weniger (10 ng – 100 pg) bei „multi copy“-Fragmenten oder pDNA, 20 pmol sense und antisense Primer (SigmaGenosys), Enzympuffer in einfacher Konzentration, 2,5 U DNA-Polymerase, 200 µM je dNTP (Desoxyribonukleotid, PeqLab) und steriles H₂O_{dd}. Die Reaktion wurde in unterschiedlichen Thermocyclern mit beheizten oder unbeheizten Deckeln durchgeführt. Bei Verwendung der Thermocycler mit unbeheizten Deckeln wurden die Ansätze mit Mineralöl überschichtet.

Das PCR-Schema bestand allgemein aus folgenden Schritten: initiale Denaturierung, Denaturierung, Primeranlagerung (annealing) und Elongation. Die drei letztgenannten Schritte wurden in 30-40 Zyklen wiederholt, an die sich ein letzter Elongationsschritt von 5 min anschloß. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt. Die PCR wurde nach den in der Tabelle 2.9 wiedergegebenen Schemata durchgeführt.

Tabelle 2.9: PCR-Temperaturprotokoll.

Schritt	Kolonie-PCR mit FirePol (SolisBiodyne)	PCR mit PCR Extender System (VHR), (ehemals TripleMaster, Eppendorf)	Zyklen
1.	94°C – 3 min	94°C – 3 min	1x
2.	94°C – 30 s	94°C – 30 s	} 30-40x
3. Anlagerung	spezifische T(°C) – 30 s	spezifische T (°C) – 45 s	
4. Elongation	72°C – 1-5 min	72°C – 1-5 min	
5. Elongation	72°C – 5 min	72°C – 5 min	1x
6. Abkühlung	4°C – 5 min	4°C – 5 min	1x

Nach der PCR wurde die DNA jeder Probe gelelektrophoretisch kontrolliert (siehe 2.8.5.1). Die Amplifikate wurden so auf ihre korrekte Länge überprüft, wobei ein DNA-Molekularmassenstandard (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) als Referenz diente.

2.8.3.2 Testen von Bakterienklonen (Kolonie-PCR)

Mit Hilfe der Kolonie-PCR war das Testen vielen Bakterienklonen auf Insert-tragende Plasmide gleichzeitig möglich (Zon et. al., 1989). Dafür wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 25 µl angesetzt, in denen vektorspezifische oder/und insertspezifische Primer zur Anwendung kamen. Als Quelle dienten Bakterienzellen, die in 10 µl Wasser gelöst wurden. Die Zugabe der weiteren Komponenten der PCR erfolgte wie unter 2.8.3.1 angegeben.

2.8.3.3 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden mittels PCR

Die Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden für unterschiedliche Analysen (Southern Blot, Analyse der cDNA-Phagenbanken) erfolgte mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben. Dafür wurden PCRs (2.8.3.1) mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt, bei denen DIG-dUTP in das jeweilige Amplifikat eingebaut wurde. Als Kontrolle diente immer ein PCR-Ansatz ohne DIG-dUTP. Das entsprechend markierte Amplifikat wurde mit dem Cycle Pure Kit (PeqLab) nach Herstellerangaben aufgereinigt und photometrisch vermessen.

2.8.4 Reverse Transkriptase (RT⁻)-PCR

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA (Sambrook et. al., 1989) wurde mit der SuperScript™III Reverse Transkriptase (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Um kontaminierende gDNA zu entfernen, wurde vor jeder Synthese ein DNase I-Verdau (Fermentas) durchgeführt. Dazu wurden 3 µg Total-RNA mit 1 µl DNase I (1 µg/µl) und 2 µl 10x Reaktionspuffer gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Dieser Ansatz verblieb für 15 min bei RT, bevor die DNase I durch Hitzebehandlung (65°C, 10 min) inaktiviert wurde.

Aus diesem behandelten Ansatz wurden 1-1,5 µg RNA-Äquivalente in der RT⁻-Reaktion eingesetzt. Das verwendete RT⁻-PCR Protokoll ist in der Tabelle 2.10 aufgeführt. Die Reaktionsprodukte der Reaktion mit der Reversen Transkriptase wurden in einer sich anschließenden PCR (Tabelle 2.10) als Template eingesetzt. Die resultierenden Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese wie unter 2.8.5.1 beschrieben analysiert.

Tabelle 2.10: Protokoll zur RT'-PCR-Reaktion.

1. Teil der RT	Komponenten	Volumen
	20 pmol OligodT(20mer) oder 20 pmol von sequenzspezifischen Primern	1 µl
	dNTP Mix (10 mM je dNTP)	1 µl
	Total-RNA	1-1,5 µg
	H ₂ O _{dd}	ad 14 µl
65°C für 5 min, anschließend auf Eis für mindestens 1 min		
2. Teil der RT		
	5x Reaktionspuffer	4 µl
	0,1 M DTT	1 µl
	Superscript III RT (200 U/µl)	1 µl
50°C für 60 min bei OligodT(20mer) oder höher (bis 55°C) bei sequenzspezifischen Primern Beendigung der Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 70°C für 15 min		
PCR	PCR Extender System (VHR)	
	Template (cDNA)	5 µl
	spezifischer Primer forward (20 pmol)	1 µl
	spezifischer Primer reverse (20 pmol)	1 µl
	dNTP Mix (10 mM je dNTP)	1 µl
	High fidelity Puffer, 10x	5 µl
	TripleMaster Polymerase 5 U/µl	0,4 µl
	H ₂ O _{dd} (steril)	36,6 µl
PCR-Profil siehe Tabelle 2.9: PCR mit PCR Extender System (VHR)		

2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um Gemische von Nukleinsäuren präparativ oder analytisch auszuwerten, wurden sie mit Hilfe von Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt (Sambrook et. al., 1989).

2.8.5.1 Agarosegele zum Nachweis von DNA

Agarosegele wurden je nach Größe der zu untersuchenden DNA mit unterschiedlichem Agarosegehalt hergestellt: die entsprechende Menge Agarose wurde in einfachem TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, kurz abgekühlt und in eine Gelgießkassette überführt. Auftragetaschen wurden durch Einsetzen eines Kammes in die Gellösung erzeugt. Die DNA-Probe wurde mit einem Zehntel Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und auf einem Agarosegel neben einem Molekularmassenstandard (GeneRuler™

DNA Ladder Mix, Fermentas) aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Durchlicht analysiert.

2.8.5.2 Agarosegele zum Nachweis von RNA

RNA-Proben wurden mit Hilfe von denaturierenden Formaldehydgelen aufgetrennt und dokumentiert, um die Bildung von Sekundärstrukturen oder Aggregatbildung zu verhindern. Dafür wurden 110 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, 15 ml MOPS-Puffer (10x) und 1,8 g Agarose aufgeköcht und auf etwa 50°C abgekühlt. Kurz bevor das Gel gegossen wurde, wurden 25 ml Formaldehyd (37%) hinzugefügt. Die RNA-Proben wurden mit 2x RNA-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und aufgetrennt. Die Gele wurden nach erfolgter Auftrennung im UV-Durchlicht analysiert.

2.8.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden im UV-Durchlicht durch Umfahren mit einer Skapellklinge markiert und bei Normallicht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden in Eppendorfgefäße überführt, die DNA mit Hilfe eines Gelextraktionskits (PeqLab) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 40 µl DNase-freiem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ oder Elutionspuffer aufgenommen. Die Konzentration der so gewonnenen DNA wurde dann photometrisch gemessen.

2.8.7 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen

Für die Restriktionsspaltung der DNA standen unterschiedliche Restriktionsenzyme von Fermentas und NEB mit den entsprechenden Reaktionspuffern zur Verfügung.

2.8.7.1 Analytischer Verdau mit Restriktionsenzymen

Zur Kontrolle der Klonierung der DNA-Fragmente in die Plasmide wurde ein analytischer Verdau durchgeführt. In einem 20 µl-Ansatz wurden 10 µl Plasmid-DNA-Lösung mit 6 U Enzym, dem entsprechenden Reaktionspuffer sowie mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ zum Einstellen des Endvolumens versetzt und mindestens eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde mit Probenpuffer versetzt und durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.8.5.1) analysiert.

2.8.7.2 Präparativer Verdau mit Restriktionsenzymen

Ansätze zum präparativen Verdau von DNA wurden in einem Volumen von 50–100 µl durchgeführt und enthielten entsprechend größere Mengen an DNA (1-5 µg DNA) und Restriktionsenzymen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für mehrere Stunden oder über Nacht. Anschließend wurde die so verdaute DNA mit Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Die gesuchten Banden wurden extrahiert und eluiert, wie unter 2.8.5.1 und 2.8.6 beschrieben.

2.8.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal phosphatase, CIP) wurde pDNA am 5'-Ende dephosphoryliert, um die Religation der Vektoren zu verhindern (Ukai et. al., 2002). Hierzu wurden 10 µg pDNA mit 1 U CIP (Roche Diagnostics, Mannheim), 4 µl 10x Enzympuffer und H₂O_{dd.} in einem Gesamtvolumen von 40 µl bei 37°C 30 min inkubiert. Durch die sich anschließende zehnmünütige Inkubation bei 65°C wurde das Enzym inaktiviert. Die pDNA wurde mittels Elektrophorese analysiert und über Gelextraktion gereinigt (siehe 2.8.5.1 und 2.8.6).

2.8.9 Ligation

2.8.9.1 Ligation von PCR-Produkten mittels pDrive Vektor Kit (Qiagen)

DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen wurden über ihre A-Überhänge in den pDrive-Vektor von (Qiagen) integriert. Dafür wurden 4 µl von dem Eluat aus der Gelextraktion (siehe 2.8.6), 1 µl pDrive-Vektor und 5 µl vom zweifachen Reaktionspuffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte des Ligationsansatzes für die Transformation von Bakterien eingesetzt (siehe 2.8.11).

2.8.9.2 Ligation von Produkten aus dem Restriktionsverdau

Durch Restriktionsverdau vorbereitete PCR-Produkte oder aus Vektoren herausgeschnittene DNA-Fragmente wurden in Plasmide eingefügt, die mit den gleichen Enzymen geschnitten worden waren (Klonierung über kohäsive Enden) und diese mit Hilfe des Enzyms T4-Ligase geschlossen. Ein Ligationsansatz enthielt 50-100 µg Vektor-DNA, den drei- bis fünffachen Überschuss an Insert-DNA, 1x Enzympuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (Fermentas). Das Endvolumen wurde mit H₂O_{dd.} auf 20 µl eingestellt. Der gesamte Ligationsansatz wurde nach einer Inkubationszeit von 3 h bei RT oder nach Inkubation über Nacht bei 4°C zur

Transformation von Bakterien (siehe 2.8.11) verwendet. Berechnung der einzusetzenden Insertmenge (QIAGEN® PCR Cloning Handbook, 2001):

$$\frac{\text{Größe des Inserts (bp)} \times \text{Menge an eingesetztem Vektor (ng)}}{\text{Größe des Vektors (bp)}} = \text{einfache Insertmenge (ng)}$$

2.8.10 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

2.8.10.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen (Qiagen Protokoll)

Spezielle Lösungen:

TFB1 Puffer (steril filtriert)	100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl ₂ , 15% Glycerol, pH 5,8
TFB2 Puffer (steril filtriert)	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15% Glycerol, pH 6,8

Die verwendeten Bakterien lagerten als Suspension mit 30% (v/v) Glycerol bei -80°C. Von dem Glycerolbestand wurde eine Kultur (10 ml LB-Medium mit den selektiven Antibiotika) beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 100 ml vorgewärmtes LB-Medium mit den relevanten Antibiotika (ausgewählt nach den verwendeten Plasmiden mit ihren Antibiotikaresistenzen) wurden dann mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C, 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur auf Eis für 5 min heruntergekühlt, dann in sterile 250 ml „round-bottom“-Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 4.000 x g, 4°C für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet behutsam in 30 ml 4°C kaltem TFB1 Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf Eis 90 min gekühlt und abermals zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml 4°C-kaltem TFB2 Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 200 µl Aliquots in Eppendorfgefäßen portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die chemisch kompetent gemachten Zellen lagerten bei -80°C.

Die hergestellten Zellen wurden im Anschluss auf ihre Kompetenz und Qualität getestet.

2.8.10.2 Bestimmung der Transformationskompetenz

Durch eine Transformation (siehe 2.8.11) kompetenter Bakterien mit pDNA bekannter Konzentration wurde die Transformationskompetenz der Zellen bestimmt. Folgende DNA-Menge wurden transformiert: 100 pg, 10 pg und 1 pg und die transformierten Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen. Nach Übernachtinkubation der Agarplatten wurde die Anzahl gewachsener Bakterienkolonien gezählt. Eine Zahl von 100 Einzelkolonien bei 10 pg eingesetzter DNA-Menge entspricht einer Kompetenz von 10^7 Kolonien/ μ g pDNA.

2.8.10.3 Überprüfung der Qualität der kompetenten Bakterienzellen

Für die Überprüfung der Qualität wurden untransformierte, kompetente Bakterienzellen auf mit Antibiotika versetzten LB-Platten ausgestrichen. Untransformierte Bakterien sollten frei von Antibiotikaresistenz-tragenden Plasmiden sein und somit nicht auf diesen Platten wachsen.

2.8.11 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation wurde ein Aliquot der eingefrorenen kompetenten Bakterien (siehe 2.8.10) entweder mit einem halben Volumen des entsprechenden Ligationsansatzes (siehe 2.8.9) oder mit 1 μ g pDNA vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. In einem Thermocycler wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42°C 60 s ausgesetzt und dann sofort 3 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 600 μ l LB-Medium wurden die Zellen dann eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend bei 4500 x g 1 min sedimentiert, in 30 μ l Überstand resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die beimpfte Platte wurde im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung mittels Kolonie-PCR (siehe 2.8.3.2) oder analytischem Restriktionsverdau (siehe 2.8.7.1).

2.8.12 Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung

Oligonukleotide für die PCR wurden von der Firma SigmaGENOSYS nach Sequenzvorgaben synthetisiert. Die lyophilisierten Proben wurden entsprechend der vorgegebenen Angaben mit Wasser gelöst und auf eine Stammkonzentration von 100 μ M gebracht. Daraus wurden die entsprechenden Arbeitsverdünnungen von 10-20 pmol/ μ l hergestellt.

Für die Sequenzierungen wurde die pDNA mit dem Miniprep Kit I Gold von E.N.Z.A. (PEQLAB) aufgereinigt und von der Firma AGOWA nach Sanger (1977) sequenziert. Die

Auswertung der Sequenzen erfolgte mit diversen frei verfügbaren Programmen (NCBI, Blast-Analysen; SMS, ClustalW, etc).

2.8.13 Analyse vorhandener *E. bovis*-Merozoiten I-cDNA-Phagenbanken

Für die Identifizierung von DNA-Sequenzen zu *E. bovis*-Proteinen standen zwei cDNA-Phagenbanken zur Verfügung. Die erste wurde mit Hilfe der SMART™-Technologie hergestellt, die auf der cDNA-Synthese mittels Oligo-dT-Primern basiert („SMART™ PCR cDNA Library Construction Kit“, Clontech). Für die Herstellung der zweiten Bank wurden Hexamere verwendet, die entlang der mRNA binden. Verwendet wurden das „OrientExpress™“ cDNA-Kit und „λSCREEN™ Vector“ Kit (Novagen).

Die hergestellte cDNA wurde in Phagen verpackt und konnte mit Hilfe von DNA-Sonden untersucht werden.

2.8.13.1 Herstellung von kompetenten Bakterien für die Amplifikation der Phagen

Mit einer Einzelkolonie von kompetenten *E. coli* (Stamm ER1647 oder XL1blue) wurde eine Übernachtskultur (angezogen in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄, 0,2% Maltose, entsprechendes Antibiotikum) bis zu einer OD₆₀₀ = 1,0 kultiviert und bei 4°C bis zu 72 h gelagert.

2.8.13.2 Untersuchung der Phagenbanken auf positive Klone

Spezielle Lösungen:

Topagarose	LB-Medium , 10 mM MgSO ₄ , 0,6% Agarose
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5
2x SSC-Puffer	20x SSC-Stammlösung, 1:10 mit H ₂ O _{dd} verdünnt

Für die Untersuchung wurden ca. 10⁵ Phagenklone aus der Primärbank mit kompetenten Bakterien (siehe 2.8.13.1) gemischt und bei 37°C 15 min inkubiert. Dazu wurden mehrere Ansätze von 100 µl Bakterienkultur mit 100 µl der verwendeten Phagenbankverdünnung vermischt. Anschließend wurden die mit Phagen infizierten Bakterien in Topagarose (je Ansatz 6 ml) auf LB-Platten (12x12 cm) verbracht und bis zum Sichtbarwerden der Phagenplaques im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Platten bei 4°C mehrere Stunden gelagert, bevor Filterreplika hergestellt werden konnten. Dazu wurden je Platte zwei zugeschnittene Nitrocellulose-Membranen (10x10 cm, 0,45 µm, Schleicher und Schuell) auf dem Bakterienrasen gelegt (1. Membran: 1 min; 2. Membran: 2 min). Dann wurden die

Replika 1 min in Denaturierungslösung und anschließend für 1 min in Neutralisierungslösung verbracht. Vor dem Trocknen der Membranen wurden sie kurz in 2x SSC-Puffer gewaschen. Zum Fixieren der Nukleinsäuren auf der Membran wurden die Membranen 1 h bei 80°C erhitzt.

2.8.13.3 Hybridisierung der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde mit den Replika

Spezielle Lösungen:

Hybridisierungslösung	5x SSC-Puffer, 3,4 mM N-Lauroylsarkosin (Na-Salz), 0,02% SDS, 0,5% Blockierungslösung
Blockierungslösung	10 g Casein in 100 ml Maleinsäurepuffer
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit NaOH
Hybridisierungs-Waschpuffer I	2x SSC-Puffer, 0,1% SDS
Hybridisierungs-Waschpuffer II	0,4x SSC-Puffer, 0,1% SDS
Hybridisierungs-Waschpuffer III	0,2x SSC-Puffer, 0,1% SDS

Für den Nachweis membrangebundener DNA wurden Digoxigenin-markierte DNA-Sonden (siehe 2.8.3.3) verwendet. Die Membranen wurden zuerst mit 2x SSC-Puffer angefeuchtet und 30 min bei 50°C in der Hybridisierungslösung vorinkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde, die zuvor hitzedenaturiert werden musste (10 min, 100°C, anschließend Lagerung in flüssigem N₂). Nach dem Auftauen der Proben auf Eis wurde die Sonde mit Hybridisierungslösung verdünnt (40-60 ng/ml) und auf die Filter gegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über Nacht bei 50-55°C, je nach gewünschter Spezifität.

Um unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen, wurden die Membranen anschließend mehreren Waschschritten unterzogen. Die dabei verwendete Temperatur und die eingesetzten Waschpuffer bestimmten die Stringenz der Waschung: Zuerst wurden die Membranen 15 min in Hybridisierungs-Waschpuffer I bei RT gewaschen, dann 15 min mit vorgewärmtem Hybridisierungs-Waschpuffer II bei einer Temperatur von 50-55°C und abschließend zweimal je 15 min mit vorgewärmtem Hybridisierungs-Waschpuffer III bei einer Temperatur von 55-60°C (Sambrook et. al., 1989).

2.8.13.4 Nachweisreaktion

Spezielle Lösungen:

Blockierungslösung	10 g Casein in 100 ml Maleinsäurepuffer
Antikörperlösung	Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment, 1:10000 in Blockierungslösung

Maleinsäure-Waschpuffer	Maleinsäurepuffer, 0,3% Tween 20
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl
NBT/BCIP-Lösung (Roche)	200 µl in 10 ml Nachweispuffer

Der Nachweis der Digoxigenin-markierten Sonde erfolgte mit einem spezifisch gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP, Roche). Dafür wurden die Membranen kurz in Maleinsäurepuffer äquilibriert und dann in Blockierungslösung 30-60 min blockiert. Anschließend verblieb die Membran 60 min in der Antikörperlösung. Um ungebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen dreimal 15 min bei RT in Maleinsäurepuffer gewaschen.

Zur Visualisierung der Signale wurden die Membranen in Nachweispuffer für NBT/BCIP-Substrat (Roche) kurz äquilibriert. Anschließend erfolgte die Farbumsetzung von NBT/BCIP durch die am Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase, wodurch sich ein Farbniederschlag an entsprechender Stelle auf der Membran zeigte.

2.8.13.5 Isolierung positiver Klone

Spezielle Lösungen:

λ-Verdünnungspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgSO ₄ , 0,05% Gelatine
---------------------	--

Die positiven Plaques auf den Agarplatten wurden mit dem weiteren Ende einer Pasteurpipette ausgestochen und in 500 µl λ-Verdünnungspuffer + Chloroform (0,3%) überführt. Die enthaltenen Phagen wurden mittels einer zweiten Screeningrunde soweit vereinzelt, dass jedes positive Signal nur einer Phagenplaque zugeordnet werden konnte.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Fragment-tragenden Plasmide der Phagen mit Hilfe der „Cre loxP-Sites“ in Bakterien umklont. Dieses System ermöglicht ein automatisches Umklonieren der gesamten Plasmide *in vivo* (Palazzolo et. al., 1990). Dabei dienen die Fragment-flankierenden „loxP-sites“ als Angriffspunkte für die Bakteriophagen-P1-Cre-Rekombinase, die eine gerichtete Rekombination des Plasmids in die Bakterien während der Infektion vollzieht. Die positiven Bakterien konnten dann über Ampicillin-haltiges Medium selektioniert werden.

2.8.13.6 Cre *loxP*-vermitteltes Umklonieren von Plasmiden

Für die Umklonierung der Fragment-tragenden Plasmide aus den Phagen in Bakterien wurde der *E. coli* Stamm BM25.8 verwendet. Die Übernachtskultur, angezogen in LB-Medium mit

10 mM MgSO₄, 0,2% Maltose, 50 µg/ml Kanamycin und 34 µg/ml Chloramphenicol, wurde bis zu einer OD₆₀₀ = 1 kultiviert und bei 4°C gelagert.

Für die Absorption der Phagen wurden 100 µl der kompetenten Bakterienkultur mit 20-30 µl der Phagenverdünnung (Ausgangskultur der Phagen, siehe 2.8.13.4, gemischt im Verhältnis 1:50 oder 1:100 mit dem λ-Verdünnungspuffer) 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 5 und 100 µl auf vorbereitete LB-Agarplatten (mit Carbencillin oder Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Mit Hilfe des analytischen Restriktionsverdaus (siehe 2.8.7.1) wurden Plasmid-tragende Bakterienklone identifiziert, die pDNA isoliert (siehe 2.8.1.3.1) und in den Bakterienstamm E. coli XL1-blue transformiert (siehe 2.8.11). Die Inserts der isolierte pDNA aus dem Bakterienstamm E. coli XL1-blue wurde dann sequenziert (siehe 2.8.12) und ausgewertet.

2.8.14 Southern Blot und Hybridisierung von Nukleinsäuren

2.8.14.1 Nukleinsäuretransfer

Spezielle Lösungen:

Depurinierungslösung	0,25 M HCl
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	1 M Tris-HCl, pH 7-8, 1,5 M NaCl
SSPE-Puffer, 10x	2,98 M NaCl, 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , 0,02 M EDTA

Für den Southern Blot (Southern, 2006) wurde gDNA mittels Restriktionsenzymen spezifisch geschnitten (siehe 2.8.7.2) und die resultierenden Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (20 V, 16 h). Nach dem Färben mit Ethidiumbromid wurde das Gel unter Anlegen eines Lineals bei UV-Licht fotografiert, um später die Position und Größe der DNA-Banden dokumentieren zu können. Vor dem Transfer der DNA auf die PVDF-Membran musste die DNA behandelt werden. Dafür wurde das Agarosegel in mehreren Lösungen bei RT geschwenkt: 2x 15 min in Depurinierungslösung, dann 3x 15 min in Denaturierungslösung, anschließend 3x 30 min in Neutralisierungspuffer und zum Abschluss in 10x SSPE-Puffer (15 min). Der Transfer der DNA wurde in einer Vakuumkammer (TE80 Transvac, Hoefer) durchgeführt. Dafür wurde zuerst ein in 20 x SSC-getränktes Whatman-Filterpapier auf die Kammer positioniert, auf der die positiv geladene, aktivierte Nylonmembran (Hybond) zum Liegen kam. Darüber wurde die passende Gummimaske gelegt und dann das Gel, dessen Ränder und Geltaschen mit 1%iger Agarose abgedichtet wurden, aufgelegt. Nach dem kompletten Zusammenbau der Kammer wurde ein Unterdruck von 0,6 bar angelegt und der

obere Teil der Kammer mit 20x SSC Puffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte über 1 h. Nach dem Transfer wurden die Geltaschen und die Laufstrecken gekennzeichnet, die Membran getrocknet und die darauf befindliche DNA durch UV-Bestrahlung stabil an die Membran gebunden.

2.8.14.2 Hybridisierung der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Spezielle Lösungen:

Hybridisierungslösung	5x SSPE, 5x Denhardt's, 0,5 % SDS, 100 mg/ml Heringssperma-DNA
100x Denhardt's	2x SSC, 2% (w/v) BSA Albumin Fraktion V, 2% (w/v) Ficoll Typ 400 (Sigma), 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (Serva)
Waschpuffer 1	2x SSC, 0,1% SDS
Waschpuffer 2	0,2x SSC, 0,1% SDS

Die Bindung der Digoxigenin-markierten DNA-Sonden (siehe 2.8.3.3) erfolgte nach einem modifizierten Protokoll vom Kapitel 2.8.13.2. Die Membranen wurden zuerst mit 2x SSC-Puffer angefeuchtet und 1 h bei 50°C in der Hybridisierungslösung vorinkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der Sonde, wofür die Sonde zuvor hitzedenaturiert werden musste (10 min, 100°C, anschließend Lagerung in flüssigem N₂). Die aufgetaute Sonde wurde in der Hybridisierungslösung verdünnt (200 ng/ml) und auf die Membran gegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über Nacht bei 50°C.

Anschließend wurde ungebundene Sonde durch mehrere Waschschrte wie folgt entfernt: 2x 15 min bei RT mit Waschpuffer 1, 1x 15 min bei RT sowie 1x 15 min bei 40°C mit Waschpuffer 2.

2.8.14.3 Nachweisreaktion

Die Nachweisreaktion der Digoxigenin-markierten DNA-Sonden erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie im Kapitel 2.8.13.3 beschrieben. Der entsprechenden Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragment, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, Roche) wurde in einer Verdünnung von 1:2.500 eingesetzt.

2.8.15 Gezielte Hefe-Doppelhybridexperimente

Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-(YTH)-System ist es möglich die Interaktion zweier bekannter Proteine mittels gezielter Hefe-Doppelhybridexperimente zu untersuchen (Chien et. al., 1991). Das verwendete YTH-System basiert dabei auf den Eigenschaften des

Transkriptionsvektors GAL4 der Hefe (Fields and Song, 1989). Dieser Transkriptionsfaktor GAL4 besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne (GAL-DNA-BD) und einer Aktivierungsdomäne (GAL4-AD), wobei GAL4 die Transkription von Genen nur dann aktivieren kann, wenn beide Domänen miteinander wechselwirken (Ma and Ptashne, 1988). Beim YTH-System liegen diese beiden Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors getrennt vor und werden für die Konstruktion von Fusionsproteinen (Köder- und Beuteprotein) genutzt, indem die zu untersuchenden Proteine als Chimäre mit den Domänen verbunden werden. Wenn die zu untersuchenden Proteine miteinander interagieren, kommen Aktivierungs- und Bindedomänen von GAL4 in eine sogenannte räumliche Nähe, wodurch der Transkriptionsfaktor aktiviert und in den Kern geschleust wird, wo er an die DNA bindet. Bei dieser erfolgreichen Rekonstruktion ist der GAL4-Transkriptionsfaktor wirksam und bindet mit seiner Bindungsdomäne an eine spezifische Promotorsequenz, der GAL4 UAS (Upstream Activating Sequence) und an den Promotor. Die GAL4-Aktivierungsdomäne kann dann durch die Aktivierung der RNA Polymerase II die Transkription von Reportergenen initiieren.

Für die Untersuchung wurden Teilbereiche oder die vollständige kodierende DNA-Sequenz der vermeintlichen Interaktionspartner in die speziellen Hefektoren pBridge (Köderplasmid) und pACT2 (Beuteplasmid) hinter die Sequenz der GAL4-Aktivierungsdomäne bzw. GAL4-Bindedomäne transferiert. Dafür wurden die kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Proteine erst in pDrive-Vektoren mit angehängten Restriktionsschnittstellen kloniert. Anschließend wurde die kodierende DNA-Sequenz mit den spezifischen Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in die mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten Hefektoren in frame ligiert. Dann wurden die Hefektoren mittels Kotransformation in Hefen des Stammes *S. cerevisiae* AH109 transformiert und auf SD-Selektionsmedien ausgestrichen. Eine erfolgreiche Doppeltransformation lässt sich durch Selektion der transformierten Hefen auf Medien ohne Tryptophan und Leucin sicherstellen, da im Hefestamm AH 109 die Gene, die für die Synthese der Aminosäuren Tryptophan und Leucin notwendig sind, deletiert sind. Tryptophanauxotrophie wird durch das Köderplasmid, Leucinauxotrophie durch das Beuteplasmid ermöglicht. Anschließend kann die Interaktion der beiden Proteine untersucht werden. Ist eine Protein-Protein Wechselwirkung vorhanden, kann dies durch die Expression der ADE2- und HIS3-Reportergene phänotypisch nachgewiesen werden. Dazu werden die kotransformierten Hefen auf SD-Mangelplatten ohne Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin gestrichen. Die Reportergene ADE2 und HIS3, die sich auf dem Hefegenom befinden, werden durch einen aktiven GAL4-Transkriptionsfaktor transkribiert und die Produkte ermöglichen ein Wachstum der Hefezellen auf Adenin- und Histidin-freiem Selektionsmedium. Daneben werden auch die LacZ- und MEL1-Reportergene durch einen

aktiven GAL4-Transkriptionsfaktor transkribiert, deren Produkte, die Enzyme β - und α -Galactosidase, die substratspezifische Enzymreaktionen (β -Galaktose-Filterassay; quantitativer β -Galaktosidase-Assay und X- α -Gal Assay) ermöglichen.

2.8.15.1 Präparation der Hefen für die Transformation

Spezielle Lösungen:

YPD-Medium	20 g/l Difco-Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Agar (nur für Platten)
10x Lithiumacetat-Puffer	1 M Lithiumacetat (Sigma), pH 7,5 mit verdünnter Essigsäure, autoklavieren
10x TE Puffer	0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5, autoklavieren
TE-Lithiumacetat-Puffer	1x TE-Puffer, 1x Lithiumacetat-Puffer

Für die Transformation von Hefen über Lithiumacetat wurde ein entsprechendes Protokoll aus dem „Yeast Protocols Handbook“ (Clontech) eingesetzt. Zur Vorbereitung der Hefen wurden 30 ml einer 50 ml Übernachtskultur in 300 ml YPD-Medium verdünnt, wodurch eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 erreicht werden sollte. Diese Kultur wurde dann bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 bei 30°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Hefekultur für 5 min bei 1000 $\times g$ bei RT zentrifugiert, das Zellpellet in sterilem TE-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1,5 ml frisch hergestelltem, sterilem TE-Lithiumacetat-Puffer resuspendiert. Die Hefen waren nun kompetent für die Transformation.

2.8.15.2 Kotransformation der Hefen

Spezielle Lösungen:

PEG-Lösung	50% PEG 3350 (Polyethylenglycol)
PEG-Lithiumacetat Lösung	40% PEG-Lösung, 1x TE-Puffer, 1x Lithiumacetat-Puffer
TE-Lithiumacetat-Puffer	1x TE-Puffer, 1x Lithiumacetat-Puffer
40% (w/v) Glucoselösung	steril filtriert
SD-Medium/-platten (Minimalmedium)	6,7 g/l Yeast nitrogen base (ohne Aminosäuren), 20 g Agar (nur für Platten), 850 ml H ₂ O _{dd} , autoklaviert, nach dem Abkühlen auf 55°C Zugabe von 50 ml der 40% Glucoselösung (steril)
Aminosäure-Stammlösungen (10x; Merck, Sigma) als Zugabe zu dem SD-Medium/-platten	L-Adenin (Hemisulfatsalz) 200 mg/l, L-Arginin (HCl) 200 mg/l, L-Histidin (HCl Monohydrat) 200 mg/l, L-Isoleucin 300 mg/l, L-Leucin 1000 mg/l, L-Lysin (HCl) 300 mg/l, L-Methionin 200 mg/l, L-Phenylalanin 500 mg/l, L-Threonin 2000 mg/l, L-Tryptophan 200 mg/l, L-Tyrosin 300 mg/l, L-Uracil 200 mg/l,

L-Valin 1500 mg/l

SD-Leu/-Trp -Medium SD-Medium mit allen Aminosäuren außer Leucin/Tryptophan

SD-Leu/-Trp/-Arg/-His -Medium SD-Medium mit allen Aminosäuren außer Leu/Trp/Arg/His

Für die Kotransformation der Hefen wurden 0,1 mg Heringssperma-DNA als Träger, und jeweils 0,15 µg der zu transformierenden pDNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend wurden 100 µl der vorbereiteten kompetenten Hefen dazugegeben, durch Vortexen gut gemischt und mit 600 µl PEG-Lithiumacetat-Lösung versetzt. Dieser Ansatz wurde auf höchster Stufe 10 s mittels Vortexen gemischt und dann 30 min bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) und Mischen wurde der Hitzeschock durchgeführt, über den die Aufnahme der DNA in die Zellen ermöglicht wird. Dazu wurde die Probe 15 min bei 42°C im Heizblock erhitzt und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Abschließend wurden der Ansatz zentrifugiert (RT, 5 s, 20.000 x *g*), das Pellet in 200 µl TE-Puffer resuspendiert und auf entsprechenden Hefe-Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden mehrere Tage bei 30°C inkubiert, bis die gewachsen Klone deutlich sichtbar waren.

2.9 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.9.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die Proteinexpression wurde das pGEX-2T-Expressionssystem (GE Healthcare) verwendet.

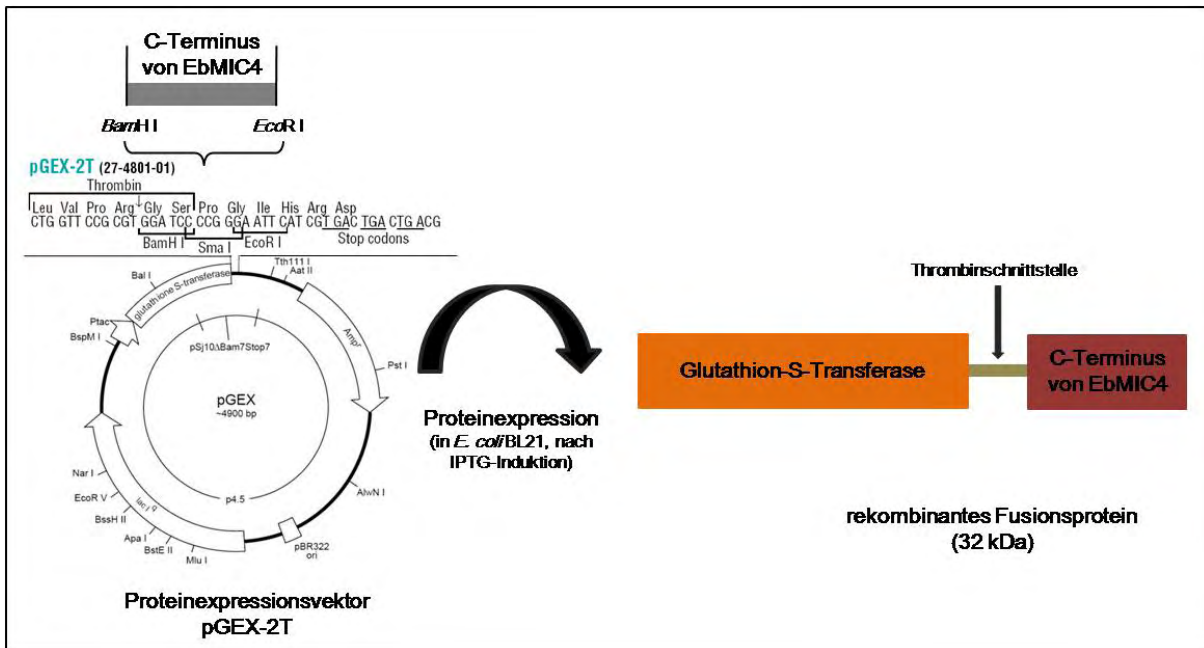


Abb. 2.2 Beispielhafte Darstellung der Proteinexpression vom GST-EbMIC4-Cterm-Protein.

Schematisch dargestellt ist der Expressionsvektor pGEX-2T mit der Positionierung der Sequenz für das rekombinant herzustellende Peptid EbMIC4-Cterm. Exprimiert wurde ein Fusionsprotein bestehend aus GST (26 kDa), einem kurzen Verbindungsstück mit einer Thrombinschnittstelle und dem Peptid EbMIC4-Cterm (6 kDa).

Von mit pGEX-2T-Plasmiden transformierten Bakterien des Stammes *E. coli* BL21 wurden zunächst Vorkulturen angelegt. Dafür wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in 5 ml LB-Medium (supplementiert mit Carbenicillin und Chloramphenicol) über Nacht im Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C inkubiert.

Die in Kultur genommenen Bakterien wurden dann mit einer Mini-Expressionsanalyse auf Expression des rekombinanten Proteins überprüft (siehe 2.9.2).

2.9.2 Mini-Expressionsanalyse

Spezielle Lösungen:

IPTG-Stammlösung 100 mM Isopropyl-Thio- β -D-Galaktopyranosid in H₂O, gelagert bei -20°C
 Roti®-Load 1-Probenpuffer (4x, reduzierend (Roth))

1 ml der Vorkultur wurde zu 30 ml frischem LB-Medium (supplementiert mit Carbenicillin und Chloramphenicol) gegeben und eine Stunde wie oben beschrieben behandelt. Der Rest der Vorkultur wurde bei 4°C aufbewahrt. Als Negativkontrolle wurden vor der Induktion der Proteinexpression 500 μ l entnommen und zentrifugiert (10.000 x *g* 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in 50 μ l zweifach konzentriertem, reduzierendem Roti-Load 1-Probenpuffer (Stammlösung: 4x konz., Roth) resuspendiert, bei 95°C 10 min denaturiert und anschließend bei -20°C gelagert.

Die Proteinexpression wurde mit 0,5 mM Isopropyl-Thio- β -D-Galaktopyranosid (IPTG) induziert. Im Abstand von einer Stunde wurden Aliquots wie oben beschrieben entnommen, behandelt und bei -20°C aufbewahrt. Die so gesammelten Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 2.9.7). Von der gelagerten Vorkultur wurde bei erfolgreicher Expression ein Glycerolbestand (Mischen von reinem Glycerol und Kultur im Verhältnis 1:1, Lagerung bei -80°C) angelegt.

2.9.3 Präparative Proteinexpression

Von einer Vorkultur (siehe 2.9.1) wurden 50 ml in 3 l vorgewärmtes LB-Medium überführt. Diese Bakterienkultur wurde dann solange bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0,6–0,8 erreicht war. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert, und die Inkubationstemperatur wurde auf 30°C gesenkt. Nach 5 h wurden die Proteinexpression gestoppt und die Bakterien sedimentiert (4°C, 4000 x *g*, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in PBS resuspendiert und nochmals gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde bei -80°C gelagert.

2.9.4 Reinigung rekombinanter Proteine

Spezielle Lösungen:

Thrombinstammlösung (1 U/ μ l, 500 Units in 500 μ l PBS (1x), portioniert bei -80°C gelagert
 Amersham Bioscience)
 PBS-Salzpuffer 0,75 M NaCl in PBS, pH 7,4
 Glycin-Puffer 0,05 M Glycin-HCl, pH 3

Neutralisierungspuffer	0,05 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,4
Acetatpuffer	0,05 M Acetat in H ₂ O, pH 4, 20% EtOH
Trichloressigsäure-Lösung	20% (w/v) TCA in H ₂ O
Glutathion-Elutionspuffer	0,154 g reduzierendes Glutathion gelöst in 50 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8

Die unter Verwendung der pGEX-2T-Plasmide exprimierten Proteine waren Fusionsproteine, die am Carboxyterminus eine Glutathion-S-Transferase (GST) aufwiesen. Zur Reinigung des rekombinant hergestellten Proteinabschnitts wurde die Bindung von GST an Glutathion Sepharose™ 4B (Amersham Bioscience) ausgenutzt. Damit konnte das GST-Fusionsprotein direkt unter milden, nicht-denaturierenden Bedingungen aus dem Bakterienlysat aufgereinigt werden.

2.9.4.1 Isolierung des GST-Fusionproteins über Glutathion Sepharose™ 4B

Zum Aufschluss der Bakterien wurde das bei -80°C gelagerte Pellet aufgetaut, in 20 ml PBS aufgenommen und mehrmals 10 s bei 4°C mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Bakterienlösung 10 min bei 12.000 x *g* zentrifugiert und der so gewonnene Überstand weiter verwendet. Zur Aktivierung der Glutathion Sepharose™ 4B wurde sie fünfmal mit 10-fachem Volumen PBS gewaschen und zentrifugiert (500 x *g*, 2 min). Zur Isolierung des GST-Fusionsproteins wurden 10 ml Bakterienüberstand auf jeweils 1 ml Glutathion Sepharose™ 4B gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Sepharosekügelchen durch Zentrifugation (2 min, 500 x *g*) von der Bakteriensuspension getrennt und durch dreimaliges Waschen mit je 10-fachem Volumen 4°C kaltem PBS von nicht-gebundenen Proteinen gereinigt (Zentrifugationsschritte: 2 min, 500 x *g*).

2.9.4.2 Spaltung des GST-Fusionproteins mit Thrombin

Für die Isolierung des rekombinant hergestellten Proteins musste das Fusionsprotein gespalten werden. Dabei verblieb die Glutathion-S-Transferase an den Sepharosekügelchen und konnte so pelletiert werden. Im Überstand befand sich das abgespaltene, rekombinant hergestellte Protein. Dafür wurde die Sepharose in einer Thrombinlösung resuspendiert (50 µl Thrombinstammlösung + 950 µl PBS pro 1 ml Sepharose) und 10 h bei RT leicht schwenkend inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (500 x *g*, 2 min) und der Überstand gewonnen (1. Eluat). Anschließend wurden die Sepharose noch zweimal mit je 3 ml PBS gewaschen und die Überstände aufbewahrt (2. und 3. Eluat). Von jeder Elutionsfraktion wurden 21 µl mit 7 µl vierfach konzentriertem reduzierenden Probenpuffer versetzt, bei 95°C

für 5 min denaturiert und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.9.7). Die restlichen Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.9.4.3 Reinigung der Eluate über Benzamidin-Säulchen (Amersham Biosciences)

Die so behandelten Eluate enthielten noch die Protease Thrombin, die in einem weiteren Schritt entfernt werden musste. Dazu wurden die Eluate über Benzamidin-Säulchen [HiTrap Benzamidine FF (high sub), Amersham Biosciences] aufgereinigt. Zunächst wurden die Säulchen aktiviert, indem sie zuerst mit 10 ml H₂O_{dd} und dann mit 5 ml PBS äquilibriert wurden. Anschließend wurden die zu reinigenden Eluate auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde in Aliquots zu je 1 ml aufgefangen. Dann wurde die Säule mit PBS-Salzpuffer gewaschen wobei der Durchfluss ebenfalls aufgefangen wurde. Mit 10 ml Glycin-Puffer (pH 3) wurde das Thrombin von der Säule eluiert, mit 10 ml Neutralisierungspuffer wurde die Säule neutralisiert und anschließend in Acetatpuffer bei 4°C aufbewahrt. Die photometrische Vermessung der unterschiedlichen Eluate bei einer Wellenlänge von 280 nm zeigte, dass das rekombinante Protein nur in den Eluaten der PBS-Salzpuffer-Behandlung zu finden war. Wegen der hohen Salzkonzentration und des großen Volumens dieser Eluate wurde eine Proteinfällung durchgeführt.

2.9.4.4 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Zur Proteinfällung wurden die Eluate 1:1 mit 20 % (w/v) Trichloressigsäure-Lösung versetzt, gemischt und bei 4°C 20 min inkubiert. Anschließend wurden die ausgefallenen Proteine pelletiert (4°C, 24.000 x g, 30 min), mit 80% Aceton gewaschen und nochmals 15 min bei 24.000 x g zentrifugiert. Nach Waschung mit 100% Aceton wurde das Pellet luftgetrocknet und PBS aufgenommen.

Wurde jedoch das komplette Fusionsprotein benötigt oder sollte die Sepharose wiederverwendet werden, wurden die sedimentierten Sepharosekügelchen mit Glutathion-Elutionspuffer versetzt (1 ml/ml Sepharose) und 10 min bei RT inkubiert. Nach Abtrennung der Sepharose (2 min, 500 x g) wurde der Überstand abgenommen, und die Sepharose zweimal mit PBS gewaschen. Die reaktivierte Sepharose wurde in PBS bei 4°C aufbewahrt.

2.9.5 Antikörperherstellung

Die Immunisierung der Kaninchen wurde von der Firma SeqLab, Göttingen durchgeführt. Im Rahmen der Antikörperherstellung gegen EbMIC4 wurden die Präseren von unterschiedlichen Tieren vorab im Immunoblot (siehe 2.9.9) getestet, da ein Kokzidienbefall der Tiere nicht ausgeschlossen werden konnte. Dabei reagierten alle Seren mit den

Antigenen von *E. bovis*-Merozoiten und Sporozoiten, ein Hinweis dafür, dass alle Kaninchen trotz SPF-Haltung mit Eimerien Kontakt hatten. Für die Immunisierung wurde das Kaninchen mit der geringsten Reaktion ausgewählt (K1). Weiterhin wurde noch ein zweites Kaninchen (K2) immunisiert, da das erste Kaninchen vor der finalen Blutentnahme verstarb. Bei diesem Tier konnten jedoch das Präserum vorab nicht getestet werden.

Für die Immunisierungen wurde einerseits denaturiertes, TCA-aufgereinigtes Protein und andererseits natives, nicht über die Benzamidinsäule gereinigtes Protein verwendet. Beide Lösungen hatten eine Konzentration von 6-10 µg/µl. Da das verwendete Antigen nur 6 kDa groß war, wurde es von der Firma SeqLab (Göttingen) an KLH (Keyhole Limpet-Hämocyanins, Hämocyanin aus der marinen Schnecke *Megathura crenulata*) gekoppelt. Nach erfolgter Immunisierung lagen die Immunsereen von zwei Tieren vor. Vom ersten Kaninchen (K1) war nur ein Antiserum vorhanden (benannt mit K1-1) und vom zweiten Kaninchen zwei Antisera, die 35 und 60 Tage nach der ersten Immunisierung gewonnen worden waren (benannt mit K2-1 und K2-final).

2.9.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Das Prinzip der Bradford-Methode (Bradford, 1976) beruht auf der Bildung eines Komplexes aus Coomassie Brilliant Blue G-250 und den hauptsächlich basischen Aminosäure-Resten von Proteinen (< 3 kDa) bei pH 0,1. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe fünffachen Protein Assay Reagent (Bio-Rad). Bei jeder Bestimmung wurde eine Eichgerade mit BSA als Mengenreferenz erstellt. Von den Proteinproben wurden mehrere Verdünnungen angesetzt und mit dem Protein Assay Reagent versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde die Farbreaktion makroskopisch überprüft und die Absorption bei 620 nm spektrophotometrisch gemessen.

2.9.7 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Spezielle Lösungen:

Trenngelpuffer (4x)	0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8
Sammelgelpuffer (4x)	1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8
Polyacrylamidlösung: Rotiphorese® Gel 30 (Roth)	30% Acrylamidlösung mit 0,8 Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1, gebrauchsfertig
10% Ammoniumpersulphat (APS)	10% (w/v) APS in H ₂ O, portioniert, bei -20°C gelagert
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amersham Bioscience, gebrauchsfertig
Isobutanol	mit Wasser gesättigt (Roth)
Elektrophoreselaufpuffer (10x)	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 34,7 mM SDS
Roti®-Load 1 - Probenpuffer (4x, reduzierend (Roth)	

Bench Mark™ Protein Ladder	Größenbereich: 10-220 kD
Molekulargewichtsmarker (Invitrogen)	Anzahl der Proteinbanden: 15
Roti®-Mark Prestained - vorgefärbter	Größenbereich: 17-245 kD
Protein-Molekulargewichtsmarker (Roth)	Anzahl der Proteinbanden: 7
Comassiefärbelösung	0,05% Serva Blue R-250, 10% Essigsäure, 50% Methanol
Entfärbelösung für Polyacrylamidgele	15% Methanol, 0,75% Essigsäure

Polyacrylamidgele zur Analyse von Proteinen wurden nach dem diskontinuierlichen System, wie von Laemmli (1970) beschrieben, verwendet. Es wurden Mini-Vertikalgele gegossen, die verschiedene Acrylamidkonzentrationen (7,5–12 %) im Trenngel enthielten. Die Gele hatten eine Dicke von 1 mm und bestanden aus einem Sammelgel (3,9% Acrylamid/Bisacrylamid) und dem Trenngel (Acrylamid/Bisacrylamid 7,5–12%, Tabelle 2.11). Vor dem Gießen der Gele wurden der Trenngellösung 70 µl 10% APS-Lösung und 15 µl TEMED zugesetzt. Die Polymerisation erfolgte unter einer dünnen Isobutanolschicht. Die Sammelgellösung bestand aus 0,65 ml Polyacrylamidlösung, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 3,05 ml H₂O_{dd}, 30 µl 10% APS und 15 µl TEMED und wurde nach gründlicher Entfernung des Isobutanols auf das polymerisierte Trenngel gegeben. Anschließend wurden sofort die Platzhalter für die Geltaschen eingesetzt.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung der Trenngele.

Lösungen (ml)	Acrylamid-Endkonzentration im Gel (%)					
	7,5	8	9	10	11	12
Polyacrylamidlösung	3,75	4	4,5	5	5,5	6
Trenngelpuffer	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
H ₂ O _{dd}	7,5	7,25	6,75	6,25	5,75	5,25

Nach erfolgter Polymerisation wurde die Gelapparatur zusammengebaut. Dann wurden die Proben, die mit reduzierendem Roti®-Load 1 - Probenpuffer versetzt für 10 min bei 95°C im Thermoblock denaturiert worden waren, aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben ins Sammelgel wurde eine Spannung von 70-80 Volt angelegt. Aufgetrennt wurden die Proteine mit einer konstanten Spannung von 120-130 Volt.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel entweder mit Coomassiefärbelösung 30 min gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung für Polyacrylamidgele entfärbt oder auf eine Membran transferiert (siehe 2.9.8).

2.9.8 Proteintransfer

Für immunologische Nachweismethoden wurden Proteine von SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Membran transferiert (sogenanntes Western Blotting). Transfermembranen bestanden aus Nitrozellulose (Protran BA 85, Porengrösse 0,45 µm, Firma Schleicher & Schuell). Je nach Aufgabenstellung wurde der Proteintransfer über kurze Zeit mittels Semidry-Verfahren (Jacobson and Karnas, 1990) oder über Nacht durch Tank-Blotting ausgeführt.

2.9.8.1 Semidry-Verfahren

Spezielle Lösungen:

Anodenpuffer I	300 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer	40 mM 6-Amino-n-Hexansäure, 20 % (v/v) Methanol, pH 7,6

Proteine mit einer Masse <150 kDa wurden mit einer Semidry-Blotting-Apparatur transferiert. Ein diskontinuierliches Puffersystem beinhaltete zwei in Anodenpuffer I getränkte Whatman-Filterpapiere, die direkt auf der Anodenplatte der Aparatur lagen. Anodenpuffer II wurde zur Durchfeuchtung eines weiteren Blattes Filterpapier und zum Äquilibrieren der Nitrozellulosemembran verwendet. Auf der Membran kam das kurz in Anodenlösung II gespülte Polyacrylamidgel zu liegen, das mit drei Blatt in Kathodenpuffer getränkte Filter überschichtet wurde. Die verwendeten, unterschiedlichen Puffer ermöglichten aufgrund ihrer Zusammensetzung einen effizienten Transfer größerer und kleinerer (<20 kDa) Proteine in der gleichen Zeit. Der Proteintransfer dauerte 60–90 min bei einer konstanten Stromstärke / (in mA), die sich nach der Gelfläche F (in cm²) richtete und wie folgt berechnet wurde:

$$I = F \times 0,8 \text{ mA.}$$

Die Spannung wurde auf maximal 24 V begrenzt, um Schäden an der Apparatur zu vermeiden.

2.9.8.2 Tank-Blotting

Spezielle Lösungen:

Transferpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,01 % (w/v) SDS
----------------	---

Der Transfer größerer Proteine (>150 kDa) erforderte eine längere Zeit und eine höhere Stromstärke, wofür das Semidry-Verfahrens nicht geeignet ist. Polyacrylamidgel und

Nitrozellulosemembran wurden mit je zwei Blatt in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapier umgeben und zwischen mit Puffer getränkte Schaumstoffkissen in eine Kassette gelegt, die dann in den Tank (Mini Protean II™, BioRad) eingesetzt wurde. Die Membran befand sich dabei auf der Anodenseite und das Gel auf der Kathode zugewandten Seite. Der Proteintransfer erfolgte über Nacht und wurde bei 4°C und einer konstanten Stromstärke von 250 mA durchgeführt.

2.9.8.3 Proteinfärbung und Dokumentation

Spezielle Lösungen:

Ponceau-Rot-Lösung 1% Essigsäure, 0,05% Ponceau S (Acros)

Zur Lokalisation der unterschiedlichen Proteine auf der Membran wurde diese 3 min mit Ponceau-Rot-Lösung gefärbt und in H₂O_{dd} soweit entfärbt, bis der Hintergrund fast weiß und die Proteinbanden noch gut erkennbar waren (Morcol and Subramanian, 1999). Die Markerbanden, Laufspuren sowie die Trenngelunterkante wurden auf der Membran mit Bleistift markiert. Getrocknete Transfermembranen konnten im Kühlschrank oder bei -20°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

2.9.9 Immunnachweis transferierter Proteine (Immun-Blot)

Spezielle Lösungen:

Blockierungslösung	Roti®-Block (Roth), 1x in H ₂ O
1. Antikörperlösung	Antikörper in Blockierungslösung
2. Antikörperlösung	Antikörper in Blockierungslösung/ PBS-T: 1:1
PBS-T	PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 (Aldrich)
Nachweispuffer	0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl
NBT/BCIP-Lösung (Roche)	200 µl in 10 ml Detektionspuffer
ECL Western Blotting	Zwei Komponenten, die 1:1 gemischt werden
Substrate (Pierce, USA)	

Zum immunologischen Nachweis der transferierten Proteine wurden die Membranen bei Raumtemperatur auf einem Vertikalschüttler in geschlossenen Schalen inkubiert und dem in der Tabelle 2.11 angegebenen Prozess unterzogen.

Tabelle 2.12: Protokoll der Immundetektion.

Lösung	Zeit
Blockierungslösung	30–60 min
1. Antikörperlösung	3 h
PBS-T	3 x 15 min
2. Antikörperlösung	1 h
PBS-T	3 x 15 min
H ₂ O _{dd}	kurz spülen

Der Primärantikörper (siehe Tab. 2.13) wurde in der Blockierungslösung verdünnt, der Sekundärantikörper (siehe Tab. 2.13) in Blockierungslösung, die 1:1 mit PBS-T Lösung verdünnt war. Als Sekundärantikörper wurden entweder mit Alkalische Phosphatase- oder Peroxidase-konjugierte Antikörper verwendet, Die Alkalische Phosphatase setzt ein Substrat um, hier NBT/BCIP, das auf der Membran einen bräunlichen Niederschlag am Reaktionsort hinterlässt. Der Nachweis über Peroxidase erfolgte mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion. Verwendet wurde das Pierce ECL Western Blotting Substrate nach Angaben des Herstellers. In der Dunkelkammer wurde die in Folie eingeschlagene Membran in eine Röntgenfilmkassette gelegt und mit dem Röntgenfilm (BioMax Light 1, Kodak) inkubiert. Die Belichtungszeit wurde durch eine Probelbelichtung von 1 min abgeschätzt. Der belichtete Film wurde mit Entwickler (GBX developer) und Fixierer (GBX fixer, beides Kodak, USA) behandelt. Der entwickelte Röntgenfilm wurde mit einem Scanner eingelesen und das entsprechende Bild als Graustufenbild gespeichert.

2.9.10 Verwendete Antikörper

Die im Immunoblot verwendeten Primärantikörper und zugehörigen Sekundärantikörper sind mit den jeweiligen Verdünnungen in der Tabelle 2.13 aufgelistet.

Tabelle 2.13: Im Western Blot verwendete Antikörper.

Primärantikörper	Verdünnung
Kaninchen anti-Rind-EbMIC4-Cterm (SeqLab)	1:2000-7500
Anti-Vimentin (monoklonaler Antikörper aus der Maus, Klon Vim 3B4, DakoCytomation)	1:1000-2000
Maus anti-Rind-MHCI (Hybridoma-Kulturüberstand, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Menge, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen)	unverdünnt-1:20
Maus anti-Rind-MHCII (Hybridoma-Kulturüberstand, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Menge, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen)	unverdünnt-1:20
Immunserum aus wiederholt mit <i>E. bovis</i> -Sporozoiten infizierten Kälbern	1:100
Sekundärantikörper	Verdünnung
Peroxidase conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Dianova)	1:50000
Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research)	1:50000
Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Bovine IgG F(ab') ₂ (Dianova)	1:5000-15000
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Bovine IgG (H+L) (Jackson Immuno Research)	1:5000-15000

2.10 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

2.10.1 Fixierung des Probenmaterials

Spezielle Lösungen:

Paraformaldehyd-Stammlösung (PFA, 10%)	10 g Paraformaldehyd mit H ₂ O ad 100 ml, unter Zugabe von 1 M NaOH lösen, filtrieren, portioniert bei -20°C lagern
PAGA-Fixierlösung	4% PFA-Lösung, 0,25% Glutaraldehyd (25%, Serva) in PBS

Vitale Sporozoiten und Merozoiten wurden mit PBS gewaschen, in einer Konzentration von ca. 2×10^4 Parasiten/ μ l auf diagnostische Objektträger (12-Loch, Erie Scientific Company, ca. 10 μ l/Loch) aufgetropft und anschließend auf einer 37°C warmen Heizplatte schnell getrocknet (ca. 15 min). Anschließend wurden sie bei -20°C gelagert oder fixiert. Für die Fixierung wurden entweder -20°C-kaltes Methanol (15 min, RT), oder gepufferte PAGA-Fixierlösung (10 min, RT) verwendet. Im Fall der PAGA-Fixation wurden die Parasiten 1x mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Auf Glasplättchen gewachsene, infizierte und nicht-infizierte Wirtszellen wurden nach den gleichen Methoden fixiert, getrocknet und bei -20°C gelagert.

2.10.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFAT)

Spezielle Lösungen:

Blockierungspuffer I	50 mM NH_4Cl in PBS
Blockierungspuffer II	2% (w/v) BSA in PBS
1. Antikörperlösung	Primärer Antikörper in Blockierungspuffer II
2. Antikörperlösung	Sekundärer Antikörper in 1% (w/v) BSA in PBS
EvansBlue	0,05% (w/v) Evans Blue (Serva) in PBS
Mowiol-Einbettmittel	20 g Mowiol 4.88 (Calbiochem), 2,4 g Propylgallat (Anti-Fading, Sigma), 40 ml Glycerol ultra pure, 80 ml PBS, Mowiol wurde unter Rühren langsam zugegeben, anschließend zentrifugiert (30 min, 25.000 x g), portioniert und bei 4°C gelagert

Vor der Antikörperfärbung (zur Verdünnung siehe Tab. 2.15) wurden die jeweiligen Areale mit einem Fettstift (DakoCytomation Pen, Dako, Dänemark) umrandet, so dass kein Vermischen der Lösungen untereinander erfolgen konnte. Weiterhin erfolgten alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer bei RT. Der Ablauf des IIFAT ist in der Tabelle 2.14 zusammengefasst. Je nach Fixierung wurden die Proben unterschiedlich behandelt, (siehe Tabelle 2.14). MeOH-fixierte Proben mussten im Gegensatz zu PAGA-fixierten nicht mit der Blockierungslösung I behandelt werden. Teilweise wurden die PAGA-fixierten Proben mit Tween 20-Lösung behandelt, was zu einer verbesserten Durchlässigkeit der Zellmembran führt.

Generell wurden die Parasiten über Evans Blue, das dem Konjugat zugesetzt wurde, gegengefärbt. Die Präparate wurden zum Schluss mit Mowiol 4.88 eingebettet und bei 4°C dunkel gelagert.

Tabelle 2.14: Protokolle für IIFAT.

Lösung	MeOH-Fixierung	PAGA-Fixierung
Tween 20 (0,1%) in PBS	-	(5 min) ¹
Blockierungspuffer I	-	5 min
PBS	5 min	5 min
Blockierungspuffer II	30 min	30 min
1. Antikörper	3 h	3 h
PBS	3 x 5 min	3 x 5 min
2. Antikörper	1 h	1 h
PBS	3 x 5 min	3 x 5 min
H ₂ O _{dd}	kurz spülen	kurz spülen

Anmerkung: ¹Behandlung mit Tween 20 führt zu einer verbesserten Durchlässigkeit der Zellmembran

2.10.3 Verwendete Antikörper

Die im IIFAT verwendeten Primärantikörper und Sekundärantikörpern sind in der Tabelle 2.15 mit den entsprechend verwendeten Verdünnungen aufgelistet.

Tabelle 2.15: Im IIFAT verwendete Antikörper.

Primärantikörper	Verdünnung
Kaninchen anti-Rind-EbMIC4-Cterm	1:50-500
Kaninchen anti Huhn-EtMIC4 (Tomley)	1:10-100
Immunserum aus wiederholt mit <i>E. bovis</i> -Sporozoitien infizierten Kälbern	1:10-100
Sekundärantikörper	Verdünnung
FITC-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (whole) (Sigma)	1:500
FITC-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Bovine IgG (whole) (Sigma)	1:500

2.10.4 Lichtmikroskopie

Indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen wurden sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch am Konfokalmikroskop ausgewertet. Das Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar) war mit unterschiedlichen Objektiven zum Teil mit Phasenkontrast (10x, 20x, 40x, 100x) und einer Digitalkamera (Leica DC 500) ausgestattet.

Am Konfokalmikroskop (Leica TCS SP2) wurden die Präparate mit einem 40x oder 63x Plan-Apochromat Objektiv ausgewertet. Die Anregung der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die verwendeten Sekundärantikörper (siehe 2.10.3) gekoppelt waren, und die verwendeten Filtersätze sind in der Tabelle 2.16 aufgelistet.

Tabelle 2.16: Verwendete Filterkombinationen am Konfokalmikroskop.

Fluoreszenzfarbstoff	Excitation (nm)	Emission (nm)
FITC/FITC wide	488	Bandpass (500–535)/(500–700)
FITC/TRITC	488/543	Bandpass (500–535)/Bandpass (560–700)

2.10.5 Elektronische Bildbearbeitung

Zur Optimierung der Kontraste- und der Helligkeitsparameter wurden die digitalen Bilder mit dem Programm *Corel Photo Paint* bearbeitet. Die Bildanordnung erfolgte mit *Corel Draw*. Gegenübergestellte Bilder wurden immer mit den gleichen Bedingungen aufgenommen und mit den gleichen Parametern bearbeitet.

2.11 Behandlung von *E. bovis*-Sporozoiten mit verschiedenen Substanzen zum Auslösen der Mikronemensekretion

Spezielle Lösungen und Substanzen:

RPMI 1640-Medium mit 3% FKS und 1% PenStrep (Gibco)

Ionomycin-Ca-Salz (Invitrogen)

Stammlösung 1 mM in DMSO

Cytochalsin D (Sigma)

Stammlösung 1 g/ml in DMSO

Für Lokalisationsstudien zu EbMIC4 wurden *E. bovis*-Sporozoiten unterschiedlichen Behandlungen (siehe Tab. 2.17) unterworfen und anschließend mit dem Antiserum gegen EbMIC4-Cterm (K1) im IIFAT (siehe 2.10.2) getestet. Untersucht wurde der Einfluss von fötalem Kälberserum (FKS), Ethanol, Ionomycin und Cytochalasin D. Zur Kontrolle wurden Behandlungen mit PBS (Negativkontrolle) bzw. mit abgelösten Vero-Zellen, als weitere potentielle Wirtszelle (Positivkontrolle, etablierte Zelllinie, die aus epithelialen Nierenzellen der Grünen Meerkatze hergestellt wurde, ECACC 84113001), durchgeführt. Aufgrund früherer Untersuchungen zur Sekretion von unterschiedlichen MICs bei verschiedenen Apikomplexa wurden diese Substanzen zum Auslösen der Sekretion *in vitro* verwendet.

Die *E. bovis*-Sporozoiten wurden in den jeweiligen Inkubationslösungen 5 bzw. 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie entweder sofort mit -20°C kaltem Methanol fixiert oder erst pelletiert (15 min, 600 x *g*, 4°C) und dann fixiert (15 min, -20°C kaltes Methanol). Nach nochmaliger Zentrifugation (15 min, 600 x *g*) wurden die pelletierten Sporozoiten resuspendiert, auf 12-well-Objektträger getropft, getrocknet und bei -20°C gelagert. EbMIC4 wurde in den behandelten Sporozoiten mittels IIFAT unter Verwendung des gegen C-Terminus von EbMIC4 gerichteten Antiserums K1 (siehe Kapitel 2.10) nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden mittels KLSM analysiert und im Einzelbildmodus unter Verwendung identischer Bedingungen dokumentiert.

Tab. 2.17: Protokoll der unterschiedlichen Behandlung von *E. bovis*-Sporozoiten, angegeben sind die Endkonzentrationen der verwendeten Lösungen.

Inkubationslösung	5 min	30 min
PBS (Negativkontrolle)	x	x
PBS-Vero-Zellen (Positivkontrolle)	x	x
RPMI-3% FKS	x	X
PBS-1% EtOH	x	x
Ionomycin (2 µM in PBS)	x	x
Ionomycin (2 µM) / CytochalasinD (25µg/ml in PBS)	x	x

2.12 Proteomics

2.12.1 Vorbereitung der Proteinproben

Spezielle Lösungen:

IEF-Lysispuffer	8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 30 mM DTT, 20 mM Tris-Base, 2% IPG-Puffer (pH 3-10, GE)
Sorbitol-Waschpuffer	25 mM Sorbitol, 10 mM Tris-Base, pH 7

Für die Gewinnung des Probenmaterials wurden BFGC-Zellen in 75 cm³ ZKF kultiviert (siehe 2.7.5.1.2). Bei einer erreichten Konfluenz von 90-100% wurden die Zellen mit *E. bovis*-Sporozoit (5x10⁵ je ZKF) infiziert. Nicht-infizierte BFGC-Monolayer dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die nicht-infizierten und infizierten Zellen weiter kultiviert und am Tag 14 p. i., bei Austritt der ersten Merozoiten aus den gebildeten Makromeronten, abgelöst. Dafür wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in PBS aufgenommen. Die PBS-Zellsuspension wurde zentrifugiert (600 x *g*, 15 min) und zweimal mit Sorbitol-Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in IEF-Lysispuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die weitere Aufarbeitung der Proben wurden je 800 µl Probenvolumen, 1,5 µl Benzonase (375 U, Calbiochem) und 8 µl Protease Inhibitor für Säugetierzellen (Sigma) hinzugegeben und im Thermomixer (RT, 1000 rpm) 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2x 5 min lang mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert (21000 x *g*, 30 min, 20°C). Der Überstand wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit Aceton gefällt. Dazu wurde die Probe mit 7 Teilen Aceton vermischt, 16 h bei -20°C gelagert und anschließend zentrifugiert (8.510 x *g*, 30 min). Das Proteinpellet wurde noch zweimal mit je 300 µl Aceton gewaschen und anschließend in IEF-Lysispuffer resuspendiert. Eine Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (2DQuant, GE Healthcare). Die ermittelten Proteinmengen lagen bei den nicht-infizierten BFGC-Zellen bei 3,5 mg (2,83µg/µl) und bei den *E. bovis*-infizierten Wirtszellen bei 3,8 mg (8,44 µg/µl).

2.12.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.12.2.1 Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die erste Dimension wurden kommerziell hergestellte IPG-Streifen (DryStrip pH 3-11 non-linear, GE Healthcare) mit einer Länge von 11 cm und einem pH-Bereich von 3-11 verwendet. Dadurch konnte ein breites Proteinspektrum mit guter Auflösung der Proteinspots erreicht werden. Für jeden IPG-Streifen wurden 300 µg Proteinlösung in einem Volumen von 220 µl luftblasenfrei in eine Spur der „Reswelling Trays“-Apparatur eingebracht. Dann wurden die trockenen IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten auf die Proteinlösung aufgelegt und mit DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) vollständig überschichtet. Die Rehydratisierung der Streifen erfolgte für 24 h bei RT. Nach der Inkubation wurden die Streifen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ abgespült und für die isoelektrische Fokussierung vorbereitet. Dazu wurden sie mit der Gelseite nach oben auf den unteren Teil der IEF-Apparatur gelegt. Im nächsten Schritt wurden befeuchtete Filterpapierstreifen aufgelegt, worauf die Elektrodenklammern platziert wurden.

Nachdem die Apparatur komplettiert war, wurde die isoelektrische Fokussierung mit dem in Tabelle 2.18 verzeichneten Programm bei 20°C durchgeführt.

Tabelle 2.18: IEF-Bedingungen.

U (V)	I (mA)	P (W)	(kVh)	t (h)
0-100	2	5	0,25	5
100-3500	2	5	10,8	6
3500	2	5	21	6

Nach erfolgreicher IEF wurden die IPG-Streifen aus der Kammer genommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.12.2.2 Zweite Dimension

Spezielle Lösungen:

Elektrophorese-Laufpuffer (10x)	25 mM TrisBase, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Acrylamid-Lösung	Rotiphorese Gel 30, Roth
4x Resolving Gelpuffer	1,5 M Tris-Base, pH 8,8
12,5% Trenngel (für 2 Gele)	33,3 ml Acrylamid-Lösung, 20 ml Resolving Gelpuffer (4x), 25,4 ml H ₂ O _{dd} , 400 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulphat- Lösung 800 µl 10% SDS-Lösung, 26,4 µl TEMED-Lösung
„gel storage“ Puffer	0,1% (w/v) SDS in 1x Resolving Gelpuffer
Equilibrierungspuffer	6 M Urea, 30 % (v/v) Glycerin, 50 mM Tris pH 8,8, 4% (w/v), SDS 0.01% Bromphenolblau,
DTT-Lösung	10 mg/ml 1,4-Dithio-DL-threitol (Fluka), 20 mg/ml SDS in Equilibrierungspuffer
Jodacetamid-Lösung	40 mg/ml Jodacetamid (Fluka), 20 mg/ml SDS in Equilibrierungspuffer
Precision Plus Protein Prestained Standards (BioRad)	Größenbereich: 10-250 kD Anzahl Proteinbanden: 10
Roti®-Mark WESTERN-Marker (Roth)	Größenbereich: 10-120 kD Anzahl Proteinbanden: 8
Bench Mark™ Protein Ladder	Größenbereich: 10-220 kD
Molekulargewichtsmarker (Invitrogen)	Anzahl Proteinbanden: 15

Die Natriumdodecylsulfat/Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde, basierend auf der Methode von Laemmli (1970), in einer Gelelektrophorese-Kammer von Hoefer 600 durchgeführt. Ein 12,5%iges Trenngel wurde gegossen, mit Butanol überschichtet (2 h) und 16 h polymerisiert, wobei das Butanol durch den „gel storage“ Puffer ersetzt wurde. Kurz vor dem Aufbringen der Gelstreifen wurden der „gel storage“ Puffer entfernt und die Geloberfläche mit Laufpuffer gespült und abgetrocknet.

Nach dem Auftauen der Gelstreifen wurden sie umäquilibriert indem sie 1x15 min in der DTT-Lösung (leichtes waagerechtes Schwenken), dann 1x 15 min in der Jodacetamid-Lösung (leichtes waagerechtes Schwenken, im Dunkeln) inkubiert und zum Schluss mit Laufpuffer abspült wurden. Nach dem Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit wurden sie, mit der Gelseite nach vorn mittig auf das vorbereitete Trenngel gelegt. Flankiert wurden sie mit Markerplättchen, die mit 10 µl des entsprechend verwendeten Proteinstandards getränkt waren. Proteingele, die später geblottet wurden, wurden mit Roti®-Mark WESTERN-Marker (Roth) und Precision Plus Protein Prestained Standards (Biorad) markiert. Gele, die mit

Coomassie gefärbt wurden, wurden mit dem Proteinstandard von Invitrogen versehen. Nachdem die Gelstreifen und die Markerplättchen in 0,5% Agarose (GE Healthcare) eingebettet worden waren, erfolgten der Einbau in die Gelelektrophoresekammer und die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension nach dem in Tabelle 2.19 beschriebenen Bedingungen bei 25°C.

Tabelle 2.19: SDS-PAGE Bedingungen.

Schritt	U (V)	I (mA)	P (W)	t (min)
1	500	60	50	15
2	500	110	50	255

Nach Beendigung der Auftrennung wurden die Positionen der IPG-Streifen auf den Gelen markiert, diese dann entnommen und entweder mit Coomassie (siehe 2.11.4) gefärbt oder für einen Western-Blot (siehe 2.11.3) weiterverarbeitet.

2.12.3 Western Blot

2.12.3.1 Transfer (Tankblot)

Spezielle Lösungen:

Towbin-Stocklösung (10x)	75,75 g TrisBase und 360,4 g Glycin in 2,5 ml Gesamtvolumen
Towbin-Blotpuffer (1x)	300 ml 10x Towbin-Puffer, 600 ml EtOH, 2100 ml H ₂ O _{dd}

Für den immunchemischen Nachweis der einzelnen Proteine erfolgte der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Hybond P 0,45 µm, GE Healthcare) im Tankblot-Verfahren. Zur Aktivierung der markierten PVDF-Membran, wurde diese für 3-5 s in Methanol geschwenkt, dann 2x 5 min in H₂O_{dd} gewaschen und für mindestens 15 min in Towbin-Blotpuffer äquilibriert. In dieser Zeit wurde das Gel aus der Elektrophoreseapparatur entnommen, markiert und ebenfalls für 15 min in Towbin-Blotpuffer äquilibriert. Danach erfolgte der Zusammenbau der Blotapparatur im Sandwichsystem, wobei alle Teile im Towbin-Blotpuffer getränkt waren: Zuerst wurde auf der Kathodenseite ein Schwämmchen positioniert, dann ein zugeschnittenes Blotpapier, darauf wurde die Membran gelegt. Auf die Membran wurde das Gel positioniert und zum Schluss wieder zugeschnittenes Blotpapier und ein Schwämmchen. Vor dem Schließen der Kassette wurden Luftblasen mit Hilfe eines Abrollers aus dem fertigen Sandwich entfernt. Dann wurden die

Blotapparatur vollständig zusammengebaut, mit Laufpuffer aufgefüllt und die Proteine geblottet (34 V, 19 h, 570 Vh bei 15°C).

2.12.3.2 Immunologischer Nachweis

Spezielle Lösungen:

Blockierungslösung	Roti®-Block (Roth), einfach in H ₂ O
1. Antikörperlösung	Antikörper in Blockierungslösung
2. Antikörperlösung	Antikörper in Blockierungslösung
PBS-T	PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20 (Aldrich), pH 7,4

Zur Bestimmung der Position des Referenzproteins Vimentins im zweidimensional aufgetrennten Gel wurde das Protein mittels Western Blot und anschließender Immundetektion nachgewiesen. Für den immunologischen Nachweis wurden die Membranen in einem Hybridisierungssofen in Röhren inkubiert und dem in der Tabelle 2.20 angegebenen Verfahren unterzogen. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Vimentin verwendet (Anti-Vimentin, Clone Vim 3B4, 1:10000, DakoCytomation). Der Zweitantikörper war ein anti-Maus Immunglobulin konjugiert mit Peroxidase (HRP, P0260, DakoCytomation, Hamburg, 1: 3000).

Tabelle 2.20: Protokoll des immunologischen Nachweises.

Lösung	Zeit/Temperatur
Blockierungslösung	5 h / RT
1. Antikörperlösung	über Nacht / 4°C
PBS-T	1x abspülen, 5 x 3 min / RT
2. Antikörperlösung	1 h / RT
PBS-T	1x abspülen, 5 x 3 min / RT

Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurde die überschüssige Flüssigkeit von der PVDF-Membran entfernt und dieser auf die Saran-Folie (Roth) gelegt. Die Substratlösung für die Peroxidase wurde nach Herstellerangaben gemischt („ECL Plus Western Blotting Detection Reagent“, GE Healthcare), auf die Membran geben und 1 min inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde über die Kante abtropfen gelassen und die Membran in die Folie einschlagen. Diese wurde dann in einer Filmkassette mit der Proteinseite nach oben fixiert. Darauf wurde im Dunkeln der Film (Kodak, X-Omat AR Film, XAR-5; 24x30 cm, Sigma) aufgelegt. Nach der Exposition (1 min 30 s) wurde der Film entwickelt [60 s Entwicklerlösung

(Cronex MD-Developer, Agfa, Dübendorf), kurz mit H₂O gespült, dann 5 min Fixierlösung (Cronex MFEDeveloper, Agfa, Dübendorf)], mit H₂O gespült und getrocknet.

2.12.4 Massenspektrometrie (MS)-kompatible Coomassiefärbung

Spezielle Lösungen:

Comassiefärbelösung	0,2% Coomassie R 250, 50% Methanol, 50% H ₂ O _{dd}
Entfärbelösung	50% Methanol, 6% Essigsäure, 44% H ₂ O _{dd}

Das Proteinmuster nach der Auftrennung in den Gelen wurde mit einer Coomassiefärbung, die MS-kompatibel war, sichtbar gemacht. Dafür wurden die Gele für 60 min in der Färbelösung schwenkend inkubiert. Anschließend wurden die Gele mehrere Stunden in der Entfärbelösung geschwenkt, so dass der Hintergrund entfärbt war. Vor der Dokumentation wurden die Gele in H₂O umäquilibriert (1 h). Nach dem Einscannen wurden sie bei 4°C gelagert.

2.12.5 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel

Spezielle Lösungen: (immer frisch angesetzt)

ACN	Acetonitril
Ammoniumhydrogencarbonatpuffer	50 mM NH ₄ HCO ₃ -Puffer
NH ₄ HCO ₃ /ACN-Puffer	50 mM NH ₄ HCO ₃ / Acetonitril (1:1)
DTT-Lösung	10 mM DTT in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer
Jodacetamid-Lösung	55 mM Jodacetamid in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer
Verdau-Puffer	25 mM NH ₄ HCO ₃ -Puffer
Trypsin-Lösung	Trypsin wurde in 0,01% TFA vorgelöst und mit Verdau-Puffer (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) (25 mM) zu einer Endkonzentration von 10 ng/µl verdünnt.
TFA-Lösung (Trifluoressigsäure)	1% TFA (v/v) in H ₂ O _{dd}

Die interessierenden Spots wurden aus dem Gel ausgestochen, in die Eppendorf LoBind Gefäße (0,5 ml, Eppendorf, Hamburg) gegeben, mit 100 µl H₂O versetzt und geschüttelt (10 min, RT). Nach Entnahme des Überstandes wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt. Die Gelstücke wurden 15 min mit 100 µl 50 mM NH₄HCO₃/ACN gewaschen und dann für genau 60 s mit 30 µl ACN vollständig bedeckt. Nach der Entfernung von ACN wurde die Stücke mit 50 µl 50 mM NH₄HCO₃-Puffer rehydriert. Nach 5 min wurden 50 µl ACN zugegeben und das Ganze 15 min geschüttelt. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Gelstücke erneut

mit 30 µl ACN 60 s inkubiert und danach in der Vakuumzentrifuge für 30 min bei RT getrocknet.

Zur Reduzierung und Alkylierung wurde das getrocknete Gel zuerst mit 50 µl DTT-Lösung (30 min, 37°C) und anschließend in Jodacetamid-Lösung (30 min, im Dunkeln, RT) schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke gewaschen (erst mit 100 µl 50 mM Puffer, dann 100 µl NH_4HCO_3 /ACN-Puffer, je 15 min geschüttelt). Dann wurden 30 µl Acetonitril (1 min) hinzugegeben und das Gel in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Zur Trypsinbehandlung wurden die Gelstücke mit 10 µl der Trypsinlösung versetzt und inkubiert (20 min, RT). Die überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und anschließend 16 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Proben mit 10 µl TFA-Lösung versetzt und 10 min lang mit Ultraschall behandelt. Die eluierten Peptide standen nun für massenspektrometrische Analysen zur Verfügung.

2.12.6 Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight

Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Für die MALDI-TOF-MS-Analysen stand ein Ultraflex TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen), das mit einem Stickstofflaser und einer LIFT-MS/MS Einheit ausgestattet war, zur Verfügung. Die Messungen wurden im positiven Reflektormodus durchgeführt. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (20 mg/ml, Sigma) in 50 % ACN und 1% Phosphorsäure verwendet. Für die Analyse wurden auf einem Stahltarget durch „Dried droplet“-Präparation 0,5 µl Matrix-Lösung mit 1 µl Probe gemischt und an der Luft getrocknet. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Peptid (Kalibrierungs)-Standard (~1.000-4.000 Da, Bruker Daltonics). Für jede Peptidanalyse wurden 500 Einzelspektren aufgenommen und addiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Compass 1.1 Software (Bruker) bestehend aus den Programmen FlexControl 2.4, FlexAnalysis 2.4 und BioTools 3.0. Proteine wurden mit Hilfe der Mascot Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com>) identifiziert. Hierbei wurde die Datenbanken Swiss-Prot/TrEMBL und NCBI Datenbank verwendet. Die Identifikation des Proteins wurde als sicher angenommen bei einem signifikanten ($p < 0.05$) Wahrscheinlichkeits-basierenden Mowse Scores.

Kapitel 3: Ergebnisse

3.1 Identifizierung der DNA-Sequenz von Ebmic4

3.1.1 Grundlagen für die Identifizierung der Ebmic4-Sequenz

Für die Ermittlung der DNA-Sequenz von Ebmic4 stand aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe eine circa 330 bp lange DNA-Sequenz zur Verfügung (Abb. 3.1). Die *in silico*-Analyse der zugehörigen Proteinsequenz im offenen Leserahmen 3 (ORF 3) ergab eine Homologie zur Proteinsequenz von *E. tenella*-MIC4 (EtMIC4, Zugangsnummern: CAC34726 [Protein], AJ306452 [Genom]) (BlastP-Analyse, Abb. 3.2). Der Bereich der größten Homologie zu EtMIC4 befand sich dabei am Übergang von einer Thrombospondin type 1 (TSP-1)-Domäne zu einer „epidermal growth factor-like“ (EGF)-Domäne und kodiert selbst für eine „epidermal-growth-factor-Ca-binding“ (EGF-Ca)-Domäne (Abb. 3.2).

1	G	S	Y	T	C	T	C	G	K	G	Y	T	G	F	G	E	S	C	Q	D
1	CGGGTTCGTATACCTGCACTTGTGGCAAAGGTTATACGGGGTTTGGCGAGTCATGCCAGG																			
21	V	D	E	C	V	G	N	A	A	G	C	D	I	H	A	V	C	T	N	L
61	ACGTCGACGAGTGCCTCGGGAACGCTGCAGGTTGCGACATACATGCAGTATGTACTAACC																			
41	P	G	S	F	S	C	A	C	K	S	G	F	E	G	N	G	Y	E	C	V
121	TGCCCGGCTCTTTCAGTTGTGCTTGCAAGTCGGGTTTTGAAGGCAACGGCTATGAATGCG																			
61	E	K	P	V	V	P	G	Q	I	F	C	E	S	W	T	A	W	S	K	C
181	TGGAGAAGCCCGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTTGCAGATCGTGGACTGCTTGGTCGAAGT																			
81	D	G	Y	H	H	R	K	Q	K	T	L	Y	R	S	V	D	Q	N	G	D
241	GTGACGGGTACCAACACAGAAAGCAAAAGACATTGTATCGTTCTGTGACCAAAACGGAG																			
101	T	R	M	P	R	E	G	S												
301	ACACGCGAATGCCAGGGAAGGAAGCTT																			

Abb. 3.1: DNA- und Proteinsequenz eines circa 330 bp langen Teilstückes von Ebmic4.

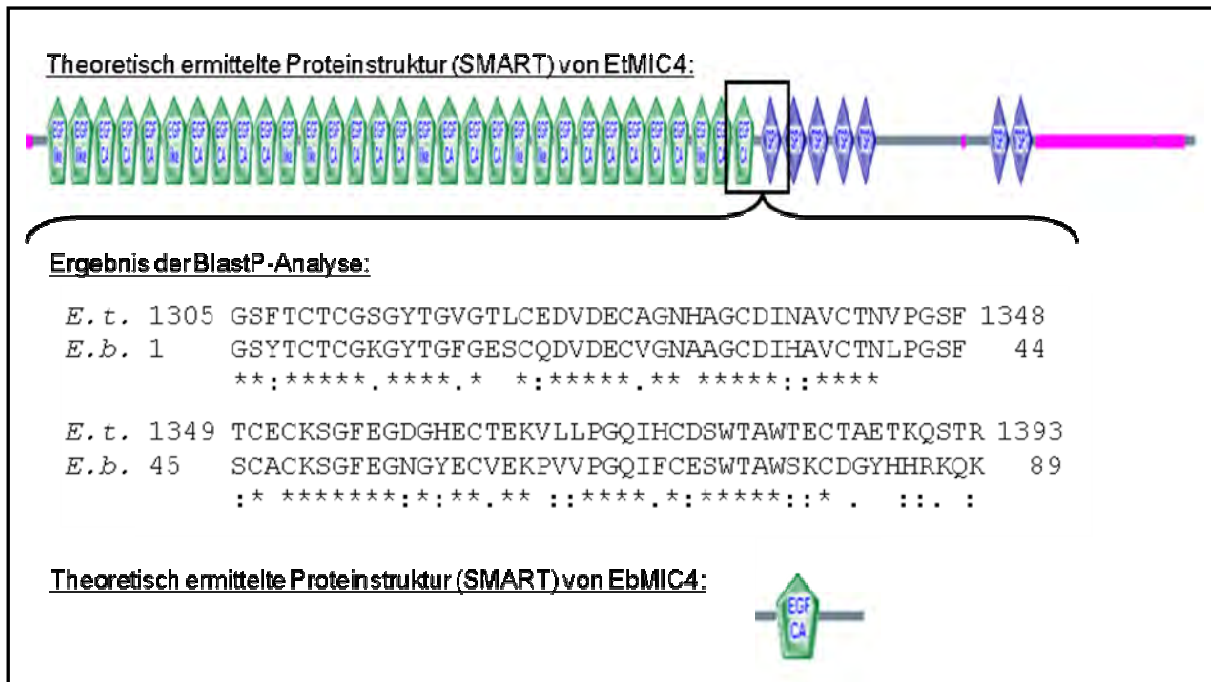


Abb. 3.2: Vergleich der Proteinsequenzen von EbMIC4 und EtMIC4.

Vergleich der theoretischen Proteinsequenz des 330 bp großen Teilstücks von EbMIC4 mit der theoretisch ermittelten Proteinsequenz von EtMIC4 mittels BlastP-Analyse und die schematische Darstellung der Proteinstruktur mit Hilfe des SMART-Programmes.

3.1.2 Vervollständigung der DNA-Sequenz mittels PCR

3.1.2.1 Amplifikation mit spezifischen Primern

Ausgehend von der bekannten *Etmic4*-Sequenz, die sich durch eine Vielzahl konservierter Bereiche auszeichnet (siehe Abb. 3.2), wurde ein PCR-Ansatz mit einer niedrigen Annealingtemperatur (54°C) gewählt, um eine Anlagerung der Primer (MIC4_S1_for/rev) an eine ähnliche, aber vermutlich nicht identische Sequenz zu ermöglichen und somit neue Sequenzabschnitte zu identifizieren. Die PCR wurde mit cDNA aus *E. bovis*-Merozoiten als Ziel-DNA durchgeführt und resultierte in einem Gemisch aus Amplifikaten, die eine Größe von 280 bp, 500 bp, 1,1 kb, 1,3 kb und 2,1 kb besaßen (Abb. 3.3, Spur A). Um die für *Ebmic4* spezifischen DNA-Teilstücken zu identifizieren, wurde ein Southern Blot mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde durchgeführt. Die Sonde wurde über PCR unter Verwendung der spezifischen Primer (MIC4_S1_for/rev) amplifiziert und besaß eine Größe von ca. 230 bp. Im Southern Blot reagierte die Sonde mit zwei Banden (Abb. 3.3, Spur B) von ca. 230 bp und 1,3 kb. Es wurde aufgrund der Größe vermutet, dass erstere dem schon bekannten Teilstück der *Ebmic4*-Sequenz entspricht. Die DNA der letzteren Bande wurde aus dem Gel eluiert, kloniert und sequenziert. Es zeigt sich, dass so ein weiterer Abschnitt

von Ebmic4 identifiziert werden konnte. (Sequenz im Anhang 1: Klon10). Dieser war 1100 bp lang und verlängerte die bisher bekannte Sequenz zum 3'-Ende. In der BlastX-Analyse (Altschul et. al., 1997) zeigte die Sequenz die größte Homologie zu den Sequenzen von EtMIC4 und TSP250 von *E. maxima* (EmTSP250, Zugangsnummern: AA052676 [Protein], AY239227 [Genom]). Die erreichten Erwartungswerte (e-value) lagen bei $1e^{-85}$ (EmTSP250) und $8e^{-83}$ (EtMIC4) (je niedriger, desto wahrscheinlicher ist die Homologie). Die Ähnlichkeit zu beiden Proteinen lag jeweils bei 54%.

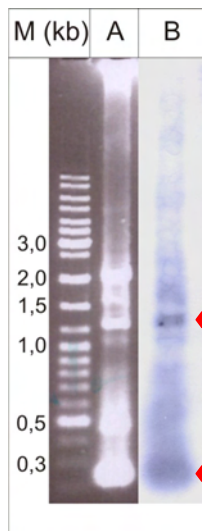


Abb.3.3: Synthese und Verifizierung eines weiteren EbMIC4-Teilstücks.

Die cDNA von *E. bovis*-Merozoiten wurde in der PCR unter Verwendung der spezifischen Primer MIC4_S1_for/rev eingesetzt. Dabei wurden Amplifikate von ca. 230 bp, 500 bp, 1,1 kb, 1,3 kb und 2,1 kb erhalten (A). Über Southern Blot-Analysen unter Verwendung einer Ebmic4-spezifischen Sonde wurde ein neues Ebmic4-Teilstück mit einer Größe von 1,3 kb identifiziert (B).

3.1.2.2 Amplifikation mit degenerierten Primern

Des Weiteren wurden PCR-Ansätze mit degenerierten Primern durchgeführt, die auf der Basis des Sequenzvergleiches mit dem Programm ClustalW (Wilbur and Lipman, 1983; Myers and Miller, 1988) von Etmic4 und Emtsp250 ausgewählt wurden. Aufgrund bestimmter, stark konservierter Bereiche konnten mehrere degenerierte Primer ermittelt werden (Abb. 3.4), die eine anschließende „nested PCR“ zur Verbesserung der Spezifität ermöglichen. Generell wurde immer ein spezifischer mit einem degenerierten Primer in der PCR kombiniert. Die dabei erhaltenen Amplifikate wurden kloniert und sequenziert. Die Methode führte jedoch nicht zu neuen Sequenzinformationen.

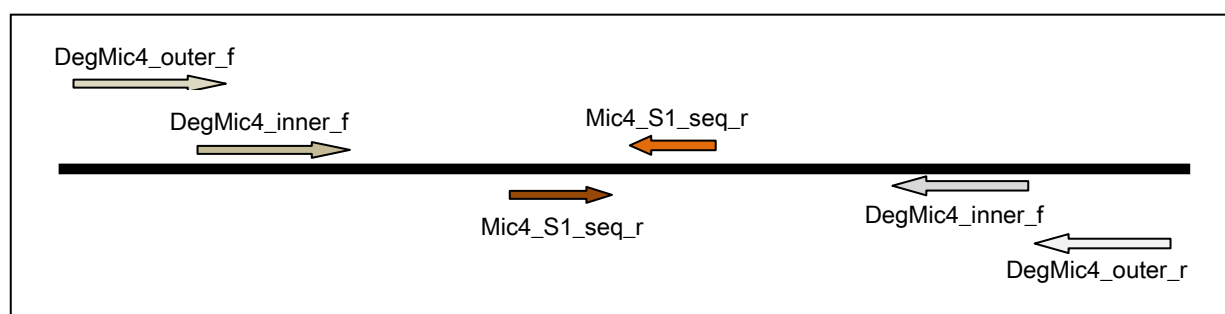


Abb. 3.4: Position der degenerierten Primer für die PCR.

Die Position der degenerierten Primer befand sich am Ende und am Anfang der verglichenen Sequenzen von Etmic4 und Emtsp250, in stark konservierten Bereichen.

3.1.3 Überprüfung vorhandener cDNA-Phagenbanken von *E. bovis* auf Sequenzen von Ebmic4

Für die Suche nach Ebmic4-positiven Phagenklonen standen zwei cDNA-Phagenbanken zur Verfügung (siehe 2.8.13). Die Suche nach positiven Klonen in der mit der SMART-Technologie hergestellten cDNA-Phagenbank verlief mit den eigenen, aber auch mit anderen, vom hier bearbeitenden Projekt unabhängig hergestellten DNA-Sonden erfolglos vgl. Dyachenko (2006). Gründe könnten in der Herstellung der Bank liegen, da die durchschnittliche Länge der mit OligodT-Primer generierten cDNAs bei 0,3 bis 1,5 kb lag (Dyachenko, 2006), was für die ca. 7 kb lange gesamte DNA-Sequenz von Ebmic4 nicht ausreichend war.

Die Suche nach positiven Klonen wurde daher auf die ebenfalls vorhandene OrientExpress™-cDNA-Bank (hergestellt mittels Random Priming Strategie (Hexamere), Vektor I-SCREEN-1) ausgedehnt. Die Inserts der Phagenklone hatten zwar ebenfalls eine Größe von 0,2 bis 1,5 kb (Dyachenko, 2006), diese waren aber über die gesamte Sequenz verteilt. Beim Überprüfen der Bank stellte sich jedoch heraus, dass die Methylierung der in der cDNA vorhandenen Schnittstellen für *EcoR* I und *Hind* III offensichtlich nicht erfolgt war, was im weiteren Verlauf zum Zerschneiden der cDNA an diesen Stellen führte. Das Ergebnis war eine unvollständige Phagenbank, deren Klone sich nicht überlappten, was letztendlich die Identifikation der kompletten DNA-Sequenz von Ebmic4 unmöglich machte.

Tabelle 3.1: Hergestellte Digoxigenin-markierte Sonden und ihr Ergebnis bei der Überprüfung der cDNA-Phagenbanken.

Sonde	Primerkombination	Template	überprüfte Bank/Ergebnis
MIC4_S1	MIC4_S1_forward MIC4_S1_reverse	330 bp Teilstück (siehe 3.1.1)	SMART-CDNA-Bank/negativ OrientExpress™-cDNA-Bank/negativ
MIC4_S4	EbMIC4_S4_for EbMIC4_S4_rev	MIC4-Klon10 (Anhang 1)	SMART-CDNA-Bank/negativ OrientExpress™-cDNA-Bank/positiv
MIC4_S5	Mic4_S5_f Mic4_S5_rev	Phagenklon II-1-1a-1_Mic4	OrientExpress™-cDNA-Bank/positiv
MIC4_S6	PS-SondeMIC4-S6-for(5') PS-SondeMIC4-S6-rev(3')	GW_EbMIC4_1Fr#5	OrientExpress™-cDNA-Bank/negativ

Dargestellt sind die verwendeten DNA-Sonden, ihre für die Generierung mittels PCR verwendeten Primerkombinationen und das eingesetzte Template. Weiterhin wurden die Ergebnisse der Überprüfung der zwei verschiedenen cDNA-Phagenbanken dargestellt. Ergebnisse wurden nur als positiv deklariert, wenn neue Ebmic4-Sequenzen identifiziert wurden.

Für die Durchmusterung der OrientExpress™-cDNA-Bank wurden mehrere Digoxigenin-markierte DNA-Sonden durch PCR hergestellt und mittels Dot Blot überprüft. Die dabei vermeintlich positiven Klone (Tab. 3.1) wurden in Bakterien umklontiert, selektioniert und sequenziert. Lediglich die unter Verwendung der MIC4_S4- und MIC4_S5-Sonden identifizierten Klone enthielten Teilsequenzen von Ebmic4 (Tabelle 3.1).

Die Analyse der OrientExpress™-cDNA-Bank mit der EbMIC4_S4-DNA-Sonde erbrachte 24 positive Klone von denen 10 Klone nochmals getestet, vereinzelt und analysiert wurden. Die meisten Klone enthielten Teilsequenzen von Ebmic4 von unterschiedlicher Länge. Auch die Durchmusterung der Phagenbank mit der EbMIC4_S5-DNA-Sonde ergab positive Klone. Im Anhang A (zu 3.1.3) sind die Sequenzen von drei entsprechenden Phagenklonen hinterlegt (MIC4_S4 II-1-1a-1, Mic4_S4 III-2-1a-1 und Mic4_S5 II-8-1a-1). Die Sequenz von MIC4_S4 II-1-1a- ist 1128 bp lang und kodiert für eine Proteinsequenz von 376 aa. Mit Hilfe des Programms SMART wurde ermittelt, dass die Sequenz vier EGF-Ca-Domänen sowie für zwei „low complexity regions“ beinhaltet. Der Phagenklon Mic4_S4 III-2-1a-1 hat eine Länge von 1785 bp und kodiert für 595 aa. Diese Sequenz enthält nach Analyse mit SMART acht EGF-Ca-Domänen und eine „low complexity region“. Der dritte Klon Mic4_S5 II-8-1a-1 enthielt eine 867 bp lange DNA, was 289 aa entspricht. Sie enthält nach SMART-Analyse sieben EGF-Ca-Domänen.

Im Sequenzvergleich unter Verwendung des ClustalW-Programmes (Wilbur and Lipman, 1983; Myers and Miller, 1988) zeigte sich, dass die drei Sequenzen zumindest in einigen Bereichen nicht identisch waren. Im Anhang (zu 3.1.3) befindet sich die entsprechend zusammengesetzte Sequenz.

3.1.4 Ermittlung weiterer Ebmic4-Teilabschnitte mittels „Genome Walking“

3.1.4.1 Herstellung der „Genome Walking“-Banken

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse bei der Verwendung bereits vorhandener *E. bovis*-Banken wurde eine neue genomische Bank von *E. bovis* mit Hilfe des „UniversalWalker™ Kit (BD Bioscience) hergestellt. Die synthetisierte Bank diente als Template für sich anschließende PCR-Ansätze, wie in der Abb. 3.5 beispielhaft dargestellt. Insgesamt wurden Amplifikate unterschiedlicher Längen erhalten, was auf die unterschiedlichen Positionen der Restriktionsschnittstellen zurückzuführen ist.

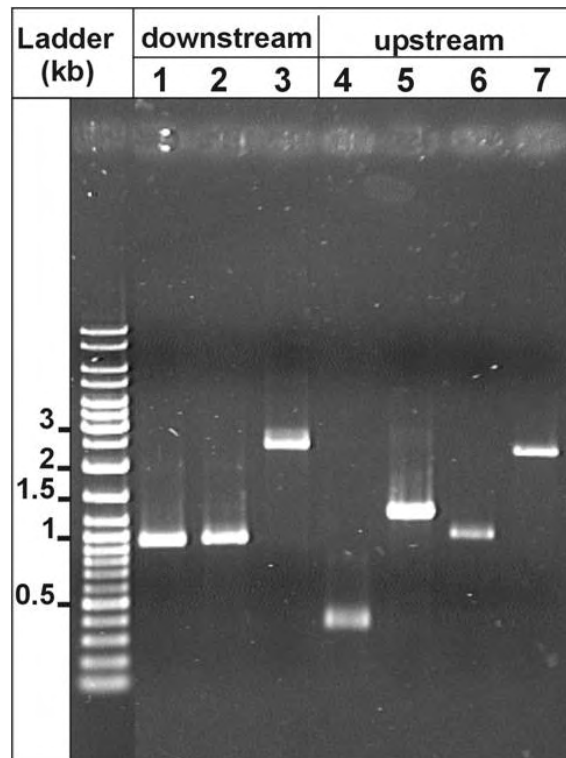


Abb. 3.5: Amplifikation von gDNA-Teilstücken aus der mit dem „UniversalWalker™ Kit“ hergestellten *E. bovis*-gDNA-Bank.

Beispielhaft dargestellt sind Amplifikate aus PCR-Reaktionen, bei denen die genomische Bank von *E. bovis* als Template diente. Verwendet wurden dabei zwei sequenzspezifische Primer, die jeweils up- und downstream der bereits bekannten Sequenz lokalisiert waren und somit zur Verlängerung der bekannten Sequenz beitragen sollten.

Ergebnis der PCR-Reaktionen waren verschieden lange Amplifikate, von denen nachfolgend die Längsten kloniert und sequenziert wurden.

Spur 1 & 4: Ergebnis der Durchmusterung der Teilbank DL1

Spur 2 & 5: Ergebnis der Durchmusterung der Teilbank DL2

Spur 3 & 6: Ergebnis der Durchmusterung der Teilbank DL3

Spur 7: Ergebnis der Durchmusterung der Teilbank DL4

3.1.4.2 Identifizierte Sequenzabschnitte von Ebmic4

Mit Hilfe dieser Technik wurden weitere Abschnitte der gDNA von Ebmic4 identifiziert. Die wichtigsten Einzelklone sind in der Tabelle 3.2 angegeben. Die zugehörigen Sequenzen befinden sich im Anhang A (zu 3.1.4). Als Vorlage für die ersten sequenzspezifischen Primer diente die Sequenz des Phagenklons MIC4_S4 II-1-1-a 1. Die abgeleiteten Primer wurden für die Amplifikation der sich anschließenden, unbekannten downstream- sowie upstream-Bereiche verwendet. Die identifizierten neuen Sequenzabschnitte dienten dann als Vorlage für neue Primer.

Die Positionen der einzelnen, neu identifizierten Sequenzen sind in Abb. 3.6 angegeben. Dabei verlängerte die Sequenz des Klons GW_2Bf#7 den kodierenden Bereich von Ebmic4 in downstream-Richtung. An diese schließt sich die Sequenz von Klon GW_V4#58 an. Zum

5'-Ende hin komplettierten die Sequenzen der Klone GW_2Br#9/3, GW_3Br#17/3, GW_3Dr#1, GW_4Dr#1, GW_1Fr#5 und GW_2Lr#1 die bereits identifizierte Sequenz. Die Sequenz vom Klon GW_2S#29 bestätigte nochmals die Sequenz des Phagenklons MIC4_S4 II-1-1-a 1, beinhaltete die Sequenz vom Klon GW_2Br#9/3 und reichte bis zum 3'-Ende vom Klon GW_4Dr#1. Insgesamt wurde eine zusammenhängende gDNA-Sequenz von 8718 bp identifiziert.

Tabelle 3.2: Über „GenomeWalking“ identifizierte Ebmic4-gDNA Klone.

Klonname	Primer	Größe (bp)	Vorlage
GW_2Bf#7	SpecPr01_for SpecPr_nested01_for	981	Phagenklon MIC4_S4 II-1-1-a 1
GW_2Br#9/3	SpecPr01_rev SpecPr_nested01_rev	1365	Phagenklon MIC4_S4 II-1-1-a 1
GW_3Br#17/3	SpecPr01_rev SpecPr_nested01_rev	995	Phagenklon MIC4_S4 II-1-1-a 1
GW_3Dr#1	SpecPr02_rev SpecPr_nested02_rev	527	GW_2/3Br
GW_4Dr#1	SpecPr02_rev SpecPr_nested02_rev	1051*	GW_2/3Br
GW_1Fr#5	SpecPr03_rev SpecPr_nested03_rev	2787	GW_4Dr#1
GW_2Lr#1	GW_EbMIC4_SpecPr04_rev GW_EbMIC4_SpecPr_nested04_rev	1084	GW_1Fr#5
GW_2S#29	GW_EbMIC4_SpecPr06_rev GW_EbMIC4_SpecPr_nested06_rev	1928	GW_2Bf#7
GW_V4#58	GW_3Terminus_3_5end	ca. 2800**	GW_2Bf#7

* angegeben die Gesamtlänge der Sequenz, die aber nur teilweise analysiert

** Sequenz im Ganzen länger, wurde nur partiell analysiert

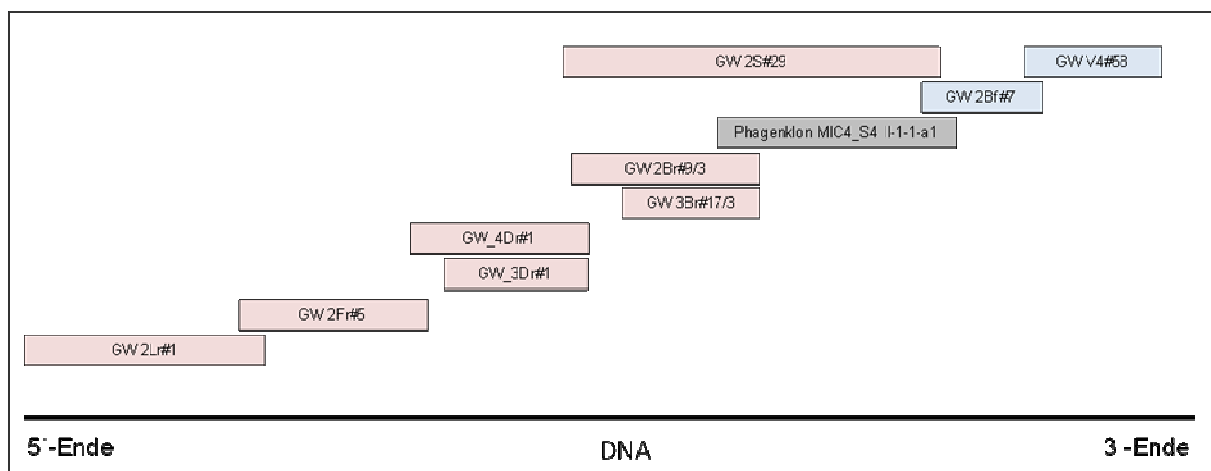


Abb. 3.6: Position der identifizierten Sequenzen der Ebmic4-Klone.

Mit Hilfe der „GenomeWalking“-gDNA Bank von *E. bovis* wurden mehrere, sich überlappenden gDNA-Sequenzen identifiziert, die eine Gesamtlänge von ca. 8700 bp ausmachten. Hier sind die Klone und ihre Positionen zueinander schematisch dargestellt (nicht maßstabsgetreu).

Nachfolgende, unterschiedliche Ansätze zur Vervollständigung der Ebmic4-Sequenz zum 5'-Ende schlugen fehl. Trotz unterschiedlichster Primerkombinationen und Variation der PCR-Bedingungen war es nicht möglich, weiteren Amplifikate zu erhalten, die zusätzliche Bereiche von Ebmic4 beinhalteten.

3.1.5 *In silico*-Analyse der bisher identifizierten Sequenz von Ebmic4

Mit Hilfe des Computerprogramms SoftBerry (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) wurde die erhaltene Ebmic4-Gesamtsequenz auf Grundlage des *Plasmodium falciparum*-Genoms auf Introns und Exons untersucht. Im Vergleich mit den bekannten Sequenzen von EtMIC4 und EmTSP250 konnte die in Abb. 3.7 dargestellte Intron-Exon-Struktur ermittelt werden. Insgesamt ist danach die kodierende Sequenz auf sieben Exons verteilt, die durch kleine Introns unterbrochen sind. Das Ende des 7. Exons ist auch gleichzeitig das Ende der kodierenden Sequenz, an die sich die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) anschließt. Am 5'-Ende der Sequenz befindet sich ein sehr großes Intron, was letztendlich wohl die vollständige Identifizierung des Ebmic4-5'-Endes unmöglich machte.

Diese Strukturidentifizierung diente als Grundlage der sich anschließenden RT'-PCR, mittels derer die tatsächlich kodierende Sequenz von Ebmic4 ermittelt werden sollte (Kapitel 3.1.7).

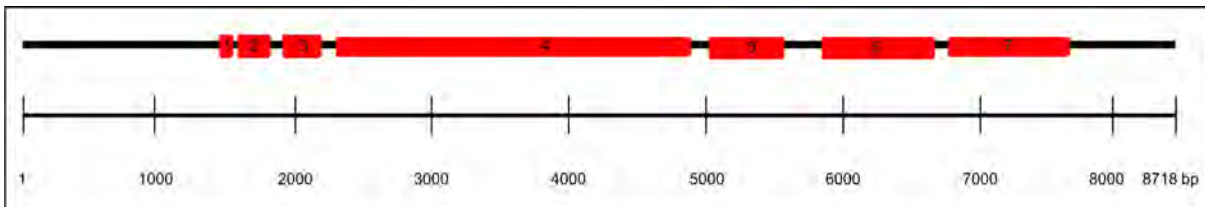


Abb. 3.7: Theoretisch berechnete Intron-Exon Struktur der EbMIC4-Sequenz.

Mit Hilfe des Programms SoftBerry wurde auf Grundlage des Genoms von *Plasmodium falciparum* die Exon-Intron-Verteilung analysiert. Dabei wurden 7 Exons ermittelt, die durch sechs kleine Introns unterbrochen werden. Am 5'-Ende der Sequenz befindet sich ein weiteres Intron.

3.1.6 Identifizierung der kodierenden Sequenz von Ebmic4 über RT'-PCR

Zur Verifizierung, der bis dahin theoretisch ermittelten kodierenden Sequenz von Ebmic4 wurde die kodierenden Sequenzbereiche mittels RT'-PCR nochmals amplifiziert, kloniert und sequenziert. Dafür wurden als Templates entweder Total-RNA aus *E. bovis*-Merozoiten oder Total-RNA aus *E. bovis*-infizierten, eukaryotischen Wirtszellen (BUVEC) verwendet. Als Primer kamen sequenzspezifische Oligonukleotide zum Einsatz, die an definierten Stellen der kodierenden Ebmic4-Sequenz banden (siehe Abb. 3.9) und überlappende Amplifikate generierten. In Tabelle 3.3 sind die klonierten und sequenzierten Einzelklone angegeben. Die zugehörigen Sequenzen befinden sich im Anhang A (unter: zu 3.1.6). Insgesamt wurden

für die Identifizierung der kodierenden Sequenz sieben RT'-PCR-Amplifikate kloniert und sequenziert. Nach Zusammenfügen der Einzelsequenzen wurde eine Sequenz von 5484 bp identifiziert, die der mRNA-Sequenz von Ebmic4 entspricht (Sequenz im Anhang A, unter: zu 3.1.6).



Abb. 3.9: Positionen der in der RT'-PCR Reaktion verwendeten Primer (schematisch).

Die Reverse Transkriptase Reaktion (siehe 2.8.4) wurde mit einer Temperatur von 53°C für 1 h durchgeführt. Das Reaktionsprofil der PCR siehe Tabelle mit einer Annealing-Temperatur von 54°C und 35 Zyklen. Nummerierung der verwendeten Primer siehe Tabelle 3.3 (F-„forward“-Primer, R-„reverse“-Primer).

Tabelle 3.3: Einzelklone nach RT'-PCR, ihre Größe und die für die Amplifikation verwendeten Primer.

Klonname	Größe (bp)	Primer	Primer-Position Abb. 3.9
EbMIC4-RT-PCR 3-11-17	1196 bp	EbMIC4_RT-PCR3'end_rev (R1) MIC4_S1_seq_f (F5)	R1 & F5
EbMIC4_RT-PCR 3-1	1311 bp	EbMIC4_S1_seq_rev (R2) SpecPr02revcomp_for (F4)	R2 & F4
EbMIC4_RT-PCR 4-1	2383 bp	EbMIC4_S1_seq_rev (R2) SpecPr03revcomp_for (F3)	R2 & F3
EbMIC4_RT-PCR 5-1	1100 bp	EbMIC4_SpecPr02rev (R3) SpecPr03revcomp_for (F3)	R3 & F3
EbMIC4_RT-PCR 6-3	1886 bp	EbMIC4_SpecPr02rev (R3) RT-PCR01_5end (F3)	R3 & F2
EbMIC4_RT-PCR 7-1	*	EbMIC4_SpecPr03rev (R4) RT-PCR01_5end (F2)	R4 & F2
EbMIC4_RT-PCR 8-3	2135 bp	PCR01_5end (R4) SpecPr04revcomp_for (F1)	R4 & F1

*Sequenz nur tlw. sequenziert und nicht aufgeführt, da Sequenz durch andere Klone abgedeckt wird. Angegeben sind die identifizierten Teilsequenzen von Ebmic4 mit Klonnamen, Größe und verwendeten Primer. Die Position der verwendeten Primer kann in Abb. 3.9 eingesehen werden.

3.2 *In silico*-Analyse der Ebmic4-DNA-Sequenz

Im Kapitel 3.1.5 wurde die theoretisch ermittelte Exon-Intron-Struktur angegeben, die nun mit der tatsächlichen Exon-Intron-Verteilung, die sich aus der neu erhaltenen kodierenden Sequenz ergab, abgeglichen werden konnte. Dafür wurde die bekannte gDNA-Sequenz mit der kodierenden Sequenz von Ebmic4 (Kapitel 3.1.7) im Alignmentprogramm ClustalW analysiert. Es zeigte sich eine leicht abweichende, tatsächliche Verteilung der Exons und Introns verglichen mit der ursprünglich angenommenen (Abb. 3.10). Insgesamt ist die bisher bekannte kodierende Sequenz auf 8 Exons verteilt, wobei das 8. Exon gleichzeitig das 3'-Ende der kodierenden Sequenz darstellt.

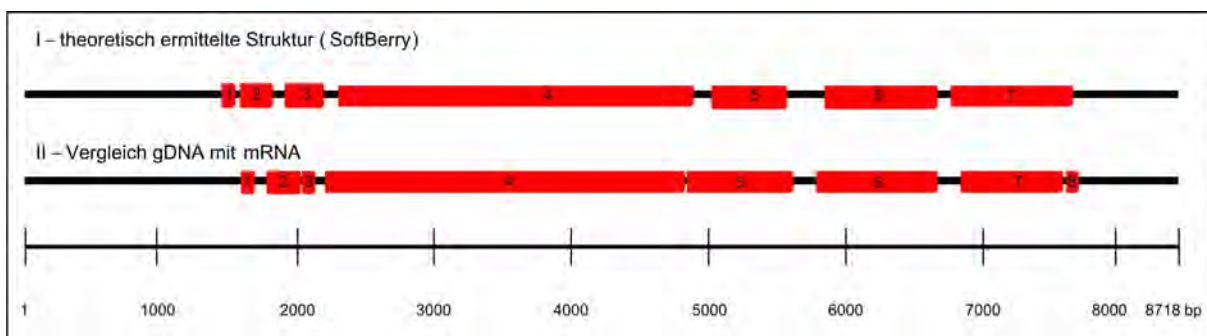


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Verteilung in der Ebmic4-Sequenz.

Verglichen wurden die theoretisch ermittelte Exon-Intron-Verteilung (SoftBerry) mit der tatsächlichen Verteilung, ermittelt durch den Vergleich der gDNA-Sequenz mit der kodierenden Sequenz von Ebmic4.

Daran schließt sich der 3'-gelegenen nicht-kodierende Bereich (3'UTR) an (Abb. 3.11), der seine Bedeutung in der posttranslationalen Modifikation der prä-mRNA besitzt. In der 3'-UTR, ca. 515 bp entfernt vom Stoppcodon gelegen, wurde das von Mazumder et. al. (2003) beschriebene Poly-Adenylierungssignals (AAUAAAA) identifiziert.

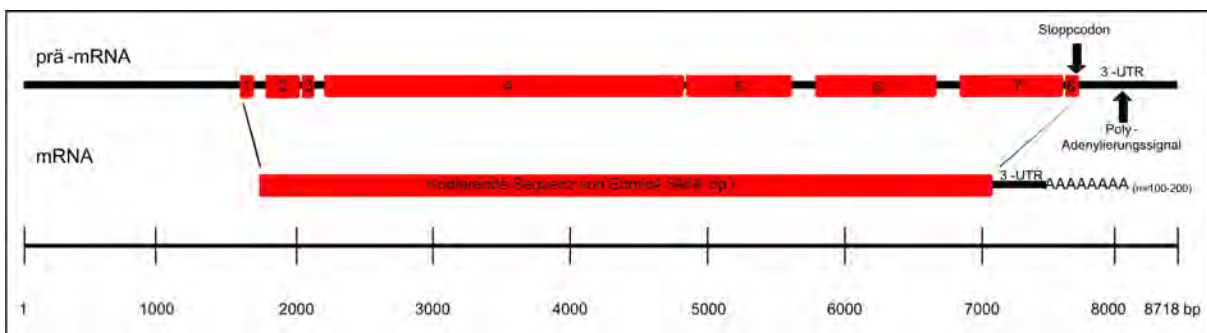


Abb. 3.11: Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifikation der prä-mRNA zur reifen mRNA der Ebmic4-Sequenz.

Neben der Prozessierung konnte die Modifikation des 3'-Endes identifiziert werden. Dabei wurde das Poly-Adenylierungssignal identifiziert (Mazumder et. al., 2003), das Initialsignal zum Anhängen des Poly(A)-Schwanzes.

3.3 *In silico*-Analyse der EbMIC4-Proteinsequenz

3.3.1 Allgemeine Charakterisierung von EbMIC4

Mit Hilfe unterschiedlichster Computerprogramme wurde eine Charakterisierung von EbMIC4 angestrebt. Auf diese Weise wurde aus der bekannten kodierenden Sequenz (siehe 3.1.7) die Aminosäuresequenz mit der höchsten Homologie zu EtMIC4 und EmTSP250 abgeleitet (siehe Anhang 3.1.7.2). Sie umfasst 1827 aa mit einem theoretisch ermittelten Molekulargewicht von 191,45 kDa. Der theoretisch ermittelte isoelektrische Punkt des Proteins befindet sich bei einem pH-Wert von 4,14. Fast ein Drittel der Aminosäuren (27%) wird von den kurzkettigen Aminosäuren Glycin, Alanin und Serin abgedeckt, gefolgt von negativ geladenen Aminosäuren (18%). Glutaminsäure (10%) und Asparaginsäure (7,5%) machen zusammen insgesamt 320 negativ geladene Aminosäurereste aus, die 171 positiv geladenen Resten (Arginin und Lysin) gegenübergestellt sind. Insgesamt erklärt sich so der niedrige Wert für den isoelektrische Punkt des Gesamtproteins. Die insgesamt am häufigsten vertretenen Aminosäuren sind Glycin (13%), Cystein (12%) und Glutaminsäure (10%).

Mit Hilfe dreier Programme (TMHMM 2.0, TMAP und Tmpred) wurde die Proteinsequenz auf Transmembrandomänen untersucht. Dabei zeigte sich über die Programme TMAP (Persson and Argos, 1994; Persson and Argos, 1996) und Tmpred (Hofmann and Stoffel, 1993) eine kleine Transmembrandomäne von 24-29 aa am C-terminalen Ende von EbMIC4 (Abb. 3.12).

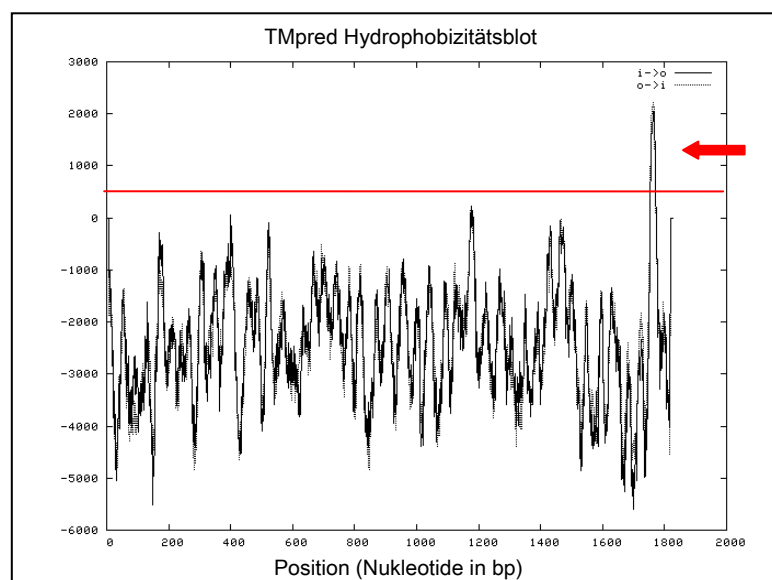


Abb. 3.12: Hydrophobizitätsplot von EbMIC4 (nach Tmpred).

Dargestellt sind die Wahrscheinlichkeit (Schwellenwert 500) und die Position vorhandener Transmembrandomänen sowie die daraus resultierende Orientierung des Proteins. EbMIC4 ist somit ein Transmembranprotein mit einer kleinen Transmembrandomäne (Pfeil) am C-terminalen Ende.

Somit handelt es sich bei EbMIC4 um ein Transmembranprotein mit einer kleinen Transmembrandomäne und einem im Zytosol befindlichen, 51 aa langen C-Terminus. Der Extrazellulärbereich macht insgesamt mehr als 95% des Gesamtproteins aus. Die Transmembrandomäne beinhaltet vor allem hydrophobe Aminosäuren (68%) und Glycin (28%) und ist ebenfalls in einer „low complexity region“ eingebettet.

Weiterhin wurde mit Hilfe des Computerprogrammes SMART (Schultz et. al., 1998; Ponting et. al., 1999; Letunic et. al., 2006) die Aminosäuresequenz von EbMIC4 hinsichtlich vorhandener Domänen und deren Position analysiert. Die Abb. 3.13, 3.14 und die Tabelle 3.4 zeigen die Positionen der einzelnen vorhergesagten Domänen. Es zeigte sich, dass der Extrazellulärbereich von EbMIC4 relativ viele Domänen enthält, die das Protein insgesamt in drei Teilbereiche teilen. Ein Teilbereich umfasst 31 EGF-ähnliche Domänen (Epidermal growth factor), davon 8 EGF-Domänen (Epidermal growth factor-like domain), 22 EGF_Ca Domänen (Calcium-binding EGF-like domain) und eine EGF-like-Domäne (EGF domain, unclassified subfamily). Weiterhin sind zwei Bereiche mit TSP1-Domänen (Thrombospondin type 1 repeats) erkennbar. Damit gehört EbMIC4 zur Familie der sog. TRAP-Proteine (thrombospondin-related anonymous protein). Weiterhin befinden sich am C-terminalen Ende von EbMIC4 vier sogenannte „low complexity regions“. Dies sind Sequenzbereiche, die aus einer geringen Zahl unterschiedlicher Aminosäuren bestehen. Bei EbMIC4 befinden sie sich am C-terminalen Ende und umfassen Bereiche des zytoplasmatischen Endes, der Transmembrandomäne sowie der extrazellulären Sequenz.

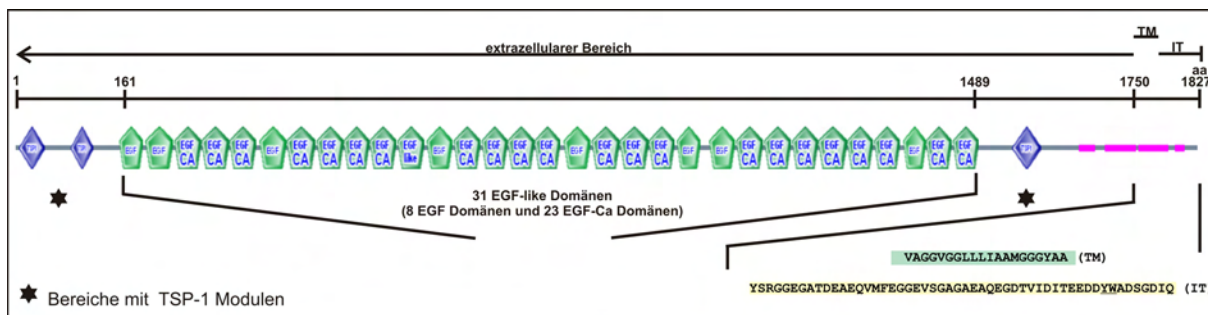


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Lokalisation der funktionellen Domänen der bisher identifizierten Sequenz von EbMIC4 (SMART).

Dargestellt ist die Verteilung der funktionellen Domänen und der „low complexity regions“ (pink, fett) innerhalb der EbMIC4-Sequenz. Weiterhin wurde die Transmembrandomäne, der zytoplasmatische Teil, sowie der Extrazellulärbereich gekennzeichnet.

Legende: TM-Transmembrandomäne, IT-intrazellulärer Bereich von EbMIC4

Neben den mit dem Programm SMART vorhergesagten TSP1-Domänen wurden aufgrund von Sequenzvergleichen mit EtMIC4 und EmTSP250 weitere Bereiche identifiziert, in denen

degradierte TSP1-Domänen vorkommen könnten. So steigt die Zahl der möglichen, identifizierten TSP1-Domänen auf insgesamt sieben (Abb. 3.14).

1	DVSC	HGTWTPWTACSNDTGLQERHNTKCETWVEVQECK	KKSE	CGEFSPWTPGKAACVNGQ
61	VQTRVRDSCPEVQEIKICKPPPPQC	MDDWTDWTNCQGTQTQERHNASCLQTEVRECNLTA		
121	E	EVEKCGPFTEWAPPLTENCIPGDEHRRWRVSCPDRKEVR	ICGAFECNQCSSNATCDFIA	
181	GQCTCKPGFRGDGKTCE	AFDPCSETPAPCDTNATCAADGSTPKCKCKSGWNADDKAGASN		
241	YPCVELDECAANTHKCPAHSDCQNTPGSYMCNCRNGWQKTSRSCEDVDECARGDHGCPA			
301	NSTCVNTVGSFECQCNEGYRGGGTDESPCMNVNECENPNACSAHATCTDSPGSYTCSCPE			
361	GYSGEGTHKSPC	SKIDYCANSALNNCVHSCVNTLTTFKCVCDAGYAGLGTHENPCVDI		
421	DECSSDRPANDCHRDACETNTDGSYTCCKPGFTGDGVGAGGCTDVDECAQSPCHAKATC			
481	TNTKGSYCTCTCIEGYVDASNDGRECRDVDECENGLAVCHASAQCLNTVGSYECKCLDDFV			
541	GDGKVCNDVDECSANESPCGLNAECHNTIGSYECACKDGYGGGLDSNKSCSDVNECADPGL			
601	KVPENCQCANTEGSYKWEPKLGYELVGNSECR	KIDYCSLGPCNSLADCKENPEGTKAICT		
661	CKVGYAGDGSAGSVCADINECEGNNTCAAPGDGGICENTVGSYVCKCAAGYQGDGSACSD			
721	IDECATNAHNCHPSATCTNTAGSYRCTCNNGFSGDGVCEVDIDECSTNADDCGNTECSN			
781	TIGSFECVCRTGYSRQDAKNCVDIDECSDGHTCSSFATCSNTDGSYRCQCKAGYEGDGH			
841	KCE	DIDFCGDGRHDCNVKAECAESADNSTFKCTCAPGYTGDGHGPEGCKDIDECAGGNVC		
901	GENTICTNTSGSFECACKDGFAGSKEGDELTCVDVDECGDTSRNTCASAADGGSCENTVG			
961	SYKCSCLLGYEGDGHNCTDIDECATKSPCGDNTRCENTPGSFVCSCMDGYERETELSCRD			
1021	ID	ECENNTCMVPAHGICENTDGSCTFHCAPGYRHVEGSCV	KIDHCKETKWI	DHCKETKCI
1081	VHATCHENDAGTEAICTCGSGYEGNGKGEDGCKNIDECVAGNPCE	SFGAGGYCEDTEGSF		
1141	VCECKTGFKLHSTCSDLNECLHAKLNKCSGVGGLCTNTVGSYTCGCSEGYSGDGYECTD			
1201	VDECLTGKHNCGPHSTCVNTDGSFKCSCNEGFSGDITCEDIDECADDSLNTCDTHKGVC			
1261	KNTAGSYSCGCKPGFDLSSDGTFCENVDECAAGTAKCDEKSFCVDSQGSYTCECKNGYRQ			
1321	SGDGCVDVDECDSGVDDCHEHAVCKNTDGSFTCECAEGYQGDGRMCE	KTVG	PCDSNPCGD	
1381	KADCEVLGNSYTCTGHKGYEMADGRCADIDECTAGTHNCDAHAVCTNTSGSYTCTCGKGY			
1441	TGFGESQCQDVDECVGNAAGCDIHAVCTNLPGSFSCACKSGFEGNGYECV	EKPVVPGQIFC		
1501	ESWTAWSKCDGTTTESKRHCIVLSTKTETRECP	GKEKTD	CGEFGWSSCPGSVNNMSHRQ	
1561	RERFGEAGCENAE	LVRECPDAEME	EECGDFGNWSDCGVPSAGLSRARDRCPDQVEFEEC	
1621	STEGGGAQLGGPGVEGPTGESAK	PGAPGVGGEQAEAPGVEGEEPAGPE	KQPEHPEGPGGA	
1681	AEL	PEAPGPTPEHPEGPGVETEEPEEPGSEGAQPQAPGAE	EAGTPGAGAE	LPKGPGEAE
1741	ESEEKEEGAGFPVAAVAGGVGGLLLIAAMGGGYAA	YSRGGEATDEAEQVMF	EGGEVSGA	
1801	GAEAQEG	DTVIDITEEDDYWADSGDIQ		

Abb. 3.14: Schematische Darstellung der bisher identifizierten Aminosäuresequenz von EbMIC4 mit Angabe der Positionen der identifizierten Domänen.

Die unterschiedliche Farbgebung zeigt die verschiedenen Domänen an: TSP1-Domänen, degradierte TSP1-Domänen, EGF-like-Domänen, „low complexity region“.

Unterstrichen wurde die Transmembrandomäne (doppelt) und die konservierten Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan (einfach) im zytoplasmatischen Teilbereich von EbMIC4.

Tabelle 3.4: Vorhergesagte Domänen und „low complexity regions“ von EbMIC4 mit Angabe der Aminosäurepositionen und Wahrscheinlichkeit (E-value).

Domäne	Start	Ende	E-value	Sequenz
TSP1	5	44	3.94e-01	HGTWTPWTACSNDTGLQERHNTKCETWVEVQECKKKSECG
TSP1	86	121	7.78e+00	MDDWTDWTNCQGTQKQERHNASCLQTEVRECNLTA
EGF	161	197	3.23e+00	ICGAFEQNCSSNATCDFIAGQCTCKPGFRGDGKTCE
EGF	201	244	1.20e+01	PCSETPAPCDTNATCAADGSTPKCKCKSGWNADDKAGASNYPCV
EGF_CA	245	286	1.48e-08	ELDECAANTHKCPAHSDCQNTPGSYMCNCRNGWQKTSRSC
EGF_CA	287	330	1.20e-08	DVDECARGDHGCPANSTCVNTVGSFECQCNQGYRGGGTDESPCM
EGF_CA	331	373	3.45e-09	NVNECENPNACSAHATCTDSPGSYTCSCPEGYSGEETHKSPCS
EGF	377	418	7.02e-01	YCANSALNNCGVHSCVNTLTTFKCVCDAGYAGLGTHENPCV
EGF_CA	419	464	7.51e-10	DIDECSSDRPANCDHRDAECTNTDGSYTCCKKPGFTGDGVGAGGCT
EGF_CA	465	506	1.88e-10	DVDECAQSPCHAKATCTNTKGSYTCCTIEGYVDASNDGRECR
EGF_CA	507	547	2.13e-09	DVDECENGLAVCHASAQCLNTVGSYECKLDDFVGDKVCN
EGF_CA	548	590	2.16e-10	DVDECSANESPCGLNAECHNTIGSYECACKDGYGGDLSNKS
EGF_like	591	632	5.75e-01	DVNECADPGLKVPENCQCANTEGSYKWEPLGYELVGNSECR
EGF	636	676	9.13e+00	YCSLGPNCNLADCKENPEGTKAICTCKVGYAGDGSAGS
EGF_CA	677	719	1.56e-07	DINECEGNNTCAAPGDGGICENTVGSYVCKCAAGYQGDGSACS
EGF_CA	720	760	1.24e-10	DIDECATNAHNCHPSATCTNTAGSYRCTCNGGSGDGV
EGF_CA	761	802	2.85e-10	DIDECSTNADDCGNTECSNTIGSFECVCRTGYSRQDAKNCV
EGF_CA	803	843	6.64e-11	DIDECSDGHTCSSFATCSNTDGSYRCQCKAGYEGDGHKCE
EGF	847	889	9.13e+00	FCGDGRHDCNVKAECASADNSTFKCTCAPGYTGDGHGPEGCK
EGF_CA	890	933	4.88e-09	DIDECAGGNVCGENTICTNTSGSFECACKDGFAGSKEGDELTCV
EGF_CA	934	978	3.01e-09	DVDECGDTSRNTCASAADGGSCENTVGSYKCSCLLYEGDGHNCT
EGF_CA	979	1019	3.81e-11	DIDECATKSPCGDNTRCENTPGSFVCSMDGYERETELSCR
EGF	1023	1060	1.04e+01	ECENNTCMVPAHGICENTDGSCTFHCAPGYRHVEGSCV
EGF	1073	1113	8.52e+00	HCKETKCIHVATCHENDAGTEAICTCGSGYEGNGKGEDGCK
EGF_CA	1114	1156	1.17e-06	NIDECVAGNPCEFSGAGGYCEDTEGSFVCECKTFVKLHSTCS
EGF_CA	1157	1199	5.92e-08	DLNECLHAKLNKCSGVGGLCTNTVGSYTCGCSEGYSGDGYECT
EGF_CA	1200	1240	2.35e-11	DVDECLTGKHNCGPHSTCVNTDGSFCKSCNEGFSGDGITCE
EGF_CA	1241	1285	2.80e-09	DIDECADDSLNTCDTHKGVCNTAGSYSCGCKPGFDLSSDGFTCE
EGF_CA	1286	1326	5.44e-07	NVDECAAGTAKCDEKSFVDSQGSYTCCKNGYRQSGDGC
EGF_CA	1327	1367	6.64e-11	DVDECDSGVDDCHEHAVCKNTDGSFTCEAEGYQGDGRMCE
EGF	1372	1407	2.29e+01	PCDSNPCGDKADCEVLGNSYTCCTGHKGYEMADGRCA
EGF_CA	1408	1448	7.51e-10	DIDECTAGTHNCDAHAVCTNTSGSYTCCTCGKGYTGFGESCQ
EGF_CA	1449	1489	1.50e-09	DVDECVGNAAGCDIHAVCTNLPGSFSCACKSGFEGNGYECV
TSP1	1540	1584	1.30e+00	CGEFGWSSCPGSVNNMSHRQRERFGEAGCENAEVRECPDAEME
low complexity	1644	1668	-	PGAPGVGGEQAEAPGVEGEEEPAGPE
low complexity	1684	1732	-	PEAPGPTPEHPEPGVETEEPEEPGSEGAQPAPGAEAGTPGAGAE
low complexity	1736	1783	-	GEAEAESEEKEEGAGFPVAAGVGGGLLLIAAMGGGYAAYS
low complexity	1793	1807	-	EGGEVSGAGAEAEQEG

3.3.2 Der C-Terminus von EbMIC4

Der C-Terminus von EbMIC4 beinhaltet die Transmembrandomäne und eine kurze im Zytosol befindliche Region. Dieser Bereich ist allgemein bei den Proteinen der TRAP-Familie der Apikomplexa hochkonserviert (Abb. 3.15). Der zytoplasmatische Teilbereich, bestehend aus 52 aa, ist durch einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren (~31%) und Glycin (~17%) charakterisiert, die sich in zwei „low complexity regions“ wiederfinden. Weiterhin finden sich in der kurzen Sequenz zwei konservierte Tyrosinreste. Sie befinden sich zum einem am Übergang zur Transmembrandomäne sowie fast am C-terminalen Ende der Sequenz angrenzend zu einem ebenso hoch konservierten Tryptophanrest (Abb. 3.15, fett).

EbMIC4	<u>FPVAAVAGG-VGGLLLIAAMGGGYAA</u> Y SRGGEG-ATDEAEQVMFEGGEVSGAGAEAEQEGDTVIDITEEDD YW ADSGDIQ
EmTSP250	--- <u>AAVAGGVGG-VLLIAAVGGGVAA</u> F TSGGGGAGAEQVEFEGEDTGAATAETPEADTVIDITDEDD YW ADSGDIQ
EtMIC4	--- <u>AAVAGGVGG-VLLIAAVGGGVAA</u> A YSGGGGGGGAEEAEQVEFEGEESGGASAETPEADTVIDITDEDD YW ADSGDIQ
EtMIC1	--- <u>AAVAGGVAGGVLAIAAGAGAF</u> Y GLSGGSAAAATEAGAEVMTEA---GTSNAAEVEKESLISAGEQSEM- WA -----
Em100	--- <u>AAVAGGVAGGVLAIAAGAGAF</u> Y GLSGGAASAAGGAAAEVMVES---GTANPPEVEKESLITAGEQSEM- WAS -----
CpTRAP	--- <u>LAIAVGLPVGILGLCI</u> I AGSL F LIGGR--SGDQEEDETNYQYFBQSSATLDQDSEYVQEIGPESQN- WAS -----
PfTRAP	----- <u>AGGIAGGLALLACAGLA</u> Y KFVVPGA--ATPYAGEPAPFDETLGEEDKDLDEPEQFRLPEENE--- WN -----
PbTRAP	-- <u>GYKIAAGGIIGGLAII</u> G CIGV G Y N FIAGSS--AAAMAGEAAPFEDVMADDEKGIVENEQFKLPEDND--- WN -----
NcTRAP	<u>VPVAAIAGGIVGGLILLGAAGGA</u> Y Y Y FGGG-KANESLAEMDFDVGATKVMEEKETLVPVDDSDM WM GADH--

Abb. 3.15: Alignment des C-terminalen Endes (Transmembrandomäne und zytoplasmatische Region) von EbMIC4 im Vergleich mit anderen Proteinen der TRAP-Proteinfamilie der Apikomplexa (letzte modifiziert nach Witcombe et. al., 2003).

Gekennzeichnet sind die wahrscheinlichen Transmembrandomänen (unterstrichen) und die konservierten Tyrosin- und Tryptophanreste (rot, fett). Die verwendeten Sequenzen stammen von folgenden Organismen: *Eimeria bovis* (EbMIC4), *Eimeria maxima* (EmTSP250, Em100), *Eimeria tenella* (EtMIC4, EtMIC1), *Cryptosporidium parvum* (CpTRAP), *Plasmodium falciparum* (PfTRAP), *Plasmodium berghei* (PbTRAP) und *Neospora caninum* (NcTRAP).

Die Suche nach posttranslationalen Modifikationen, z. B. über mögliche Phosphorylierungsstellen an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin mit dem Programm NetPhos 2.0 (Blom et. al., 1999), ergab nur für einen hoch konservierten Tyrosinrest (Tyr₁₈₁₉) eine mögliche Phosphorylierung (Tabelle 3.5, Abb. 3.16).

Tabelle 3.5: Potentielle Phosphorylierungsstellen im zytoplasmatischen Bereich der EbMIC4-Sequenz.

Aminosäure	Potential (>0,5)	Phosphorylierung
Tyr ₁₈₁₉	0.985	*Y*

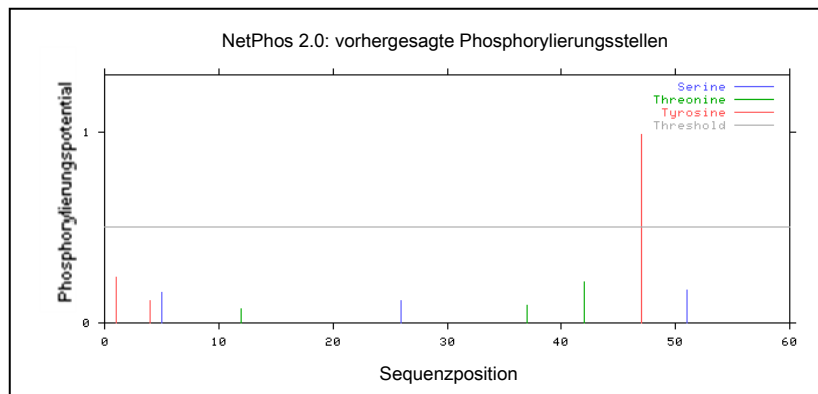


Abb. 3.16: Vorhergesagte Phosphorylierungsstellen in der zytoplasmatischen Sequenz von EbMIC4.

Mit dem Programm NetPhos 2.0 wurde die Sequenz (52 aa) auf Phosphorylierungsstellen untersucht. Dabei lag der Schwellenwert für eine positive Bewertung bei 0,5.

3.3.3 Extrazellulärer Bereich von EbMIC4

Der dominante Extrazellulärbereich von EbMIC4 ist nicht nur gekennzeichnet durch die schon benannten Domänen, sondern stellt auch einen potentiellen Ort für Glykosylierungen dar. Mit Hilfe des Programms YinOYang 1.2 (Gupta, 2001; Gupta and S.Brunak, 2002) könnten mögliche O-Glykosylierungsstellen an Serin- und Threoninresten identifiziert werden (Tabelle 3.6, Abb. 3.17). So wurden potentielle O-Glykosylierungsstellen an 2 Serinresten und vier Threoninresten identifiziert, die sich überwiegend im N-terminalen Bereich von EbMIC4 befinden. Der eine Serinrest befindet sich außerhalb der Domänen, die anderen Aminosäurereste sind Bestandteile der EGF- oder EGF-Ca-Domänen.

Tabelle 3.6: Potentielle O-Glykosylierungsstellen im Extrazellulärbereich der EbMIC4-Sequenz.

Position	Potential (>0,5)	O-GlcNAc
3 S	0.5401	+
211 T	0.5200	+
280 T	0.5437	+
303 T	0.5509	+
348 T	0.5379	+
1429 S	0.5472	+

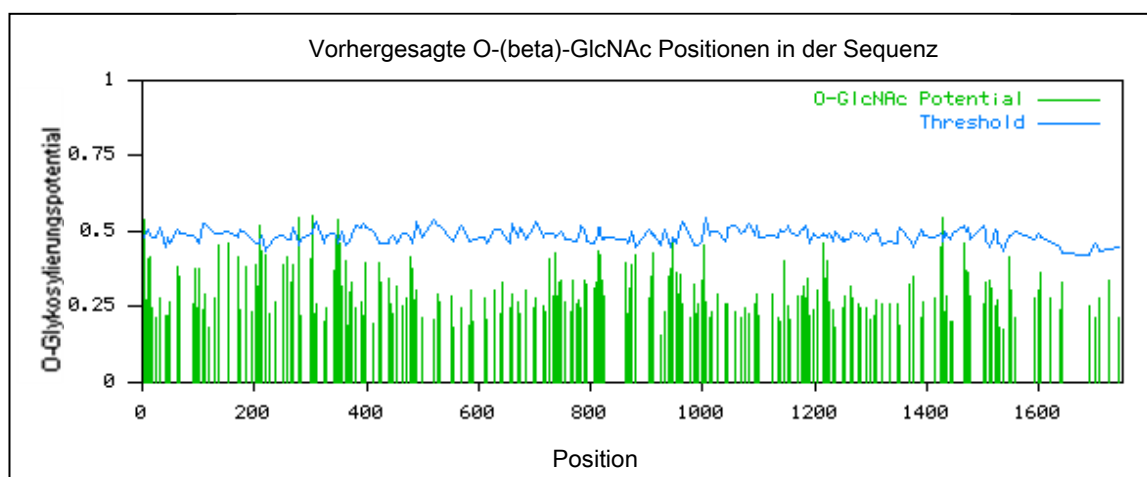


Abb. 3.17: Vorhergesagte O-Glykosylierungsstellen in der EbMIC4-Sequenz.

Mit dem Programm YinOYang 1.2 wurde die Sequenz des Extrazellulärbereichs von EbMIC4 auf mögliche Glykosylierungsstellen an Serin- und Threoninresten untersucht. Dabei lag der Schwellenwert für eine positive Bewertung bei 0,5.

Mit dem Programm NetNGlyc 1.0 (Gupta et. al., 2004) wurde die Sequenz auf potentielle N-Glykosylierungsstellen am Asparaginrest untersucht (Tabelle 3.7, Abb. 3.18). Insgesamt wurden 17 Asn-Xaa-Ser/Thr-Erkennungssequenzen identifiziert, von denen 11 potentiell für N-Glykosylierungen am Asparaginrest geeignet wären.

Tabelle 3.7: Potentielle N-Glykosylierungsstellen im Extrazellulärbereich der EbMIC4-Sequenz.

Position	Potential (>0,5)	N-Glyc
16 NDTG	0.6230	+
105 NASC	0.6258	+
117 NLTA	0.6910	+
173 NATC	0.5294	+
212 NATC	0.5329	+
301 NSTC	0.5549	+
586 NKSC	0.6339	+
867 NSTF	0.5779	+
908 NTSG	0.6198	+
976 NCTD	0.6590	+
1026 NNTC	0.5088	+

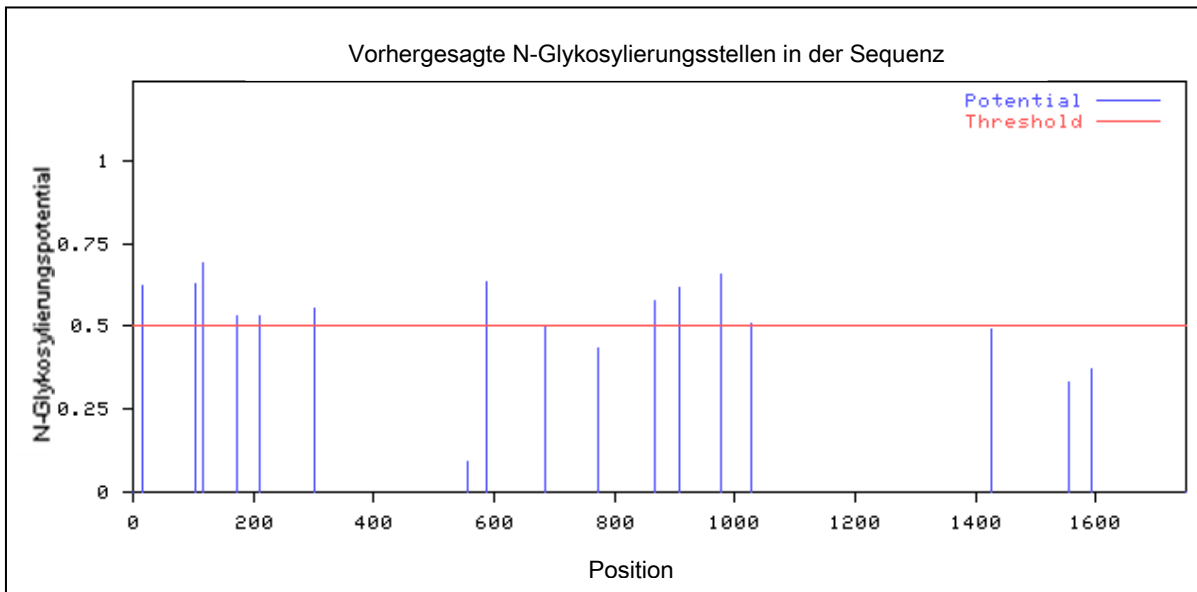


Abb. 3.18: Vorhergesagte N-Glykosylierungsstellen im Extrazellulärbereich der EbMIC4-Sequenz.

Mit dem Programm NetNGlyc 1.0 wurde der Extrazellulärbereich der EbMIC4-Sequenz nach möglichen N-Glykosylierungsstellen untersucht. Dabei lag der Schwellenwert für eine positive Bewertung bei 0,5.

3.3.4 Homologievergleiche

Mit dem Programm BlastP 2.2.18 (Altschul et. al., 1997) wurde nach homologen Sequenzen zur EbMIC4-Sequenz gesucht. Die mit Abstand höchste Homologie besitzt EbMIC4 zu den Proteinen EtMIC4 (e-Wert: 0,0, Ähnlichkeit 76%, Identität 64%) und EmTSP250 (e-Wert: 0,0, Ähnlichkeit 74%, Identität 61%). Außerhalb der Apicomplexa besteht ebenfalls eine hohe Homologie zur Proteingruppe der Fibrilline, die in unterschiedlichsten Organismen zu finden sind (e-Werte zwischen $1e^{-133}$ - $7e^{-120}$). In Abb. 3.19 sind diese Befunde in Form eines phylogenetischen Baumdiagramms dargestellt, bei dem die Sequenzunterschiede als Abständen zueinander ausgedrückt wurden.

Mit Hilfe des Programmes SMART wurden die Domänenstruktur von EbMIC4 (Abb. 3.20) und mit dem Programm MultiAlign 5.4.1 (Corpet, 1988) die Proteinsequenz von EbMIC4 mit den in NCBI hinterlegten Proteinsequenzen von EtMIC4 und EmTSP250 verglichen (Abb. 3.21). Allerdings liegt die Sequenz von EtMIC4 nur unvollständig vor, da die N-terminale Sequenz nicht bekannt ist. Erkennbar ist eine hohe Übereinstimmung der Sequenzen im Bereich der EGF-like-Domänen (Abb. 3.21, Positionen 180-1700) und im C-terminalen Bereich (Abb. 3.21, Positionen 2380-2480). Die größten Unterschiede befinden sich in den Bereichen mit den TSP1-Domänen (Abb. 3.21, Positionen 1-180 und 1700-2380), wobei im N-terminalen Bereich noch konservierte Sequenzbereiche vorhanden sind, die den

TSP1-Domänen zugeordnet werden können. Der C-terminale Bereich, der bei EtMIC4 und EmTSP250 eine Aneinanderreihung von TSP1-Domänen beinhaltet, ist bei EbMIC4 aufgrund der geringeren Anzahl der Domänen deutlich kürzer.

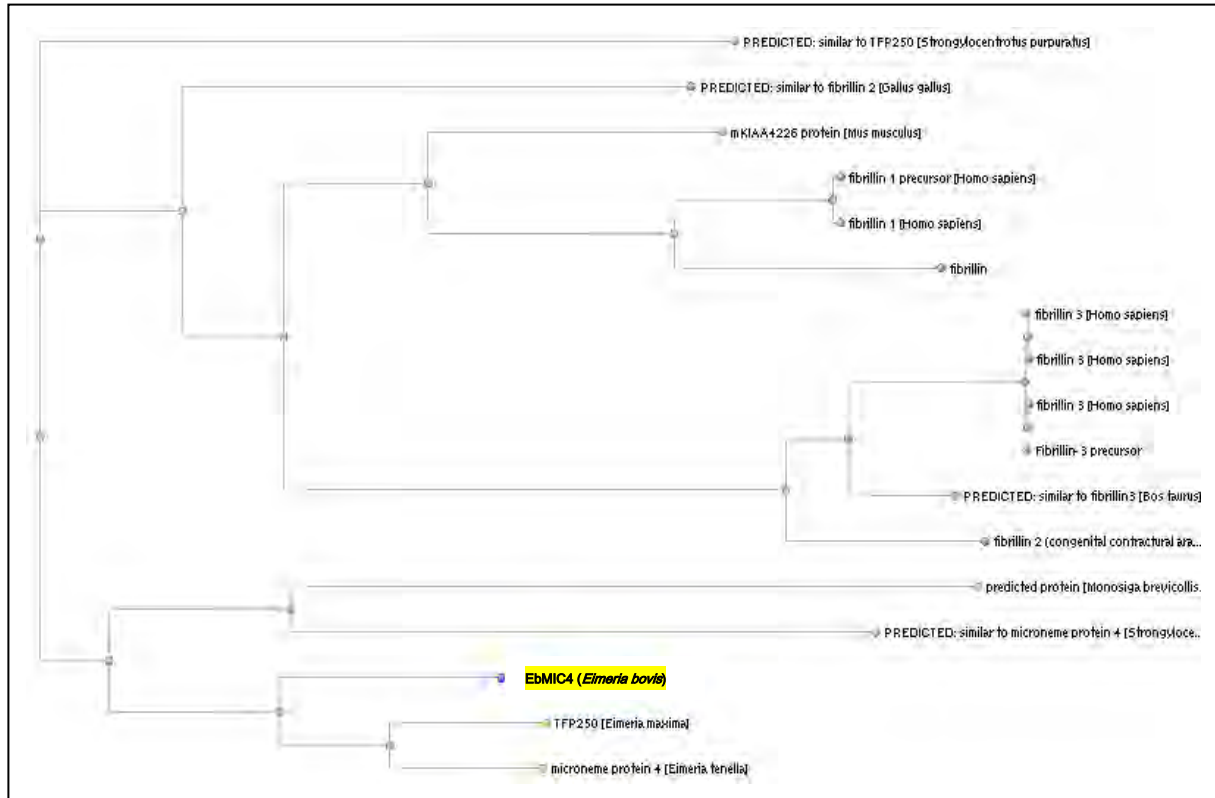


Abb. 3.19: Homologieanalyse von EbMIC4 (Phylogenetischer Baum).

Dargestellt ist das Ergebnis der BlastP-Analyse der EbMIC4-Sequenz, bei der die Sequenzunterschiede und Verwandtschaftsbeziehung der einzelnen Arten mit einberechnet und die Sequenzunterschiede als Abstände zueinander ausgedrückt wurden.

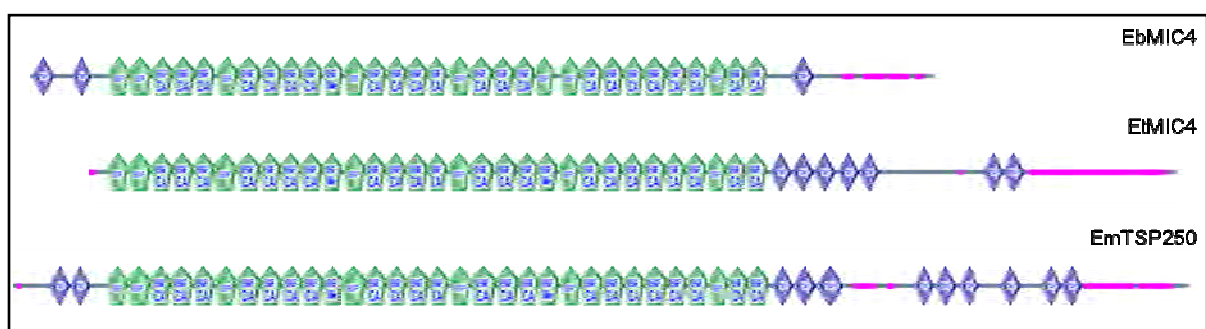


Abb. 3.20: Vergleich der vorhergesagten Domänenstruktur von EbMIC4, EtMIC4 und EmTSP250.

Mit dem Programm SMART wurde die Domänenstrukturen von EbMIC4, EtMIC4 und EmTSP250 vorhergesagt und grafisch dargestellt. Es zeigt sich eine fast 100%ige Übereinstimmung der Sequenzen im Bereich der EGF-like-Domänen. In den anderen Bereichen ist die Variabilität dagegen ungleich höher.

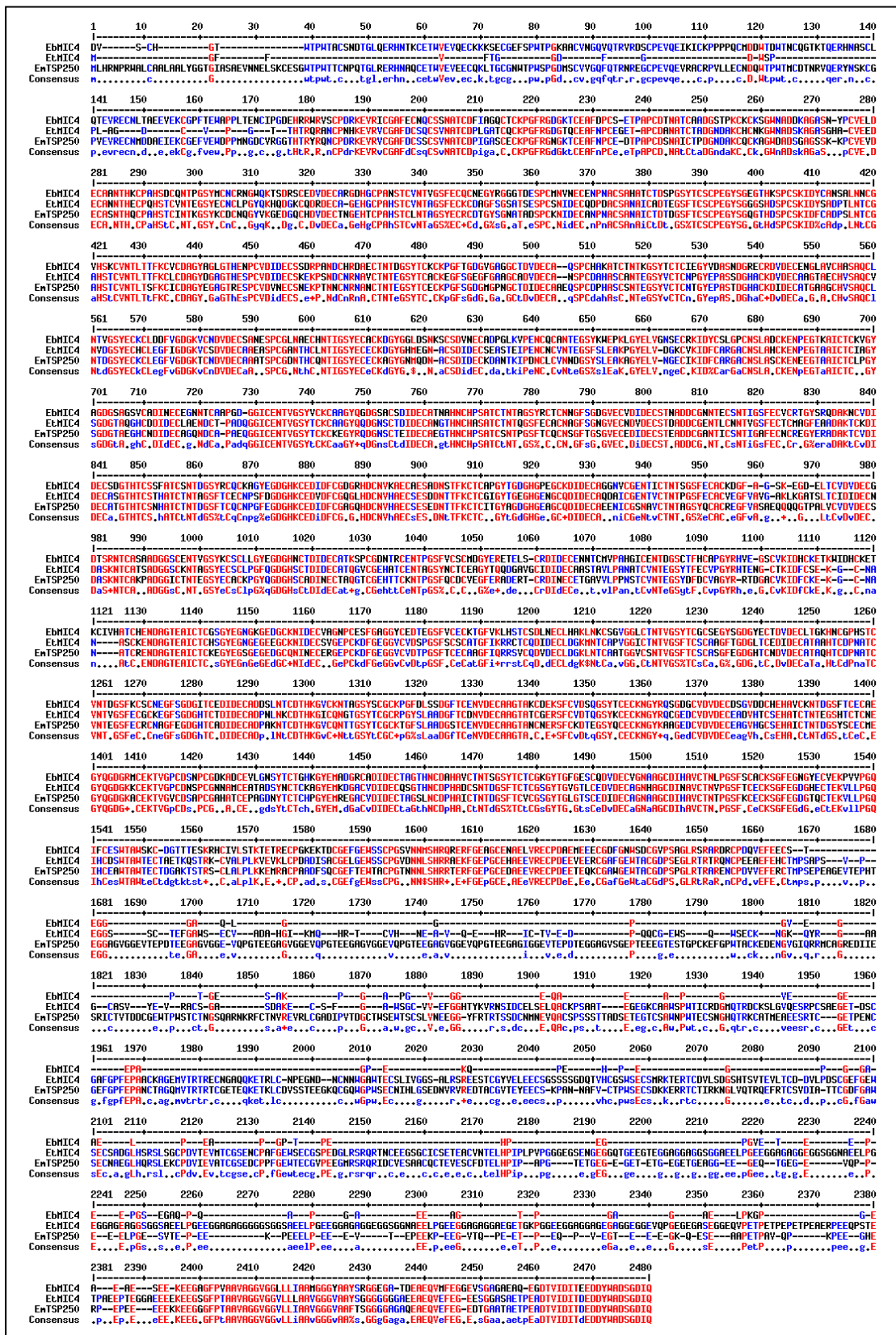


Abb. 3.21: Multialignment der Proteinsequenzen von EbMIC4, EtMIC4 und EmTSP250.

Mit dem Programm MultiAlign 5.4.1 (Symbolvergleichstabelle nach Risler) wurden die Proteinsequenzen von EbMIC4, EtMIC4 und EmTSP250 miteinander verglichen. Markiert wurden Bereiche mit **hoher** und **geringerer** Übereinstimmung, schwarz – keine Übereinstimmung.

Legende (mehrere Aminosäuren mgl.): \$ – L oder M; % – F oder Y, + – K, Q oder R

3.4 Bestimmung der Anzahl der Genkopien vom Ebmic4 im *E. bovis*-Genom

Um zu zeigen, ob es sich bei dem Ebmic4-Gen um ein „single copy“- oder „multi copy“-Gen handelt, wurde gDNA von *E. bovis* mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut und im Southern Blot mit einer Ebmic4-spezifischen Sonde analysiert. Die für den Restriktionsverdau verwendeten Enzyme waren: *EcoR* I, *Hind* III, *EcoR* V, *Hinc* II, *Bbv* I, *Mlu* I und *Pst* I. Ihre Schnittstellen in der bekannten gDNA von EbMIC4 sind in Abb. 3.22 angegeben. Das Experiment wurde einmal wiederholt, da im ersten Ansatz nicht überall ein Produkt nachgewiesen werden konnte.

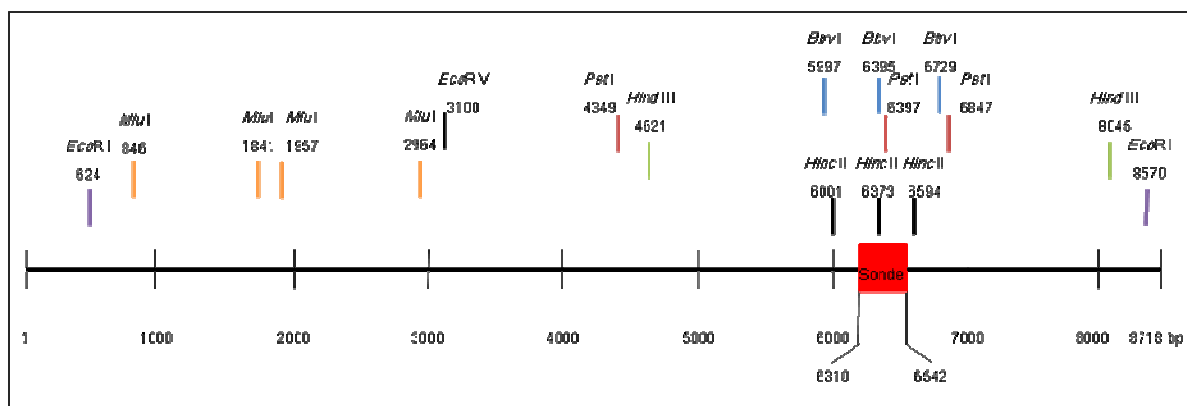


Abb. 3.22: Restriktionsschnittstellen in der bisher identifizierten gDNA-Sequenz von EbMIC4.

Dargestellt sind die Positionen der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme und die Position der verwendeten Sonde.

Im ersten Experiment (Abb. 3.23-A) erfasste die spezifische Sonde nur bei den Restriktionsverdauen mit *Hind*III sowie *EcoR*V entsprechend verdaute gDNA. Die nachgewiesenen Produkte lagen wie erwartet bei ~3400 bp und ~3100 bp. Beim Verdau mit *Hinc* II wurden zwei Produkte mit einer Größe von 370 bp und 221 bp erwartet, diese waren aufgrund ihrer geringen Größe bei der Separation verloren gegangen.

Im zweiten Experiment (Abb. 3.23-B) wurden Produkte oberhalb von 8 kb nicht berücksichtigt, da die Restriktionsverdau-Ansätze mit *Mlu* I, *EcoR* V und *EcoR* I unvollständig waren. Es wurden Einzelbanden von >5800 bp (*Mlu* I), ~3100 bp (*EcoR* V) und ~7900 bp (*EcoR* I) erwartet, die mit der Sonde hybridisieren. Beim Verdau mit *EcoR* V wurde kein entsprechendes Fragment (3100 bp) gefunden, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen unvollständigen Restriktionsverdau zurückzuführen ist.

Die Restriktionsenzyme *Pst* I und *Bbv* I schneiden wie *Hinc* II innerhalb der Sondensequenz, weshalb zwei Produkte erwartet wurden. Für *Pst* I wurden entsprechend Banden 450 bp und

~2050 bp nachgewiesen. Das Enzym *Bbv*I weist eine Vielzahl an Schnittstellen (40) innerhalb der angegebenen Sequenz auf. Die entsprechenden Produkte sind von ähnlicher Größe (398 bp und 334 bp), so dass sie insgesamt nur ein Signal erzeugten.

Die Analyse zeigt insgesamt, dass *Ebm*ic4 als „single copy“-Gen im Genom von *E. bovis* vorkommt.

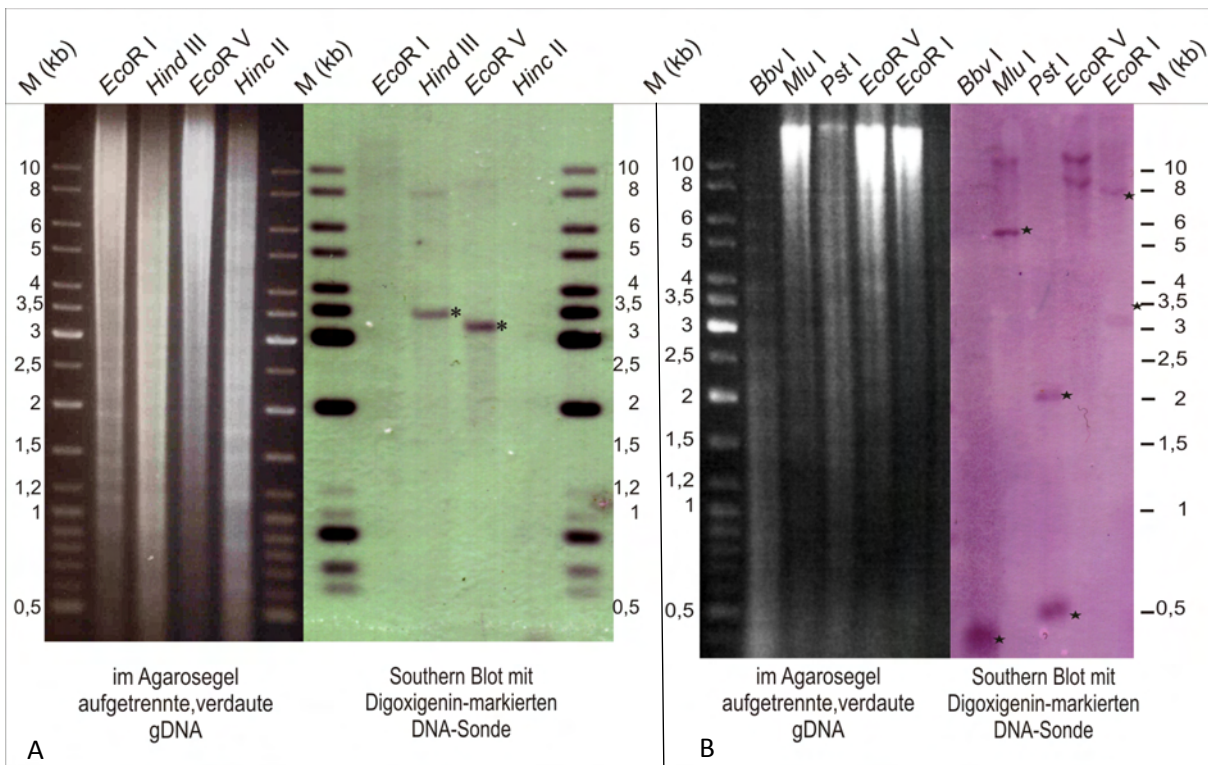


Abb. 3.23: Überprüfung der Genhäufigkeit von *Ebm*ic4 im Genom von *E. bovis* mittels Southern Blot.

Die gDNA von *E. bovis* wurde mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut, mittels Agarosegel aufgetrennt und geblottet. Anschließend erfolgte der Nachweis mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde MIC4_S1, erzeugt über PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar Mic4_S1_for/rev.

A: Verdau mit *EcoR* I, erwartetes Produkt: ~7900 bp; Verdau mit *Hind* III, erwartetes Produkt: ~3400 bp, Verdau mit *EcoR* V, erwartetes Produkt: ~3100 bp; Verdau mit *Hinc* II, erwartete Produkte: 370 bp und 221 bp.

B: Verdau mit *Bbv* I, erwartete Produkte: 398 bp und 334 bp; Verdau mit *Mlu* I, erwartetes Produkt: größer als 5800 bp; Verdau mit *Pst* I, erwartete Produkte: 450 bp und ~2050 bp; Verdau mit *EcoR* V, erwartetes Produkt: ~3100 bp; Verdau mit *EcoR* I, erwartetes Produkt: ~7900 bp.

3.5 Transkription des Ebmic4-Gens in verschiedenen *E. bovis*-Stadien

Die Transkription des Ebmic4-Gens im Verlauf der Entwicklung von *E. bovis* wurde mittels RT'-PCR analysiert. Als interne Referenz und Positivkontrolle diente das Ebhsp70-Gen, dessen Sequenz teilweise im Zuge dieser Arbeit identifiziert werden konnte (Teilsequenz siehe Anhang: zu 3.4). In Vortests zeigte sich eine konstitutive Transkription.

Für die Studien wurden Total-RNAs aus Sporozoiten, Merozoiten I und von infizierten Wirtszellen (BUVEC) im Laufe der ersten Merogonie verwendet. RT'-PCR-Analysen von unsporulierten und sporulierten *E. bovis*-Oozysten konnten aufgrund zu geringer Total-RNA-Ausbeuten nicht erfolgreich durchgeführt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.5.1 Transkription von Ebmic4 in Sporozoiten und Merozoiten

Sowohl in Sporozoiten (Abb. 3.24, Spur 3+4) als auch in Merozoiten I (Abb. 3.24, Spur 1+2) konnten Ebmic4-spezifische Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden, die der erwarteten Größe von 400 bp entsprachen. Die Amplifikation von Ebhsp70 war erfolgreich und erbrachten mit 600 bp ein Amplifikat von erwarteter Größe. In den RT-Kontrollen, bei denen die RT-Reaktion ohne ReverseTranskriptase durchgeführt wurde, erfolgte keine Amplifikation.

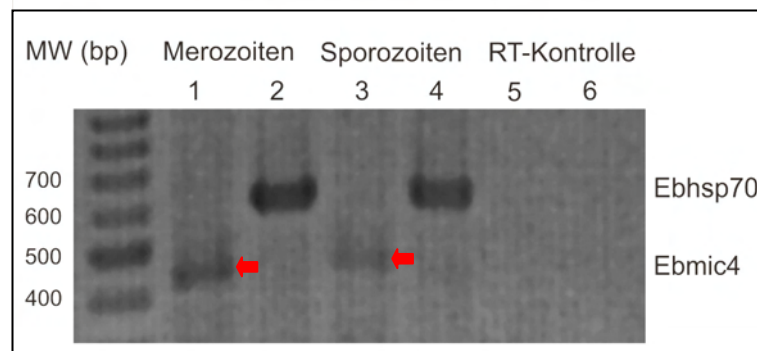


Abb. 3.24: Nachweis des Transkriptes von Ebmic4 und Ebhsp70 in *E. bovis*-Sporozoiten und -Merozoiten I mittels RT'-PCR.

In der RT-Reaktion wurde 1 µg RNA-Äquivalent von Merozoiten und Sporozoiten wie unter 2.8.4. mit einem OligodT-Primer (20mer) in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung der spezifischen Primerpaare EbMIC4_RT'-PCR1_5for/3rev und HSP70_S1_f/r wurden Ebmic4 und Ebhsp70 aus Sporozoiten- und Merozoiten-cDNA amplifiziert. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,5% Agarosegel bei 120 V für 45 min, wobei 10 µl Probe/Spur aufgetragen wurden.

Spur 1: Amplifikat von Ebmic4 in Merozoiten Spur 2: Amplifikat von Ebhsp70 in Merozoiten Spur 3: Amplifikat von Ebmic4 in Sporozoiten Spur 4: Amplifikat von Ebmic4 in Sporozoiten Spur 5+6: RT-Negativkontrollen, ohne Enzym

3.5.2 Transkription von Ebmic4 während der ersten Merogonie

Da EbMIC4 als Mikronemenprotein mit großer Wahrscheinlichkeit am Aufbau des Glideosoms beteiligt ist und eher keine Funktion bei der asexuellen Vermehrung während der ersten Merogonie besitzt, stellte sich die Frage, wie es sich mit der Transkription von Ebmic4 während dieser Zeit verhält. Dafür wurden die Transkriptionsprofile von Ebmic4 und Ebhsp70 (interne Referenz) im Verlauf der ersten Merogonie von *E. bovis* in infizierten Wirtszellen (BUVEC) untersucht. Innerhalb eines Zeitraumes von 3 Wochen bis zur vollständigen Ausreifung der Makromeronten wurde der Zellrasen an bestimmten Tagen p. i. abgelöst und die cDNA synthetisiert. Um eventuellen wirtzellabhängigen Schwankungen Rechnung zu tragen, wurden die RT PCR-Studien mit drei unterschiedlichen BUVEC-Isolaten durchgeführt. Die *in vitro*-Entwicklung von *E. bovis* während der ersten Merogonie wurde photographisch dokumentiert und ist in den Abb. 3.25-1 und 3.25-2 dargestellt. Dabei zeigte sich die typische *in vitro*-Entwicklung, wie sie von Hermosilla et. al. (2002) beschrieben worden ist.

Die Infektionsrate lag unabhängig vom BUVEC-Isolat bei 10-12%.

Abb. 3.25-1/2: *In vitro*-Entwicklung von *E. bovis* in BUVEC-Wirtszellen.

Konfluent gewachsene Wirtszellen (Abb. 3.25-1, Kontrolle) wurden mit exzystierten *E. bovis*-Sporozoiten infiziert. Nach Invasion der Wirtszelle innerhalb weniger Minuten bis Stunden, sind die eingedrungenen Sporozoiten als kommaförmige Gebilde mit einem ovalen hellen Punkt erkennbar (Abb. 3.25-1, 1 dpi, Pfeil). Ein Teil der eingedrungenen Sporozoiten entwickelt sich in den anschließenden Tagen zu abgerundeten Trophozoiten (Abb. 3.25-1, 7 dpi, Pfeil), andere Sporozoiten verbleiben unverändert in der Wirtszelle (Abb. 3.25-1, 7 dpi, Stern). Die Trophozoiten vergrößern sich und durch asexuelle Vermehrung (Merogonie) kommt es zur Ausbildung von kleinen Makromeronten mit Merozoiten I (Abb. 3.25-1, 10-12 dpi, Pfeil). Die Makromeronten nehmen in den nächsten Tagen stark an Volumen und Größe zu (Abb. 3.25-2, 15-21 dpi, Pfeil). Aus den reifen Makromeronten werden dann die ersten Merozoiten I freigesetzt (Abb. 3.25-2, 21 dpi, Stern).

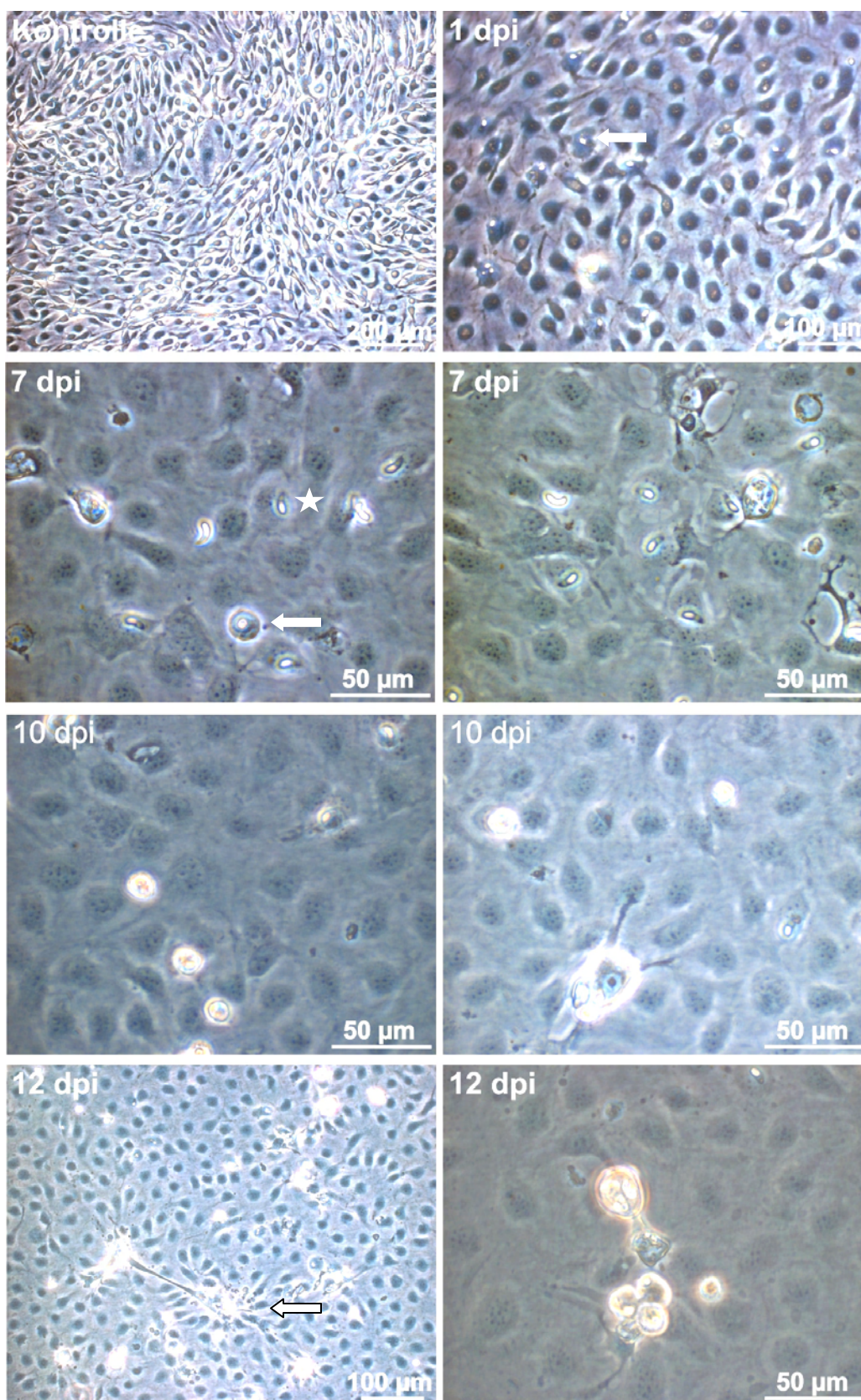


Abb. 3.25-1: *In vitro*-Entwicklung von *E. bovis* in BUVEC-Wirtszellen (1-12 dpi).

Dargestellt ist die Entwicklung von *E. bovis* in BUVEC im Zeitraum von 1-12 Tagen p. i. (Phasenkontrast).

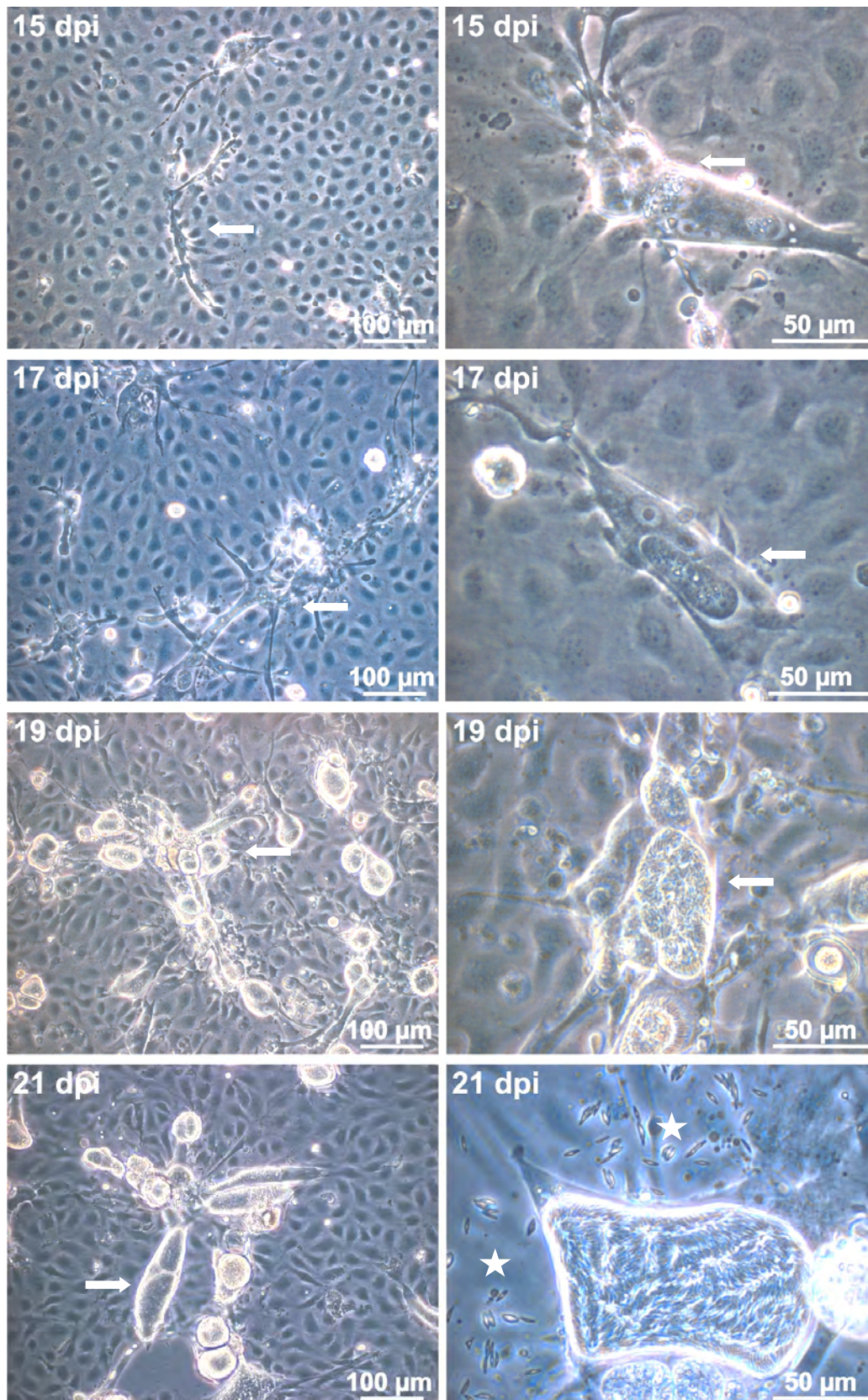


Abb. 3.25-2: *In vitro*-Entwicklung von *E. bovis* in der BUVEC-Wirtszellen (15-21 dpi).

Dargestellt ist die Entwicklung von *E. bovis* in BUVEC im Zeitraum von 15-21 Tagen p. i. (Phasenkontrast).

Die Untersuchungen erfolgten mittels RT'-PCR. Als Kontrollen dienten RNA-Proben von nicht-infizierten Wirtszellen, die entsprechend des Tages 1 und 14 p. i. isoliert wurden. In diesen Ansätzen konnten weder Transkripte von Ebmic4 noch von Ebhsp70 nachgewiesen werden (Abb. 3.26-Ko 1, Ko 2). In den RT-Kontrollen, die ohne Reverse Transkriptase durchgeführt wurden, war ebenfalls kein Amplifikationsprodukt nachweisbar, was den Schluss zulässt, dass keine Verunreinigungen mit gDNA aufgetreten waren (Abb. 3.26-RT1-4). Kontrollen der PCR-Reaktion waren ebenfalls in Ordnung (Positivkontrolle mit pDNA vom Klon GW_2Bf#7) oder negativ (Wasser als Template) (Abb. 3.26-PCR-/Ko).

Um zu gewährleisten, dass alle Proben gleich behandelt wurden, wurde die Konzentration der isolierten Total-RNA spektrophotometrisch gemessen. In die RT'-PCR-Reaktionen wurde dann die gleiche Menge an RNA-Äquivalent eingesetzt. Dabei verändert sich das Verhältnis von Wirtszell- zu Parasiten-RNA im Zuge der fortschreitenden Entwicklung von *E. bovis*. Durch die massive Vergrößerung der Makromeronten und der Bildung der Merozoiten I nimmt der Anteil der Parasiten-RNA zu. Das ist auch gut an der Intensität des Ebhsp70-Amplifikats, das konstitutiv während der ersten Merogonie exprimiert wird, erkennbar. Die Intensität der Banden einer Zelllinie war im ersten Teil der Entwicklung, in der es noch nicht zu einer massiven Vermehrung der Merozoiten I kommt, auf ähnlichem Niveau und nahm ab dem 14./15. Tag p. i. tlw. massiv zu.

Ebmic4 hingegen wird nicht konstitutiv exprimiert. Zu Beginn der Merogonie war das Transkript von Ebmic4 deutlich nachweisbar. Vor allem am 1.-2.Tag nach der Infektion war bei den individuellen BUVEC-Isolaten ein kurzzeitiger Anstieg des Transkriptes zu beobachten. Abhängig von der jeweiligen Zelllinie wurden ab dem Tag 5.-7. p. i. keine Transkripte von Ebmic4 mehr nachgewiesen. Erst ab Tag 10-15 p. i. konnte die Ebmic4-mRNA wieder demonstriert werden, wobei die Menge mit der Ausreifung der Meronten um den Tag 15 p. i. sprunghaft anstieg.

Um semiquantitative Daten zu generieren, wurden die Intensitäten der einzelnen Banden der Amplifikationsprodukte mit Hilfe des Programms „ImageJ“ (im Internet frei verfügbar) analysiert und im Tabellenkalkulationsprogramm „Microsoft Office Excel“ ausgewertet. Dabei wurden die Intensitäten von Ebhsp70 und Ebmic4 miteinander verglichen. D. h. jeder Ebmic4-Wert wurde auf den entsprechenden Ebhsp70-Wert normalisiert, womit die massive Vermehrung der Merozoiten I herausgerechnet werden sollte (Abb. 3.27). Dabei bestätigten sich die in den Gelen gemachten Beobachtungen.

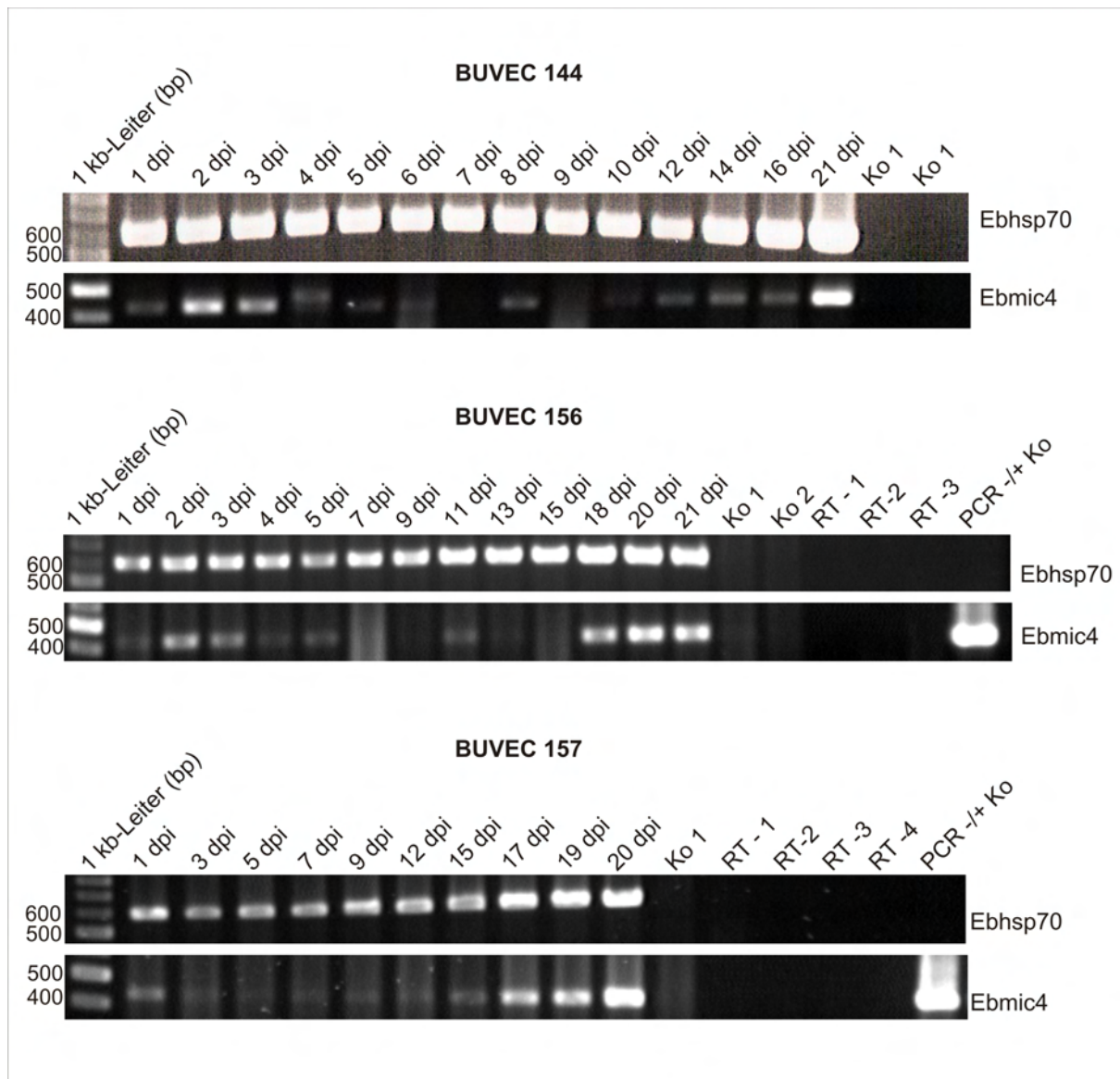


Abb. 3.26: Transkriptionsprofil von Ebmic4 und Ebhsp70 während der ersten Merogonie. Untersucht wurden die Transkriptionsprofile von Ebmic4 und Ebhsp70 während der ersten Merogonie von *E. bovis* in drei unterschiedlichen BUVEC-Linien. In einem 1,5% Agarosegel wurden die Amplifikationsprodukte von Ebhsp70 und Ebmic4 aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt.

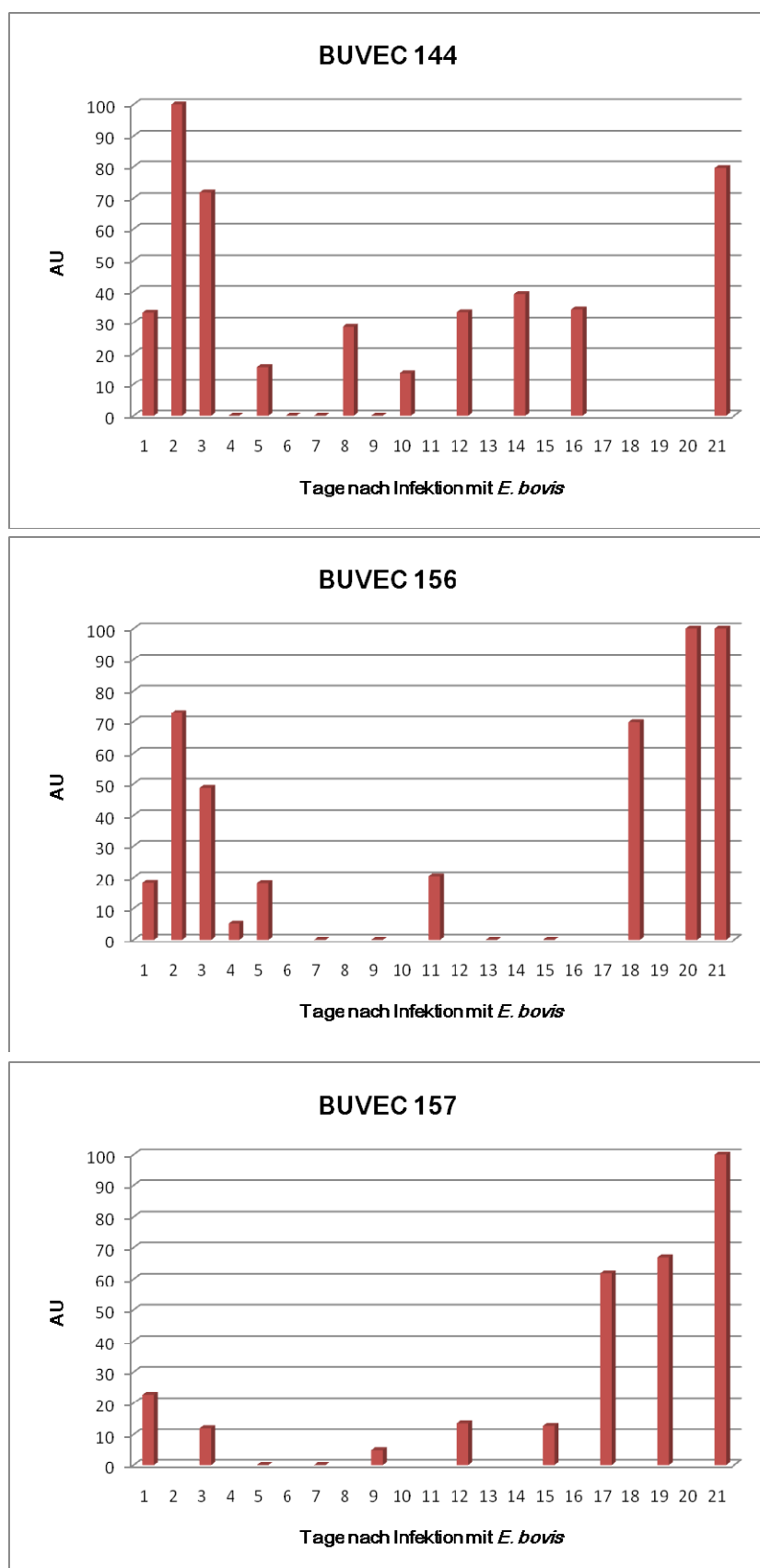


Abb. 3.27: Semiquantitative Auswertung der Transkripte von Ebmic4 in Abhängigkeit von Ebhsp70 als Referenzgen.

Für die Analyse wurden die Farbintensitäten nach Ethidiumbromid-Färbung der Amplifikationsprodukte mit dem Programm ImageJ bestimmt. Die Intensitäten der Banden von Ebmic4 wurden in Bezug zu denen von Ebhsp70 gesetzt. AU – Arbitrary Units (beliebige Einheiten)

3.6 Expression von EbMIC4 in *E. bovis*-Entwicklungsstadien

3.6.1 Herstellung und Prüfung geeigneter Antikörpern zum Nachweis von EbMIC4

3.6.1.1 Herstellung eines rekombinanten Fragments von EbMIC4

Um EbMIC4 auf Proteinebene zu demonstrieren, sollten spezifische Antikörper gegen das Molekül unter Verwendung rekombinanter Peptide hergestellt werden, die in Verbindung mit dem vorhandenen Antiserum gegen EtMIC4 eingesetzt werden sollten. Aufgrund der sehr konservierten Domänenstruktur in weiten Teilen des Proteins wurde der C-terminale, zytoplasmatische Bereich für die Immunisierung ausgewählt (Abb. 3.28). Dieser Bereich ist 177 bp lang und kodiert für eine 59 aa lange Peptidsequenz, die eine theoretisch ermittelte Masse von 6,07 kDa besitzt.

Der Genabschnitt wurde erfolgreich in den Expressionsvektor pGEX-2T kloniert (siehe 2.9), das entsprechende Peptid (EbMIC4-Cterm) exprimiert.

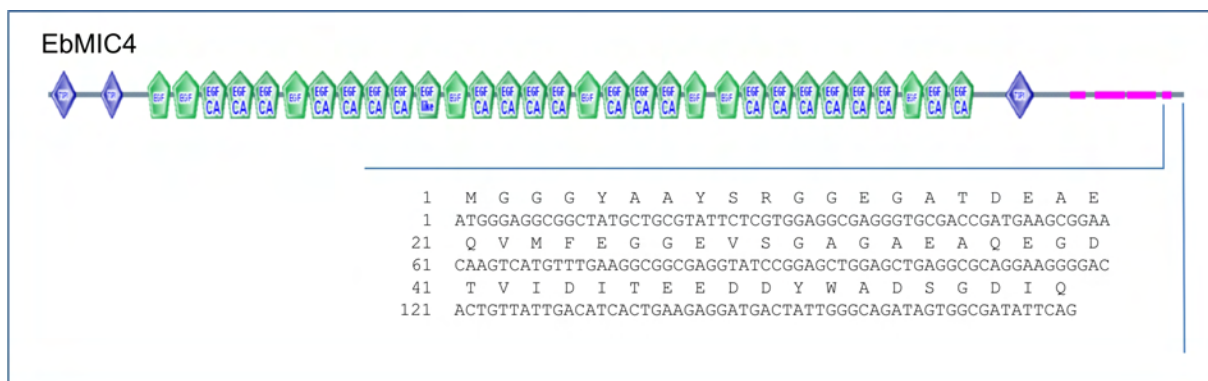


Abb. 3.28: Position und Sequenz des zytoplasmatischen Teilbereichs von EbMIC4 (EbMIC4-Cterm).

Dargestellt ist die Sequenz des Teilbereichs von EbMIC4, amplifiziert mit den Primern FP_EbMIC4_(pGEX, *Bam*H I) und RP_EbMIC4_(pGEX, *Eco*R I), die initial zur rekombinanten Expression des Proteins für die Antikörperherstellung verwendet wurde.

Da das ausgewählte Peptid ohne Kopplung an ein Trägermolekül für eine erfolgreiche Immunisierung zu klein war, wurde zudem versucht, ein dreifaches Repeat der Sequenz herzustellen (im pDrive-Vektor). Nach der Umklonierung in den pGEX-2T Expressionsvektor wurde versucht, das Peptid in *E. coli* BL21 rekombinant zu exprimieren. Das erhaltene Produkt war jedoch für die Bakterienzellen toxisch und konnte so nicht verwendet werden.

Da auch weitere Versuche, ein anderes geeignetes Peptid für die Immunisierung herzustellen, fehl schlugen, weil Klonierung oder Umklonierung in die entsprechenden

Vektoren nicht erfolgreich waren, sollte das rekombinant hergestellte Peptid (EbMIC4-Cterm) für die Immunisierung verwendet werden.

3.6.1.2 Expression, Aufreinigung und Kopplung von EbMIC4-Cterm

Die Proteinexpression von EbMIC4-Cterm erfolgte unter Standardbedingungen. Dabei wurde ein GST-Fusionsprotein mit einer Gesamtgröße von ca. 32 kDa exprimiert, bestehend aus dem Protein GST, einem kurzen Verbindungsstück mit einer Thrombinschnittstelle und dem C-terminalen Ende von EbMIC4 (siehe Abb. 2.2). Zur Überprüfung der erfolgreichen Proteinexpression des Fusionsproteins und zur Optimierung der Bedingungen, wurde eine Mini-Expressionsanalyse durchgeführt (Abb. 3.29). Als Kontrolle diente dabei die Expression von GST. Im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel wurde deutlich, dass sowohl das rekombinant hergestellte Fusionsprotein (Abb. 3.29, rot umrandet) als auch GST (26 kDa, Abb. 3.29, grün umrandet) exprimiert wurden. Dabei zeigte sich nach der Induktion der spezifischen Proteinexpression mit IPTG ein deutlicher Anstieg der Menge des Zielproteins.

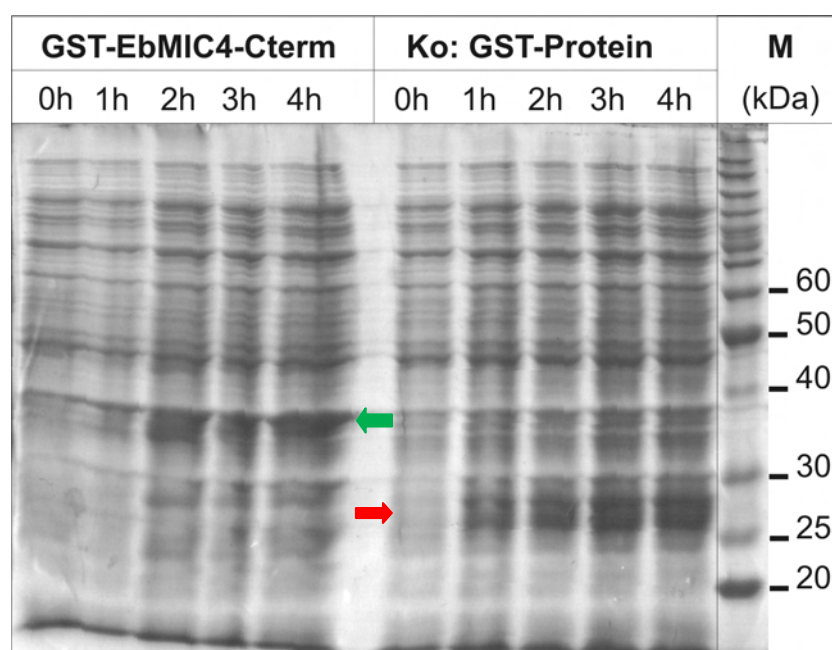


Abb. 3.29: Heterologe Expression von EbMIC4-Cterm gekoppelt an GST in *E. coli* Stamm BL 21.

Zur Überprüfung der Expression wurden Proben der Bakterienextrakte zum Zeitpunkt der Induktion (0,5 mM IPTG, 0 h) und 1 h, 2 h, 3 h 4 h danach entnommen, mittels SDS-PAGE (12%-iges Gel) aufgetrennt und Coomassie Brilliant blue gefärbt. Als Kontrolle diente die Expression von nicht fusioniertem GST (26 kDa). Deutlich sichtbar kam es zu einem Anstieg der Proteinmenge von GST-EbMIC4-Cterm (grüner Pfeil) und GST (roter Pfeil) im Verlauf der Proteinexpression.

Nach erfolgreicher Mini-Proteinexpression erfolgten die präparative Proteinexpression (siehe 2.9.3) und die Aufreinigung des rekombinant hergestellten Peptids (siehe 2.9.4). Überprüft

wurde die Reinigung mittels SDS-PAGE (Abb. 3.30), bei der im Coomassie-gefärbten Gel mehrere Banden sichtbar wurden. Das bei <10 kDa auftauchende Protein in den drei Eluaten (Abb. 3.30, roter Pfeil) ist das rekombinant hergestellte, vom GST abgespaltene Peptid EbMIC4-Cterm. Ein weiteres Protein mit einer Größe von ca. 26 kDa (Abb. 3.30, Spur 4, Agarosepellet, roter Stern) ist das an die GSH-Sepharose gebundene Protein GST.

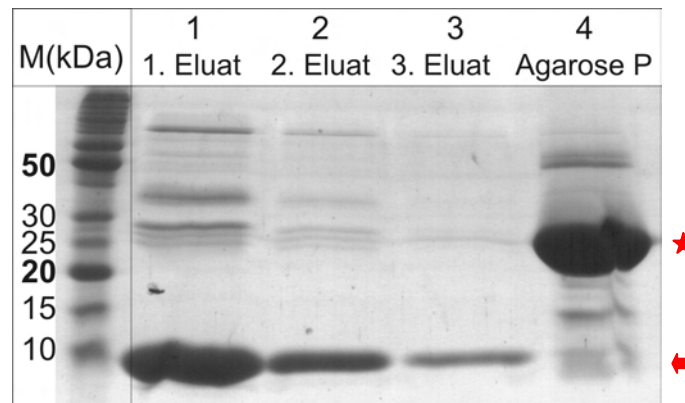


Abb. 3.30: Aufreinigung des rekombinanten EbMIC4-Cterm Peptids.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Abspaltung des rekombinanten Peptids über Thrombin wurden Proben der PBS-Eluate und des Agarosepellets mittels SDS-PAGE (12%-iges Gel) aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die dominanten Banden in den Eluaten (Spur 1-3) zeigen das rekombinant exprimierte Peptid EbMIC4-Cterm (6 kDa, Pfeil). In der Spur 4 (AgaroseP, -pellet) ist GST als dominante Bande bei ca. 26 kDa erkennbar (Stern), das an der GSH-Sepharose verblieb. Die schwächeren Banden sind Thrombin (37 kDa) und restliche, nicht entfernte Bakterienproteine.

Um die Immunogenität zu gewährleisten, wurde das Peptid an das KLH-Protein (Keyhole Limpet-Hämocyanin aus der marinen Schnecke *Megathura crenulata*) gekoppelt.

3.6.1.3 Immunisierung

Die Immunisierung wurde wie im Kapitel 2.9.5 beschrieben von der Firma SeqLab, Göttingen durchgeführt. Am Ende standen die Antiseren von zwei immunisierten Kaninchen gegen EbMIC4 zur Verfügung: anti-EbMIC4-Cterm K1 und anti-EbMIC4-Cterm K2.

Vom ersten Antiserum lag nur das Serum der ersten Gewinnung (benannt mit anti-EbMIC4-Cterm K1) aufgrund des frühen Todes des Spendertiers zu Verfügung. Vom zweiten immunisierten Tier lagen zwei Antisera vor (benannt mit anti-EbMIC4-Cterm K2-1 und K2-final).

Bei den nachfolgenden Untersuchungen zur Lokalisation von EbMIC4 wurde nur das Antiserum anti-EbMIC4-Cterm K1 verwendet, das die Antiseren vom zweiten immunisierten

Tier viel später vorlagen und eine Kreuzreaktivität mit einem anderen, kleineren Protein zeigten (siehe Abb. 3.32).

Wie in Abb. 3.31 ersichtlich reagierte das Antiserum anti-EbMIC4-Cterm K1 im Immunblot in den Verdünnungsstufen 1:10000 und 1:50000 stark mit dem Fusionsprotein GST-EbMIC4-Cterm. Das zugehörige Präimmunserum reagierte sehr schwach (1:10000) bzw. nicht (1:50000).

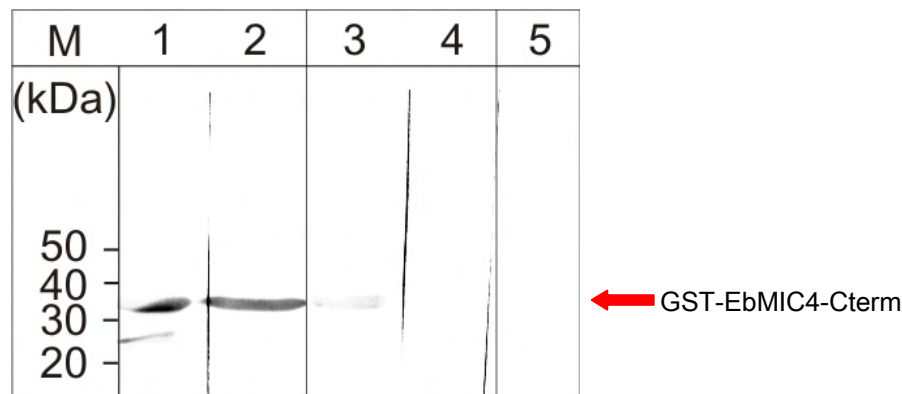


Abb. 3.31: Überprüfung der Reaktivität von Antiserum K1 gegen EbMIC4-Cterm.

Für die Überprüfung der Reaktivität des Antiserums K1-1 gegen das rekombinant hergestellte Peptid wurde in einer SDS-PAGE (10% Trenngel) das rekombinant exprimierte und aufgereinigte Fusionsprotein GST-EbMIC4-Cterm aufgetrennt und geblottet. Im anschließenden Immunoblot wurden unterschiedliche Konzentrationen des Antiserums K1-1 und dem zugehörigen Präserum getestet. Als Sekundärantikörper wurden anti-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase (1:50000), verwendet.

Legende: 1 - Antiserum K1-1, 1:10000, 2 - Antiserum K1-1, 1:50000, 3 - Präserum Prä1, 1:10000, 4 - Antiserum Prä1, 1:50000, 5 - Zweitantikörperkontrolle (ohne Erstantikörper)

3.6.2 Nachweis von EbMIC4 in *E. bovis*-Entwicklungsstadien

3.6.2.1 Immunoblot-Analysen

Zum Nachweis von EbMIC4 in *E. bovis*-Sporozoiten und -Merozoiten wurde ein Immunoblot unter Verwendung von anti-EbMIC4-Cterm durchgeführt. Als Proben wurden das Gesamtprotein von 3×10^6 Sporozoiten/Spur oder 15×10^6 Merozoiten l/Spur aufgetragen und getrennt. Nach dem Proteintransfer mittels Tankblot wurde der Antigennachweis mit den Antiseren anti-EbMIC4-Cterm K1 und K2-1 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass beide Immunsere sowohl bei Sporozoiten- (Abb. 3.32-A) als auch bei Merozoiten-Antigen (Abb. 3.32-B) mit einem Protein von ca. 245 kDa reagierten (Abb. 3.32, Stern). Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um EbMIC4, da dieses Protein der etwa

erwarteten Größe entspricht. Bei der Verwendung vom zweiten Antiserum (K2-1) kam es zusätzlich zu einer Reaktion mit einem Protein von ca. 110 kDa (Abb. 3.32, Pfeil). Bei diesem Protein könnte es sich um eine Kreuzreaktion zu einem weiteren Mikronemenprotein handeln, da die C-Termini der Mikronemenproteine oftmals identische Bereiche besitzen.

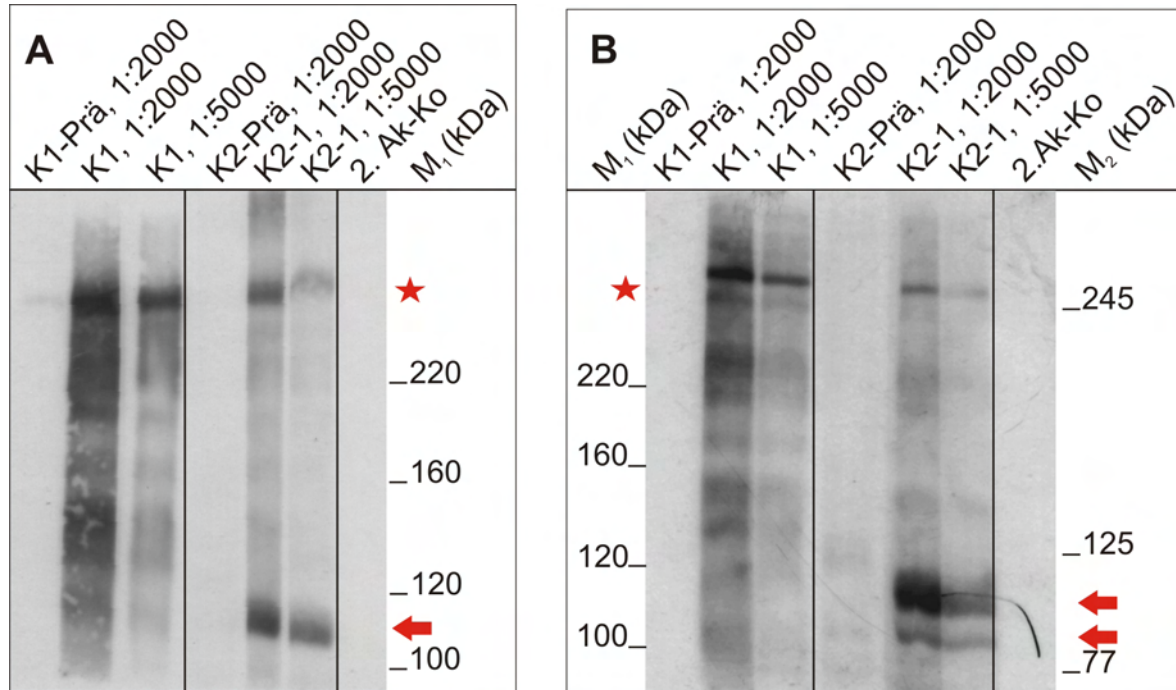


Abb. 3.32: Immundetektion von EbMIC4 in *E. bovis*-Sporozoiten- (A) und Merozoiten-Antigen (B).

Für den Immunoblot wurde pro Spur das Gesamtprotein von 3×10^6 Sporozoiten oder 15×10^6 Merozoiten aufgetragen, mittels SDS-PAGE (7,5% Trenngel) aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Immundetektion wurde mit den Antisera K1-1 und K2-1 gegen EbMIC4-Cterm und dem POD-konjugierten goat anti rabbit-Konjugat (1:50000) durchgeführt.

K1-Prä – Präserum vom 1. Kaninchen (1:2000), K1 – Antiserum vom 1. Kaninchen (1:2000/5000), K2-Prä – Präserum vom 2. Kaninchen (1:2000), K2-1 – Antiserum vom 2. Kaninchen (1:2000/5000), 2.Ak-Ko – Zweitantikörperkontrolle (ohne Erstantikörper)

3.6.2.2 Nachweis im IIFAT

Für Lokalisationsstudien von EbMIC4 in den invasiven Stadien von *E. bovis* wurden indirekte Immunfluoreszenztests (IIFAT) durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskop und/oder KLSM analysiert. Verwendet wurde das Antiserum anti-EbMIC4-Cterm K1, da nur dieses Antiserum ausschließlich das Protein von ca. 245 kDa nachwies. Als Negativkontrolle diente das korrespondierende Präserum.

Da der Antikörper mit dem zytoplasmatischen Teil von EbMIC4 reagiert, wurden die IIFAT-Reaktionen an Methanol-fixierten Proben durchgeführt. Tests mit

Paraformaldehyd / Glutaraldehyd-fixierten Proben zeigten nur eine sehr schwache oder keine Färbung. Bei Behandlung mit dem Detergenz Tween 20 vor der Antikörperbehandlung war die Markierung zwar stärker aber ebenfalls nicht deutlich (Ergebnisse nicht gezeigt).

Methanol-fixierte *E. bovis*-Sporozoiten, die mit dem Antiserum anti-EbMIC4-Cterm K1 inkubiert wurden, zeigten eine sehr deutliche Reaktion im apikalen Bereich der Sporozoiten (Abb. 3.33-B-D, Pfeil), die in den mit Präserum behandelten Sporozoiten nicht erkennbar war (Abb. 3.33-A). Diese kappenförmige Färbung nahm ca. $\frac{1}{5}$ der Parasitenlänge ein. Teilweise waren zusätzlich eine sehr schwache Markierung am basalen Ende der Sporozoiten (Abb. 3.33-C, Stern) sowie eine über den gesamten Parasitenkörper diffuse Fluoreszenz erkennbar (Abb. 3.33-D, Rhombus). Zur besseren Darstellung wurden die Sporozoiten mit Evans Blue gegengefärbt, das in den refraktilen Körperchen akkumulierte und als rote Färbung erkennbar war (Abb. 3.33, Dreieck). Da die refraktilen Körperchen kaudal gelegen sind (Hammond et. al., 1968), konnte somit auch die Antiserum-vermittelte Fluoreszenz eindeutig apikal lokalisiert werden.

Methanol-fixierte *E. bovis*-Merozoiten I wurden mit dem Antiserum anti-EbMIC4-Cterm K1 inkubiert (Abb. 3.33, A-1/2, grüne Markierung). Eine Gegenfärbung mit EvansBlue unterblieb, weil Merozoiten keine refraktilen Körperchen aufweisen. Die Reaktionen der Merozoiten wurde im Durchlicht dokumentiert (Abb. 3.34, B-2/C-2), um die Zuordnung der Färbung zu erleichtern. Feststellbar war eine lokal begrenzte Reaktion des Antiserums, die ungefähr $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ der Gesamtlänge der Parasiten ausmachte (Abb. 3.34, B/C-1, Pfeil). Da sich die Merozoiten bei ihrer Replikation erst am apikalen und dann am basalen Ende voneinander trennen (Scholtyseck, 1973; Scholtyseck, 1979), war eine Positionierung der Markierung möglich. In Abb. 3.34, B ist eine Rosette aus mehreren Merozoiten erkennbar, wie sie während der Entwicklung der Merozoiten entsteht, die noch mit dem basalen Ende aneinander haften. Die Antiserum-bedingte Markierung ist am gegenüberliegenden, apikalen Bereich lokalisiert ist (Abb. 3.34, B-1, Pfeil).

Teilweise wurde bei den Merozoiten I auch eine schwache, diffuse Fluoreszenz im gesamten restlichen Parasitenkörper erkennbar, die häufiger und stärker als bei den Sporozoiten auftrat (Abb. 3.34, B/C-1 Stern).

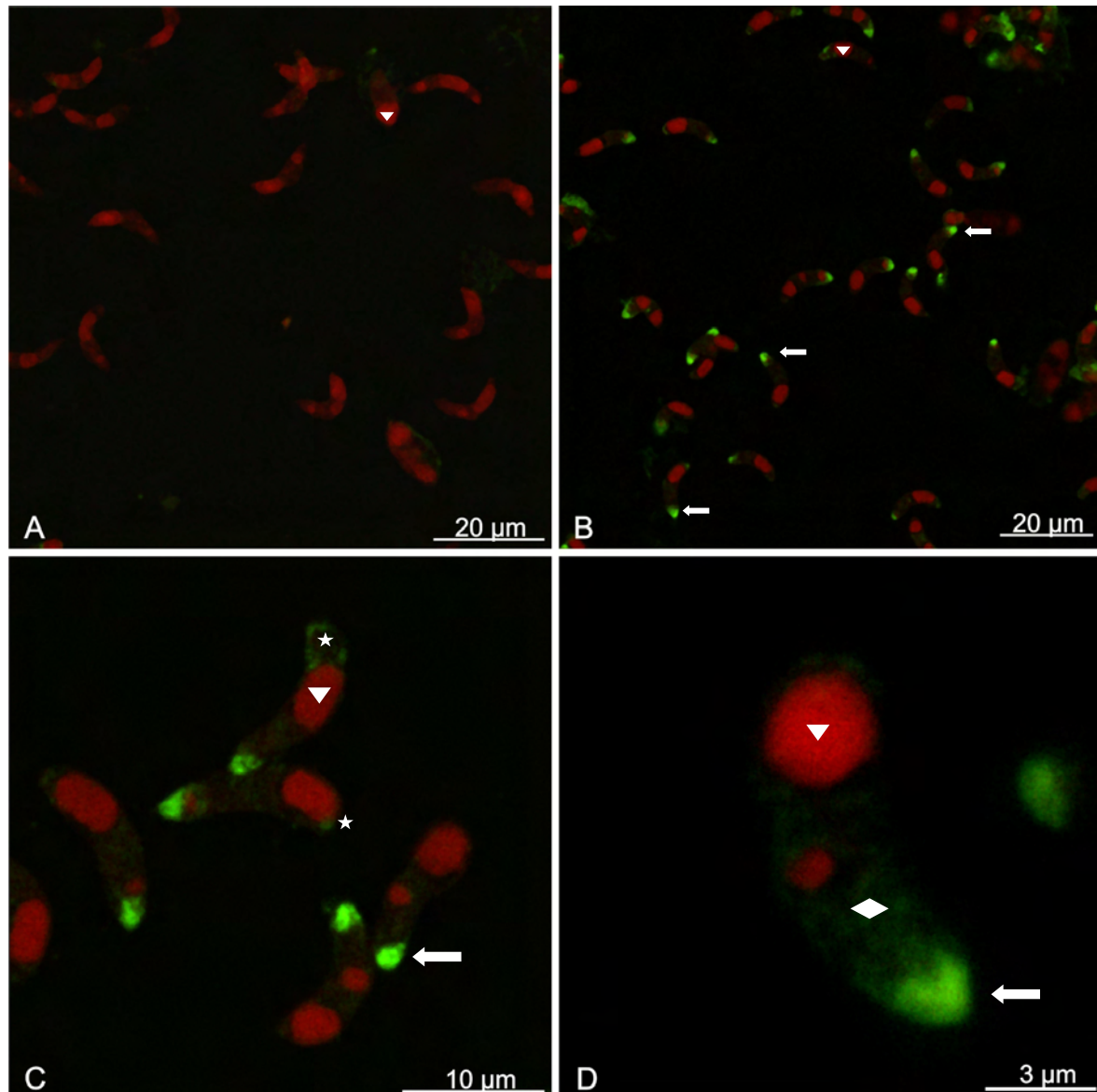


Abb. 3.33: Reaktion des anti-EbMIC4-Cterm K1 mit Methanol-fixierten Sporozoiten I von *E. bovis*.

Die Behandlung mit dem Antiserum K1-1 führte zu einer spezifischen Fluoreszenz (grün, B-D) im apikalen Bereich (Pfeil) der Sporozoiten, die bei der Behandlung mit dem zugehörigen Präserum nicht auftrat (A). Die spezifische Reaktion war teilweise auch schwach über den gesamten Parasiten verteilt (Rhombus) und reichte tlw. bis zum basalen Ende (Stern). Gegengefärbt wurden die Sporozoiten mit EvansBlue, was zum Anfärben der refraktilen Körperchen (rot, Dreieck) führte. A–Sporozoiten mit Präserum (1:50) behandelt, B-D Sporozoiten mit Antiserum K1-1 (1:50) behandelt, in unterschiedlichen Vergrößerungen.

Zweitantikörper: FITC-Konjugat (anti Kaninchen) 1:500.

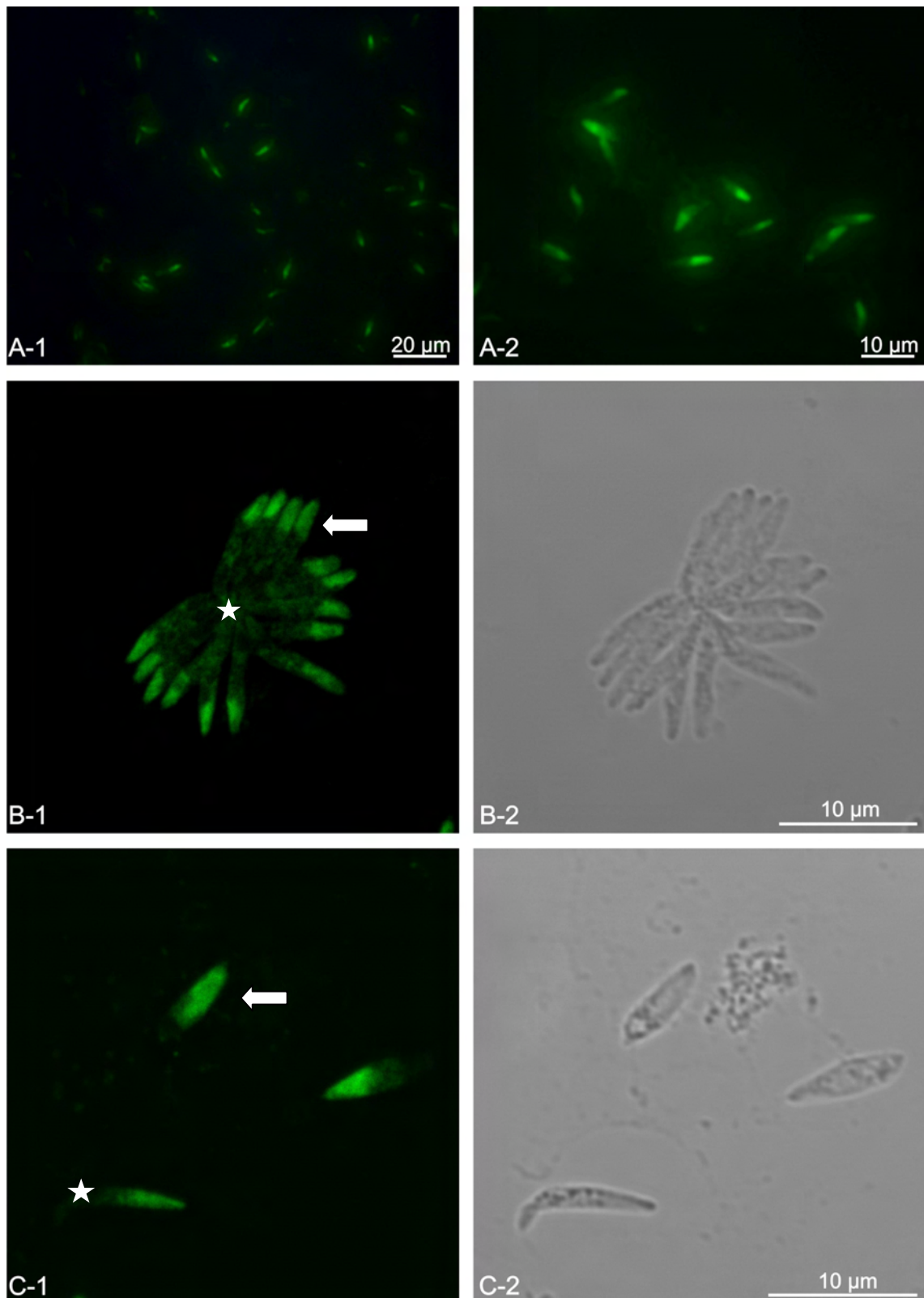


Abb. 3.34: Reaktion des anti EbMIC4-Cterm K1 mit Methanol-fixierten Merozoiten I von *E. bovis*.

Die Behandlung mit dem Antiserum K1-1 (1:50) führte zu einer spezifischen Fluoreszenz (grün) im apikalen Bereich (Pfeil) der Merozoiten, die teilweise schwach über den gesamten Parasiten verteilt zum basalen Ende reichte (Stern). Zweitantikörper: FITC-Konjugat (anti Kaninchen) 1:500.

A-1/2–Übersichtsbilder mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen, B & C–Detailaufnahmen am KLSM mit Fluoreszenzanregung (B/C-1) und ohne Fluoreszenzanregung (B/C-2).

Größenangaben identisch für B-1 und B-2 bzw. C-1 und C-1.

3.6.3 Nachweis von EbMIC4 in *E. bovis*-infizierten Wirtszellen

3.6.3.1 Nachweis im Immunblot

Untersucht wurden die Proteinproben von zwei infizierten BUVEC-Linien, die unterschiedlich stark infiziert wurden (Infektionsrate: BUVEC 156: 7,9%, BUVEC 157: 17,1%). Eingesetzt wurden an den Tagen 1, 4, 10, 17, 20 p. i. entnommene Proben sowie eine nicht-infizierte Kontrolle. In Abb. 3.35 wurde nur der relevante Teil des Gels > 160 kDa dargestellt. An den Tagen 1 und 20 p. i. reagierte das EbMIC4-spezifische Antiserum mit einem Protein von ca. 245 kDa in beiden Wirtszellpopulationen. Bei der höher infizierten BUVEC 157 waren die Reaktion stärker und das Protein zusätzlich am Tag 4 p. i. erkennbar. Das markierte Protein hatte dieselbe Größe wie das in Sporozoiten- und Merozoiten-Antigen nachgewiesene. EbMIC4 wird somit nur am Anfang und am Ende der ersten Merogonie exprimiert. An den Tagen 1 und 4 p. i. ist die Reaktion sicherlich eingedrungenen Sporozoiten zuzuordnen, während 10 Tage p. i. und später die Expression der unreifen bzw. reifen Merozoiten erfasst wurde.

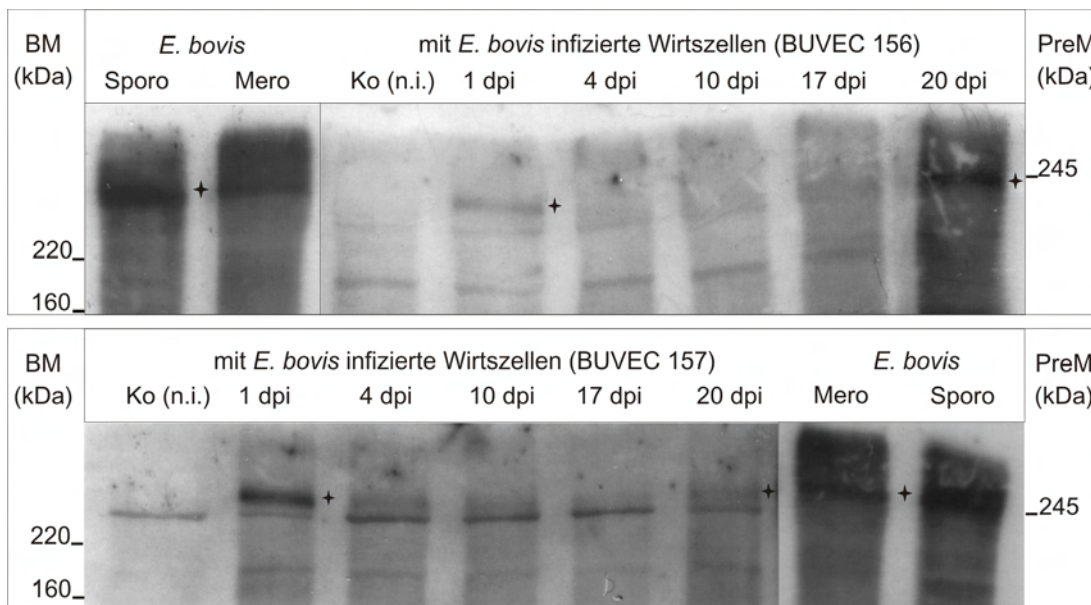


Abb. 3.35: Nachweis von EbMIC4 im Verlauf der ersten Merogonie mittels Immunoblot in *E. bovis*-infizierten Zellen und *E. bovis* Sporozoiten und -Merozoiten.

Dargestellt ist die Reaktion von anti-EbMIC4-Cterm K1 (1:7.500) auf *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten BUVEC, sowie *E. bovis*-Sporozoiten und-Merozoiten im Immunblot. Nach Aufarbeitung der Zellen wurde die Proteinkonzentration bestimmt, um je Spur 30 µg Gesamtprotein aufzutragen. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte mittels SDS-PAGE (7,5% Trenngel), Transfer mittels Tankblot und Immunnachweis (Sekundärantikörper: anti-Kaninchen-POD; 1:50000).

In den Stern-markierten Proben wurde das Ebmic4-spezifische Protein erkannt.

Sporo – *E. bovis*-Sporozoiten; Mero – *E. bovis*-Merozoiten; Ko (n.i.) – nicht-infizierte Kontrolle, 1 dpi etc.: 1. Tag p. i. etc.

3.6.3.2 Nachweis im IIFAT

Für Lokalisationsstudien von EbMIC4 wurden *E. bovis*-infizierte Wirtszellen (BUVEC) im Verlauf der ersten Merogonie mittels IIFAT unter Verwendung des Antiserums anti-EbMIC4-Cterm untersucht. Verwendet wurden immer Methanol-fixierte Präparate. Die Proben wurden im Fluoreszenzmikroskop (mit Gegendarstellung im Phasenkontrast) und am KLSM analysiert. Als Kontrollen dienten 1) nicht-infizierte Wirtszellen, die mit dem Antiserum und dem zugehörigen Präserum inkubiert wurden (Abb. 3.36), 2) *E. bovis*-infizierte Wirtszellen, die neben dem Antiserum mit dem Präserum konfrontiert wurden (Abb. 3.37) und 3) infizierte und nicht-infizierte Wirtszellen, die ausschließlich mit dem FITC-Konjugat inkubiert wurden (ohne Markierung, Ergebnis nicht gezeigt).

In der Abb. 3.36 zeigt sich, dass das Präserum K1 und das Antiserum anti-EbMIC4-Cterm schwach mit den nicht-infizierten Wirtszellen reagieren. Dabei kommt es zu einer Markierung von regelmäßig angeordnet Strukturen, die sich mit großer Wahrscheinlichkeit in der Zelle befinden, dicht unterhalb der Zellmembran.

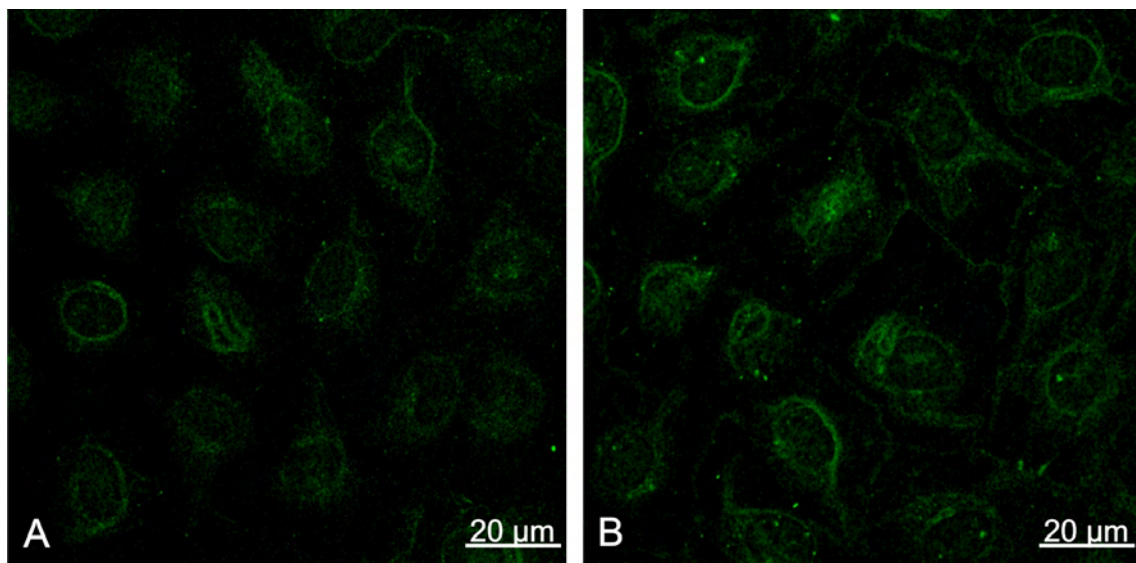


Abb. 3.36: IIFAT mit anti-EbMIC4-Cterm K1 (B) und dem zugehörigen Präserum K1 (A) in Reaktion mit nicht-infizierten Wirtszellen (BUVEC).

Dargestellt sind die Reaktionen des Präserums K1 (1:100) und des Antiserum K1-1 (1:100) mit nicht-infizierten BUVEC-Zellen. Erkennbar ist eine schwache Fluoreszenz an den Wirtszellen. Zweitantikörper war ein anti-Kaninchen FITC-Konjugat (1:500), der in der Kontrollreaktion ohne Primärantikörper keine Fluoreszenz zeigte (Ergebnis nicht gezeigt).

Abb. 3.37 enthält das Ergebnis der Behandlung von *E. bovis*-infizierten Wirtszellen (am Beispiel des 21. Tages p. i.) mit dem Präserum K1 und dem Antiserum anti-EbMIC4-Cterm. Dabei zeigten sich wie bei den nicht-infizierten Zellen eine unspezifische Fluoreszenz unterhalb der Zellmembran, die sich als wirtszellspezifische und filigrane Struktur darstellt (Abb. 3.37, Pfeil). Mit dem Antiserum anti-EbMIC4-Cterm beprobten Präparate zeigten eine spezifische Markierung im Bereich der Makromeronten (Abb. 3.37, Stern); in den Proben, die mit dem Präserum behandelt wurden, zeigte sich an der definierten Stelle, wo sich die Makromeronten befinden, keine Markierung (Abb. 3.37, Rhombus). Die Markierung in den Makromeronten erfasst mit großer Wahrscheinlichkeit die apikalen Bereiche der reifenden Merozoiten, die sternförmig mit ihren basalen Enden zusammenhaften (siehe auch Abb. 3.34).

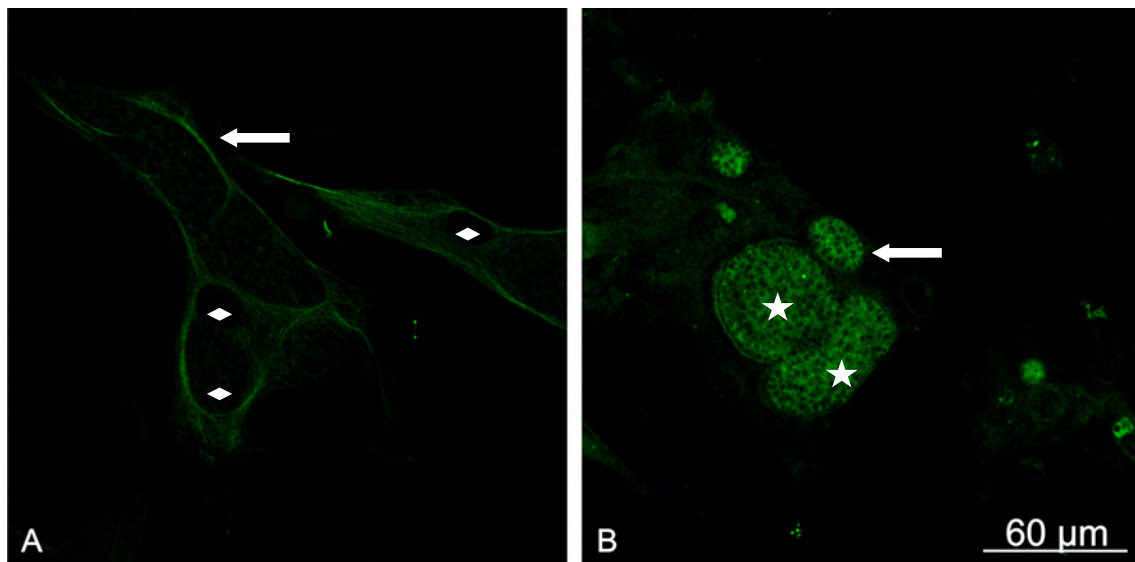


Abb. 3.37: Ergebnis des IIFAT mit dem Antiserum anti-EbMIC4-C-term K1 (B) und dem zugehörigen Präserum K1 (A) in Reaktion mit *E. bovis*-infizierte Wirtszellen (BUVEC, 21. Tag p. i.). Dargestellt ist die Reaktion des Antiserum K1 (1:100) und des Präserum K1 (1:100), wobei eine unspezifische Markierung (Pfeil) erkennbar ist. Sowie eine spezifische Markierung im Bereich der Makromeronten (Stern), die mit dem Präserum nicht nachgewiesen wurde (Rhombus). Zweitantikörper war ein anti-Kaninchen FITC-Konjugat (1:500).

Um festzustellen, ab wann p. i. das Antiserum in infizierten Zellen spezifisch bindet, wurden infizierte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten p. i. als Antigen eingesetzt. Die Untersuchungen erfolgten am KLSM. Vor dem Beginn der ersten Merogonie von *E. bovis* (3.-7. Tag p. i.) zeigte sich gewöhnlich die schwache punktuelle Fluoreszenz der eingedrungenen Sporozoiten (Abb. 3.38-1-A/B, Pfeil). Diese konnten aufgrund ihrer deutlichen Markierung an einem Ende (apikal) als identifiziert werden. Teilweise war auch eine schwache Markierung über die gesamte Länge des Parasiten erkennbar (Abb. 3.38-1-A,

Pfeilspitze), wobei aufgrund der Fixierung nicht genau gesagt werden kann, ob die Fluoreszenz sich im Zytoplasma oder an der Zellmembran befindet.

Mit Umformung in frühe Meronten (10-13 Tage p. i.) wurde die Fluoreszenz zunehmend diffuser und war eher über das gesamte Meronten verteilt (Abb. 3.38-1-C/D, gezahnter Pfeil). Neben den abgerundeten Meronten (Abb. 3.38-1-C, Kreis) waren tlw. die Sporozoiten noch deutlich erkennbar (Abb. 3.38-1-D, Rhombus), ein Zeichen für eine ungleichmäßige Entwicklung der eingedrungenen Sporozoiten.

Ab Tag 15 p. i. vergrößerten sich die Meronten erheblich, begleitet von einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenz in diesen, was auf eine Reifung der ersten Merozoiten schließen lässt (Abb. 3.38-1-E, Stern). Diese Reaktionen nahmen entsprechend im weiteren Verlauf der Entwicklung (17-21 dpi) noch an Intensität zu (Abb. 3.38-1-F, Stern, 3.38-2-G/H).

Im Detail zeigte sich bei den ausgereiften Makromeronten eine kreisförmige Anordnung der Fluoreszenz, die in der Peripherie am stärksten ausgeprägt ist (Abb. 3.38-2-H, eingekreist). Dies beruht auf einer sternförmigen Anordnung der Merozoiten I, die mit dem basalen Pol zur Mitte und dem apikalen Pol nach außen weisen. Am 24. Tag nach der Infektion (Abb. 3.38-2-I/K) traten freie fluoreszierende Merozoiten I in großen Mengen auf, die aus reifen Makromeronten ausgetreten waren. Auch hier war die schon bekannte Markierung am apikalen Ende des Parasiten erkennbar (Abb. 3.38-2-I/K, Pfeil).

Abb. 3.38-3.39: Nachweis von EbMIC4 in *E. bovis*-infizierten BUVEC mit anti-EbMIC4-Cterm im Verlauf der ersten Merogonie im IIFAT.

Dargestellt sind die Reaktionen des Antiserums gegen EbMIC4-Cterm K1 (1:100) im IIFAT in *E. bovis*-infizierten BUVEC-Wirtszellen 3, 7, 10, 13, 15, 17, 21 und 24 Tage p. i. im Verlauf der ersten Merogonie (grün). Zweitantikörper war ein anti-Kaninchen FITC-Konjugat (1:500). Aufgenommen wurden die Bilder am KLSM mit identischen Bedingungen und bei der anschließenden Bildbearbeitung gleich behandelt.

In der frühen Phase der Entwicklung (3./7. Tag p. i.) sind die eingedrungenen Sporozoiten mit einer starken Markierung an einem Pol erkennbar (A/B, Pfeil). Teilweise ist daneben eine schwache diffuse Fluoreszenz sichtbar (A/B, Pfeilspitze). In den anschließenden Tagen wurden frühe Meronten sichtbar, wobei die Fluoreszenz zunehmend diffuser wurde (gezahnter Pfeil). Dabei traten abgerundete (Kreis), sowie noch nicht soweit entwickelte, im Abrunden befindliche Stadien auf (Rhombus). Ab dem 15. Tag (E) sind kleine fluoreszierende Meronten mit Merozoiten I sichtbar (E, Stern), die in den nächsten Tagen an Größe zunehmen (F, Stern, G, H). Ab dem 24. Tag p. i. (J/K) wurden Merozoiten I freigesetzt, die die typische apikale Markierung aufwiesen (K, Pfeil).

3 dpi, etc.: 3. Tag p.i., etc

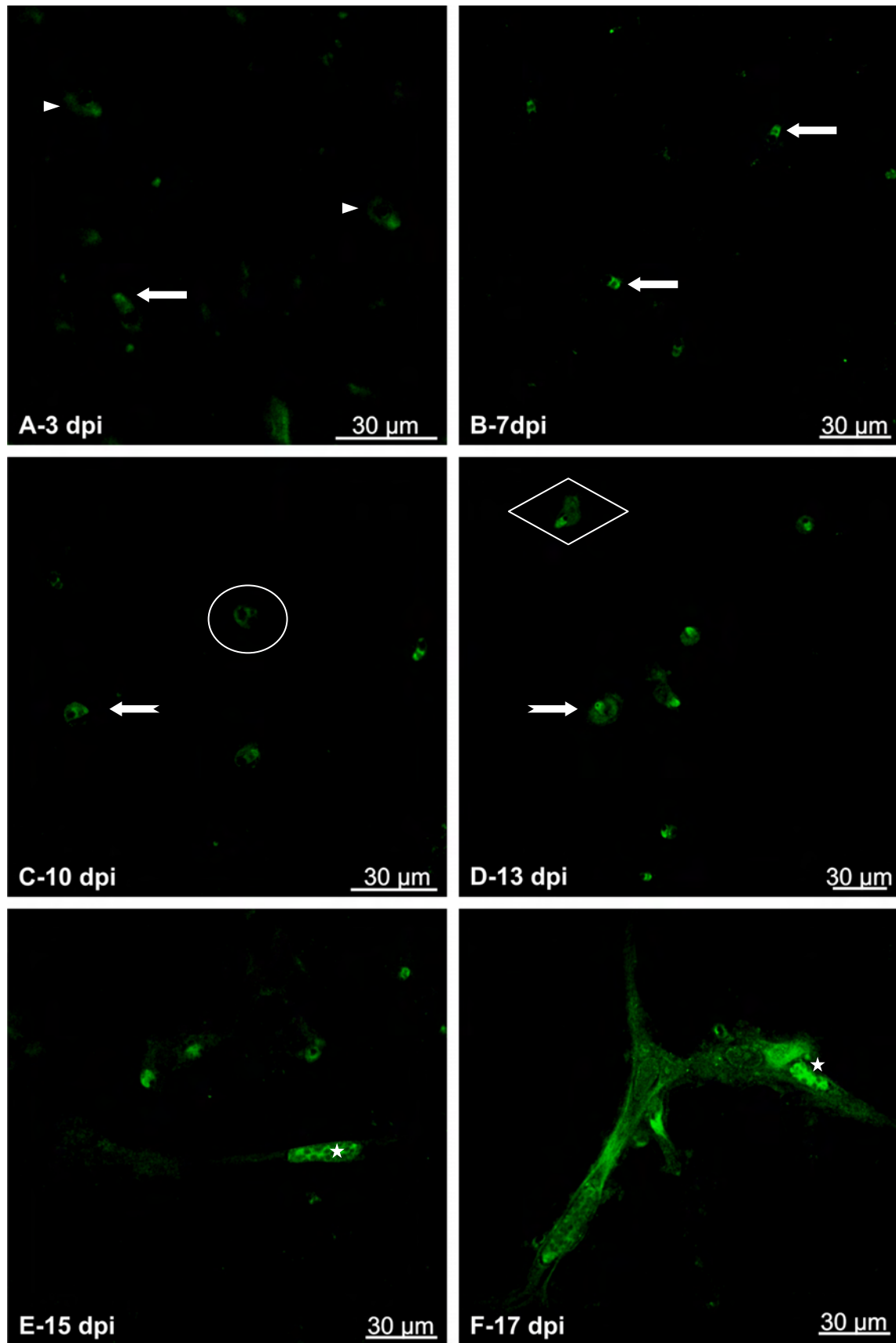


Abb. 3.38-1: Nachweis von EbMIC4 in *E. bovis*-infizierten BUVEC [3-17. Tag p. i (dpi)].

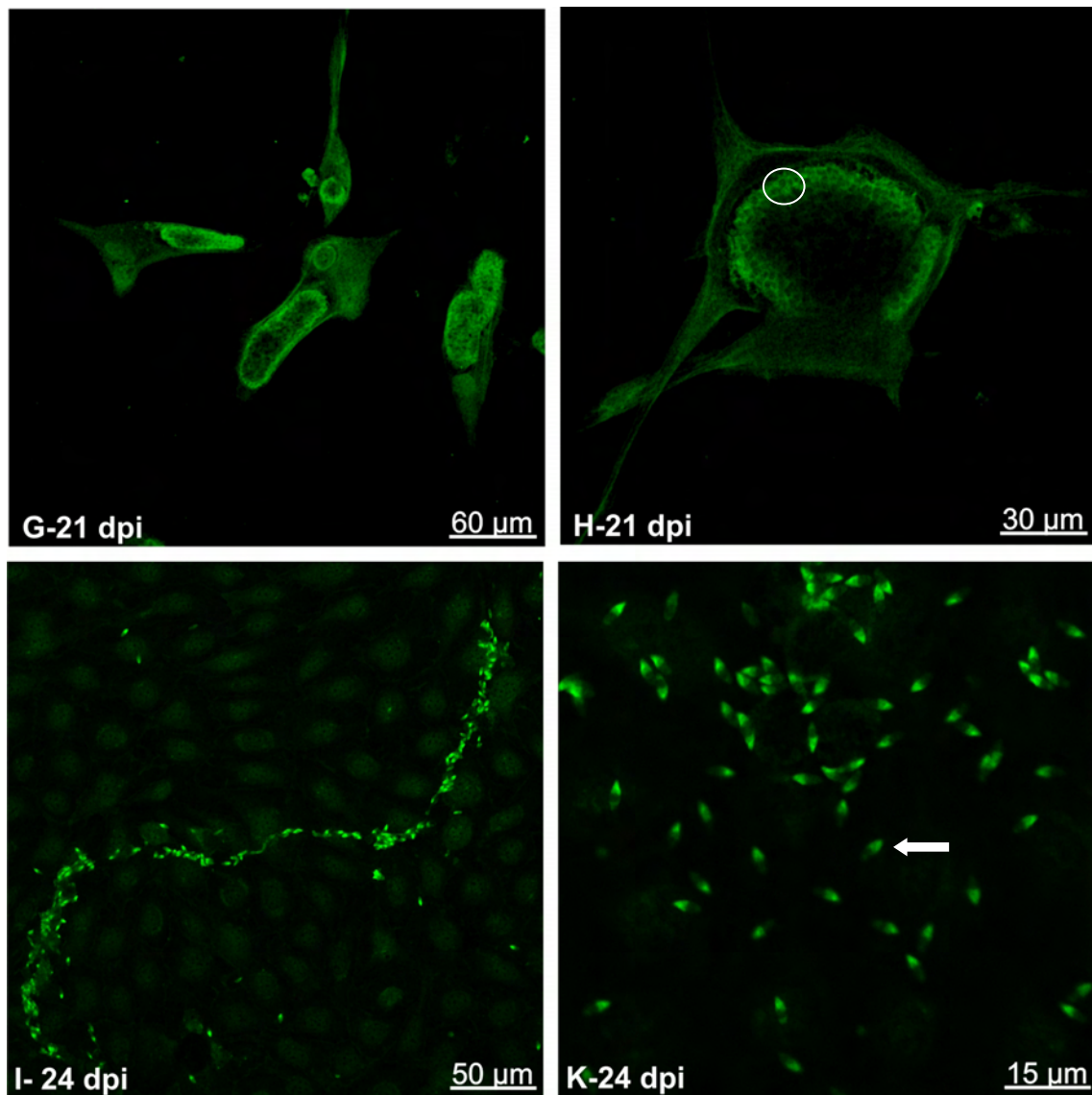


Abb. 3.39-2: Nachweis von EbMIC4 in *E. bovis*-infizierten BUVEC [21-24. Tag p. i (dpi)].

Bilder vom 21 Tag p. i. wurden mit den gleichen Bedingungen aufgenommen wie die Bilder vom 3.-17. Tag p. i. Die Bilder 24. Tag p. i. wurden später aufgenommen und bearbeitet.

Gut sichtbar ist die apikale Markierung der aus den Makromeronten ausgetretenen Merozoiten I (C, D). Es wurden Übersichtsbilder (A, C) sowie Detailaufnahmen (B, D) dargestellt.

Weitere Aufnahmen vom 21. Tag p. i. mit reifen Makromeronten wurden in den Abbildungen 3.39 zusammengefasst. Neben Übersichtsaufnahmen (Abb. 3.39-A/B), sind Detailaufnahmen, die als Einzelbild (Abb. 3.39-C) aufgenommen wurden sowie Stapelaufnahme durch den gesamten Makromeronten (Abb. 3.39-D), dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Fluoreszenz entweder über den gesamten Makromeronten gleichmäßig verteilt war (Abb. 3.39-A/D, Pfeil) oder zur Mitte hin abnimmt, was vor allem auf die größeren Meronten (Abb. 3.39-D, Pfeilspitze) zutraf und somit eher ein methodische Problem darstellte (Eindringtiefe der Antikörper). Gut erkennbar sind einzelne Merozoiten I in einem reifen

Makromeronten (Abb. 3.39-C) mit ihrer typischen Markierung am nach außen zeigenden Pol (Abb. 3.39-C, Kreis).

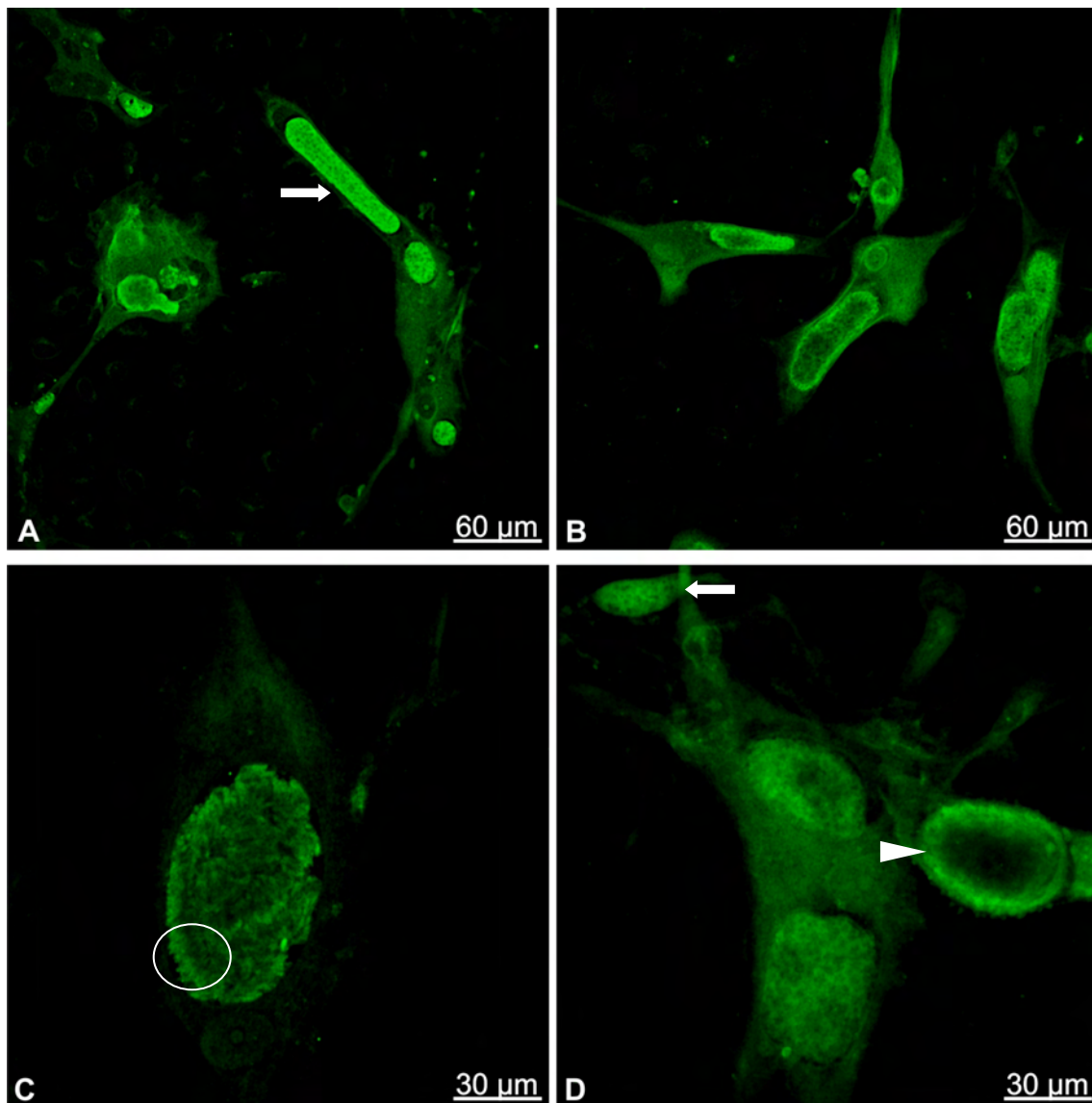


Abb. 3.39: Nachweis von EbMIC4 in *E. bovis*-infizierten BUVEC [21. Tag p. i. (21 dpi)] (IIFAT). Dargestellt ist die Lokalisierung von EbMIC4 mit Hilfe des Antiserums anti-EbMIC4-Cterm K1 (1:100) in reifen Makromeronten. Erkennbar ist eine deutliche Markierung, im Inneren der Makromeronten, die mit fast reifen Merozoiten I voll gepackt sind.

A–B Übersichtsbilder, Positionen der Makromeronten im Monolayer, **C**–Detailaufnahmen, die als Einzelbild aufgenommen wurden und **D**–zusammengesetzte Stabelaufnahmen durch mehrere Makromeronten. Zweitantikörper war ein anti-Kaninchen FITC-Konjugat (1:500).

3.7 Immunologische Kreuzreaktionen zwischen EbMIC4 und EtMIC4

Für Kreuzreaktionsstudien mittels IIFAT stand ein Antiserum gegen das Gesamtprotein EtMIC4 (freundlicherweise überlassen von der Dr. Tomley, Institute of Animal Health, Compton, GB) zur Verfügung.

Methanol-fixierte *E. bovis*-Sporozoiten, die mit Anti-EtMIC4 inkubiert wurden, zeigten eine deutlichere Reaktion im apikalen Bereich der Sporozoiten (Abb. 3.28, Dreieck). Daneben war eine diffuse und deutlich schwächere Fluoreszenz im gesamten Parasitenkörper erkennbar (Abb. 3.28, Stern). Zur besseren Darstellung und Positionierung wurden die Sporozoiten mit Evans Blue gegengefärbt, das in den refraktilen Körperchen akkumulierte und sich als rote Färbung dargestellt.

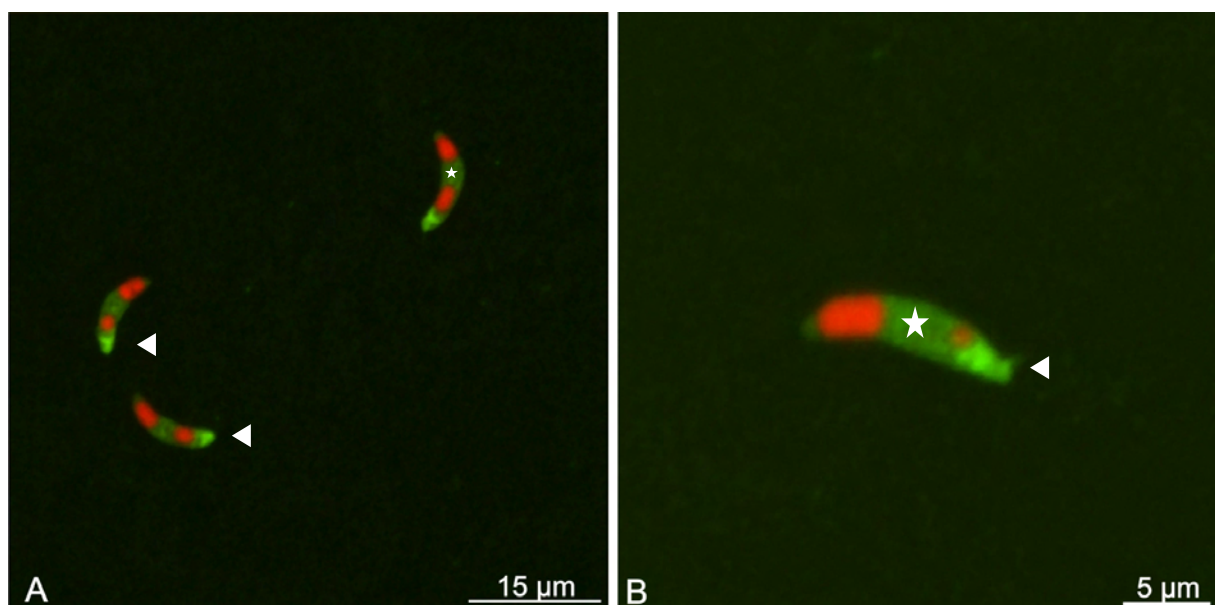


Abb. 3.40: Reaktionen von anti-EtMIC4 mit *E. bovis*-Sporozoiten (MEOH-fixiert; IIFAT).

Die Behandlung der Sporozoiten mit anti-EtMIC4 (1:20), sichtbar gemacht mit dem anti-Kaninchen FITC-Konjugat (1:500), führte zu einer spezifischen Reaktion (grüne Fluoreszenz). Vor allem im apikalen Bereich (Pfeilspitze) der *E. bovis*-Sporozoiten war die Markierung sehr deutlich, z. T. auch in abgeschwächter Form über den gesamten Parasiten verteilt (Stern) bis zum basalen Ende sichtbar.

Die Gegenfärbung mit EvansBlue (rot) führte zur Rotfärbung der refraktilen Körperchen.

Bei Methanol-fixierten *E. bovis*-Merozoiten I war nach Testung mit anti-EtMIC4 eine über den gesamten Parasiten verteilte Fluoreszenz erkennbar (Abb. 3.29, grün). Sie erschien an einem Ende intensiver und machte dort ungefähr $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ der Gesamtlänge aus (Abb. 3.29, Pfeilspitze). Die diffuse Fluoreszenz über den gesamten Parasiten war bei Merozoiten I stärker ausgeprägt als bei Sporozoiten (Abb. 3.29, Stern).

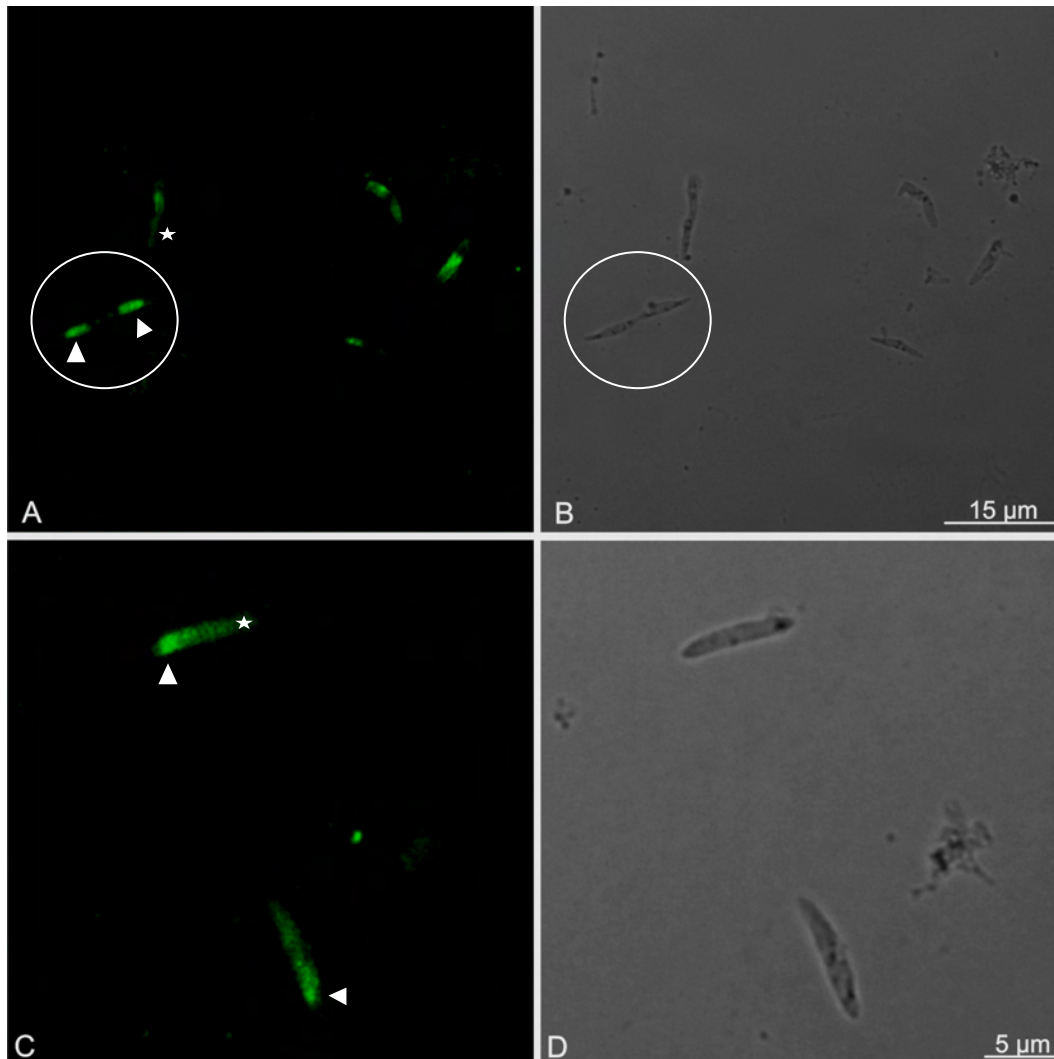


Abb. 3.41: IIFAT mit anti EtMIC4 auf *E. bovis*-Merozoiten (MEOH-fixiert).

Die Behandlung der Sporozoiten mit anti-EtMIC4 (1:20), sichtbar gemacht mit dem anti-Kaninchen FITC-Konjugat (1:500), führte zu einer stärkeren spezifischen Fluoreszenz (grün) im apikalen Bereich (Pfeilspitze) der *E. bovis*-Merozoiten und zu einer schwächeren Reaktion über den gesamten Parasiten verteilt bis zum basalen Ende (Stern). Da die Gegenfärbung mit EvansBlue nicht durchgeführt werden konnte (keine Refraktilen Körperchen), wurden zur besseren Identifizierung der Merozoiten I alle Aufnahmen im Durchlicht aufgenommen. Einkreist, zwei Merozoiten, deren apikale Bereiche von einander wegzeigen (Kreis).

Größenangabe identisch für A und B bzw. C und D.

3.8 Untersuchungen zur Sekretion und Oberflächenverteilung von EbMIC4

Mikronemenproteine sind wichtig für die Fortbewegung und Invasion des Parasiten in seine Wirtszelle. Untersuchungen an *T. gondii* zeigten, dass die Exozytose der Mikronemen durch ein Ca^{2+} -Signal vermittelt wird und die Mikronemenproteine an die Parasitenoberfläche gelangen (Carruthers and Sibley, 1999). Bei *T. gondii* und *E. tenella* konnte diese Sekretion durch die Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen ausgelöst werden, ohne dass der Parasit mit der Wirtszelle konfrontiert war. Die Behandlung von *T. gondii*-Tachyzoiten mit den Ca^{2+} -Ionophoren Ionomycin und A23187 führte zu einem Anstieg der Sekretion von TgMIC2 und einer Verteilung des Proteins auf der Parasitenoberfläche hin zum basalen Pol. Dieser Effekt konnte mit der gleichzeitigen Behandlung mit BAPTA-AM, einen hochselektiven Chelator für intrazelluläres Ca^{2+} unterbunden werden (Carruthers and Sibley, 1999). Eine gleichzeitige Behandlung mit Cytochalasin D, das die Aktin-basierende Bewegung blockiert, führte zu einer Veränderung des Verteilungsmusters von TgMIC2 auf der Oberfläche der Tachyzoiten. TgMIC2 wurde nur noch am apikalen Pol der Tachyzoiten detektiert (Carruthers and Sibley, 1999). Daneben führte die Behandlung von *T. gondii*-Tachyzoiten mit Ethanol und Azetaldehyd gleichfalls zu einer Mikronemensekretion (Carruthers et. al., 1999). Bei *E. tenella* führte die Behandlung mit Ethanol und Ca^{2+} -Ionophoren zu keiner Sekretion von EtMIC1 und EtMIC2 (Wiersma et. al., 2004). Wurden *E. tenella*-Sporozoiten dagegen mit FKS oder Albumin behandelt konnte eine Erhöhung der Sekretion von EtMIC2 beobachtet werden. Dabei breitete sich EtMIC2 über die gesamte Oberfläche hin zum basalen Pol aus, was durch die gleichzeitige Behandlung mit Cytochalasin D unterbunden wurde (Bumstead and Tomley, 2000).

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, welchen Einfluss bestimmte Substanzen auf die Sekretion und die Oberflächenverteilung von EbMIC4 in *E. bovis*-Sporozoiten besitzt. Dazu wurden frisch isolierte *E. bovis*-Sporozoiten in PBS oder RPMI-Medium unterschiedlichen chemischen Behandlungen unterworfen. FKS-freies RPMI-Medium hat dabei den gleichen Einfluss auf die EbMIC4-Lokalisation wie PBS. Neben FKS und Ethanol wurden Ionomycin sowie Cytochalasin D verwendet. Abgelöste Vero-Zellen dienten als Positivkontrolle.

In der Abb. 3.42 ist die Verteilung von EbMIC4 nach 5-minütiger Inkubation dargestellt. Die rote Markierung der refraktilen Körperchen beruht auf einer Gegenfärbung mit Evans Blue. Die mit PBS behandelten Sporozoiten (Negativkontrolle) wiesen eine schwache Immunreaktion im apikalen Bereich des Parasiten auf (Abb. 3.42-A, Pfeil). Neben einer schwachen, diffusen Markierung im gesamten Sporozoiten, zeigte sich die stärkste Färbung

im vorderen Drittel des Apikalbereichs (Abb. 3.42-A, Stern) dicht an der Plasmamembran. Bei den Sporozoiten, die mit potentiellen Wirtszellen (Vero-Zellen) inkubiert wurden, zeigten einige, verglichen mit PBS-Kontrollen, eine wesentlich stärkere apikale Färbung, die zudem ausgedehnter erschien (Abb. 3.42-B, Pfeil). Eine Behandlung mit 3% FKS- oder 1% EtOH führte ebenfalls zur Verstärkung des Signals im apikalen Bereich, insbesondere im vorderen Bereich (Abb. 3.42-C/D, Pfeil). Die mit Ionomycin behandelten Sporozoiten zeigten kein eindeutiges Bild; sowohl kaum oder schwach gefärbte Sporozoiten (Abb. 3.42-E, Stern) als auch im apikalen Bereich stärker fluoreszierende Parasiten (Abb. 3.42-E, Pfeilspitze) waren zu beobachten. Die gleichzeitige Behandlung mit Ionomycin und Cytochalasin D führte zu einer vollständigen Unterdrückung des EbMIC4-Signals (Abb. 3.42-F).

Nach einer Inkubationszeit von 30 min (Abb. 3.43) zeigten die in PBS inkubierten Sporozoiten eine schwache Markierung am apikalen Bereich (Abb. 3.43-A, Stern), deren intensivste Bereiche im vorderen Bereich dicht an der Plasmamembran (Abb. 3.43-A, Pfeilspitze) auftraten. Sporozoiten, die mit Vero-Zellen (Positivkontrolle) konfrontiert waren, zeigten unter gleichen Bedingungen eine wesentlich intensivere Markierung (Abb. 3.43-B, Pfeil) wie auch die Parasiten, die mit 3% FKS behandelt wurden (Abb. 3.43-C, Pfeil). Die Färbung war flächig über den gesamten vorderen Teil des Parasiten verteilt mit der intensivsten Reaktion nahe des vorderen Pols (Abb. 3.43-B/C, Pfeilspitze). Sporozoiten, die in 1% EtOH inkubiert waren, zeigten eine schmale, am apikalen Pol befindliche Markierung entlang der Membran (Abb. 3.43, Pfeilspitze), die sich nicht vom Bild der PBS-Kontrolle unterschied. Die Behandlung mit Ionomycin ergab wiederum kein eindeutiges Bild. Es waren Sporozoiten zu finden die eine spezifische Markierung am apikalen Pol aufwiesen (Abb. 3.43-E, Pfeilspitze) oder Parasiten mit einer diffus verteilten, schwachen Markierung über die vordere Hälfte des Parasiten (Abb. 3.43-E, Stern). Bei Sporozoiten, die gleichzeitig mit Ionomycin und Cytochalasin D behandelt wurden (Abb. 3.43-F), konnte EbMIC4 nicht nachgewiesen werden.

Generell kann festgestellt werden, dass die längere Inkubationszeit bei den *E. bovis*-Sporozoiten, die entweder mit Vero-Zellen konfrontiert waren oder mit 3% FKS behandelt wurden, zu einer deutlichen Verstärkung der EbMIC4-Markierung im apikalen Bereich, verglichen mit der PBS-Kontrolle, führten. Dem gegenüber zeigten die Sporozoiten, die mit 1% EtOH, 2 μ M Ionomycin oder 2 μ M Ionomycin und 25 μ g/ml Cytochalasin D behandelt wurden, keine signifikanten Veränderungen gegenüber der kürzeren Inkubationszeit.

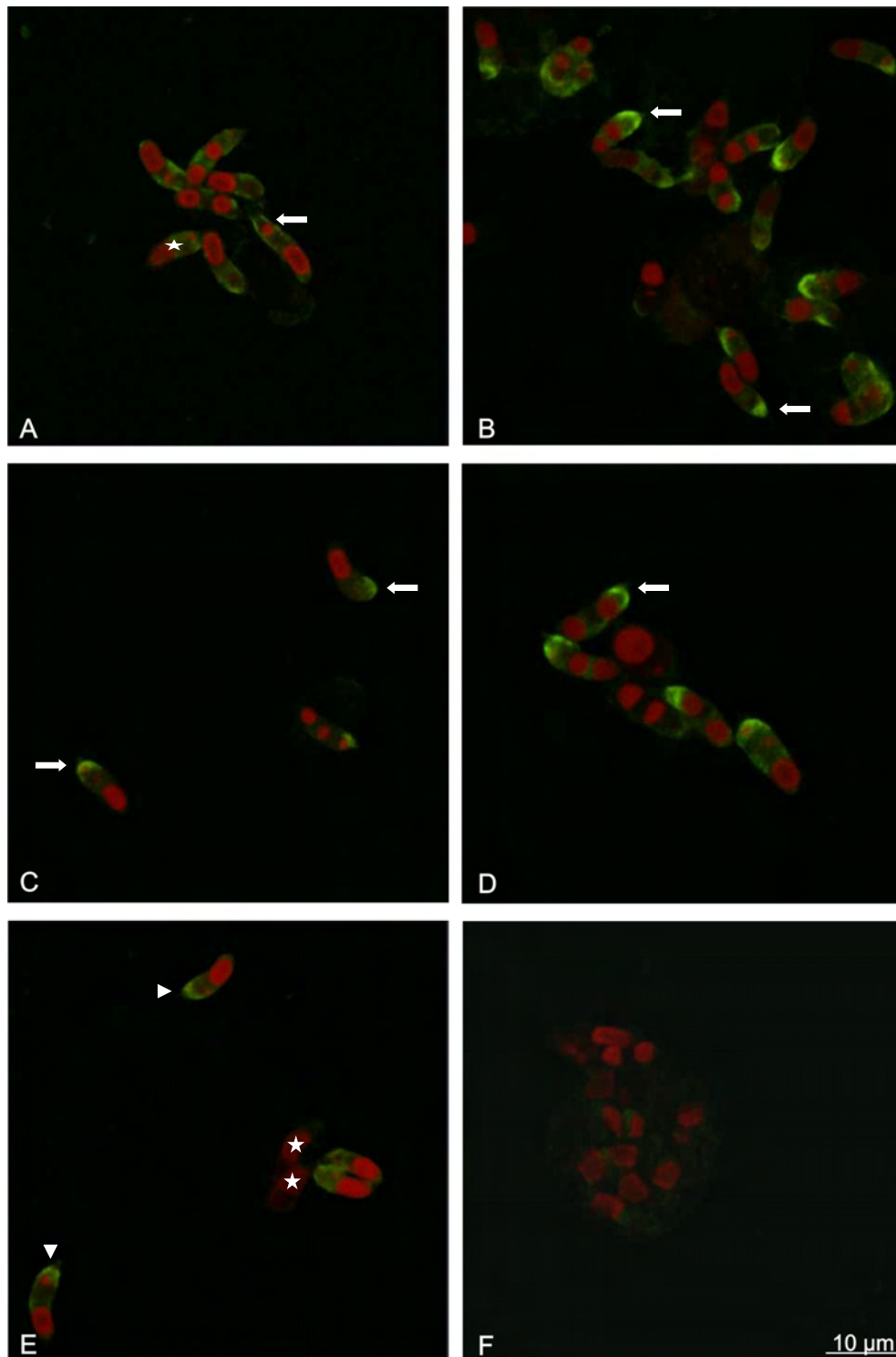


Abb. 3.42: Einfluss unterschiedlicher Behandlungen auf die Lokalisation von EbMIC4 in *E. bovis*-Sporozoiten nach 5 min Inkubation.

E. bovis-Sporozoiten wurden mit verschiedenen Substanzen 5 min behandelt, danach sofort mit MeOH fixiert. EbMIC4 wurde dann im IIFAT mit anti-EbMIC4-Cterm K1 (1:50) und dem anti-Kaninchen-FITC- Konjugat (1:500), wie unter 2.10 beschrieben, nachgewiesen. Gekennzeichnet wurden die Markierung vom Antiserum gegen EbMIC4 (Pfeil, Pfeilspitze) und die Gegenfärbung der refraktilen Körperchen mit Evans Blue (Stern).

A - PBS (Negativkontrolle), B - PBS und Vero-Zellen (Positivkontrolle), C - 3% FKS in RPMI-Medium, D - 1% Ethanol in PBS, E - 2 µM Ionomycin in PBS, F - 2 µM Ionomycin und 25 µg/ml Cytochalasin D in PBS; Größenangabe gilt für alle Aufnahmen

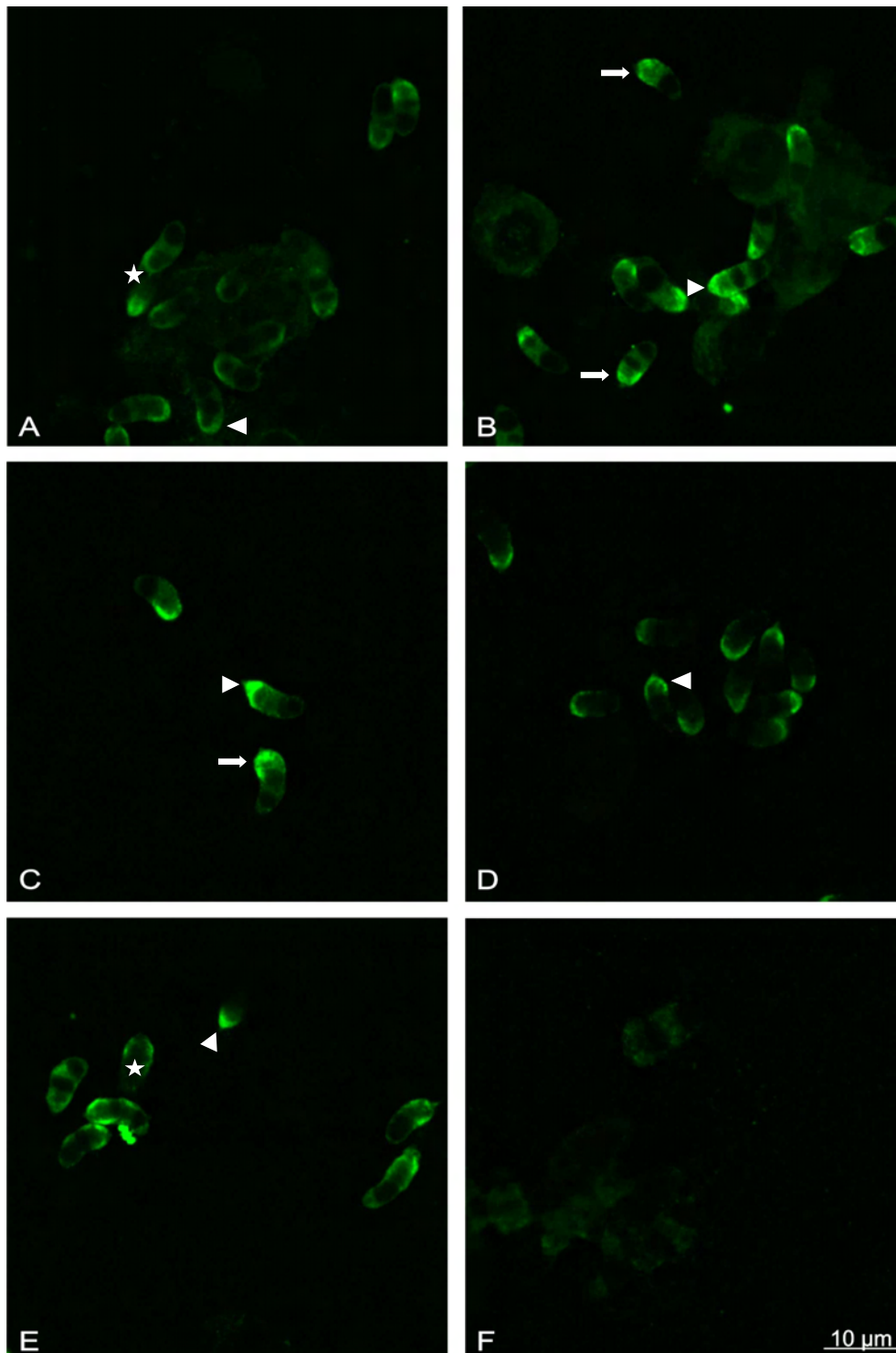


Abb. 3.43: Einfluss unterschiedlicher Behandlungen auf die Lokalisation von EbMIC4 in *E. bovis*-Sporozoiten nach 30 min Inkubation.

E. bovis-Sporozoiten wurden mit verschiedenen Substanzen 30 min behandelt, danach sofort mit MeOH fixiert. EbMIC4 wurde im IIFAT mit anti-EbMIC4-Cterm K1 (1:50) und dem anti-Kaninchen-FITC- Konjugat (1:500), wie unter 2.10 beschrieben, nachgewiesen.

A - PBS (Negativkontrolle), B – PBS und Vero-Zellen (Positivkontrolle), C - 3% FKS in RPMI-Medium, D - 1% Ethanol in PBS, E - 2 µM Ionomycin in PBS, F - 2 µM Ionomycin und 25 µg/ml Cytochalasin D in PBS; Größenangabe gilt für alle Aufnahmen

3.9 Suche nach potentiellen Interaktionspartnern des C-Terminus von EbMIC4

Neben der Identifikation der Sequenz von Ebmic4 und Lokalisationsstudien sollte auch nach potentiellen Bindungspartnern von EbMIC4 gesucht werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass der C-Terminus eines anderen Mikronemenproteins (TgMIC2) von *Toxoplasma gondii* mit der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase interagiert, die das Bindeglied zum Aktin-Myosinkomplex darstellt (Jewett and Sibley 2003). Damit konnte für *T. gondii* ein Modell zum Mechanismus der Fortbewegung auf der Oberfläche der Wirtszelle und zur Invasion der Wirtszelle entwickelt werden (Soldati and Meissner, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Suche nach Interaktionspartnern von EbMIC4 zwei Ansätze verfolgt: 1. mit einem „GST-Fusionsprotein-Pull-Down-Experiment“, 2. mit der Suche nach der Interaktion zweier bekannter Proteine mit dem Yeast-Two-Hybrid-System.

3.9.1 GST-Fusionsprotein-Pull-Down-Experiment

Um nach potentiellen Interaktionspartnern des zytoplasmatisch gelegenen Teils von EbMIC4 zu suchen, wurde zunächst ein GST-Pulldown-Assay durchgeführt. Dazu wurde der zytosolisch lokalisierte Teil des C-Terminus von EbMIC4 (gleiche Bereich wie beim für die Immunisierung verwendeten Antigen; s. Kap. 3.6.1.1.2) rekombinant so exprimiert, dass er über eine Linkerregion mit Gluthathion-S-Transferase (GST) verbunden war. Dieses rekombinant hergestellte zweiteilige Protein wurde dann an Sepharose über GSH-Bindungen stabil gekoppelt (2.9.4.1) und mit dem nativ hergestellten Proteinextrakt von *E. bovis*-Merozoiten I unter nativen Bedingungen mit ATP inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden eventuell gebundenen Proteine mit reduzierendem Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt [das Experiment wurde in Anlehnung an Jewett and Sibley (2003) durchgeführt].

Es konnten jedoch keine Proteine identifiziert werden, die an den EbMIC4-C-Terminus gebunden hatten.

3.9.2 Untersuchungen mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems (YTH-System)

3.9.2.1 Klonierung der prey (Beute)- und bait (Köder)-Konstrukte für *T. gondii*

Mit dem YTH-System wurde explizit nach einer möglichen Interaktion des C-Terminus von EbMIC4 und der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase von *E. bovis* geschaut. Als Positivkontrolle sollte die bei *T. gondii* beschriebene Interaktion des C-Terminus' von

TgMIC2 mit der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (TgAldolase) (Jewett and Sibley, 2003) dienen. Dazu mussten die DNA-Sequenzen der potentiellen Bindungspartnern in Hefenvektoren kloniert und anschließend in Hefen kotransformiert werden.

Für TgMIC2 (Zugangsnummer AAB63303) und TgAldolase (Zugangsnummer AAN75043) waren die Sequenzen bekannt. Sie wurden mittels RT'-PCR amplifiziert und anschließend in den pDrive-Vektor kloniert, um sie dann in die entsprechenden Hefevektoren umzuklonieren. Die Amplifikation der TgAldolase-Sequenz erfolgte mit den spezifischen Primern HeScTgMIC2-pBridge-for(*Bam*HI) und HeScTgMIC2-pBridge-rev(*Pst*I); gleichzeitig wurden die später benötigten Restriktionsschnittstellen anhängt. Nach der erfolgreichen Ligation in den pDrive-Vektor wurde das Insert mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I ausgeschnitten und in die MCS I des linearisierten Gal4-Bindedomänen-Vektors pBridge gerichtet und in frame ligiert. Für TgMIC2 wurde in mehreren unterschiedlichen Ansätzen (Primerpaarungen, siehe Tabelle 3.8) versucht, die Sequenz als Vollängenklon oder in zwei Teilsequenzen zu amplifizieren. Die Ligation in den pDrive Vektor war in jedem Ansatz erfolgreich, doch war die Umklonierung in den Gal4-Aktivierungsdomänen-Vektor pACT2 nicht eindeutig zu belegen; eine Positivkontrolle war somit nicht gesichert. In Abb. 3.44 wird der Aufbau der Hefevektoren nach einer erfolgreichen Klonierung schematisch dargestellt.

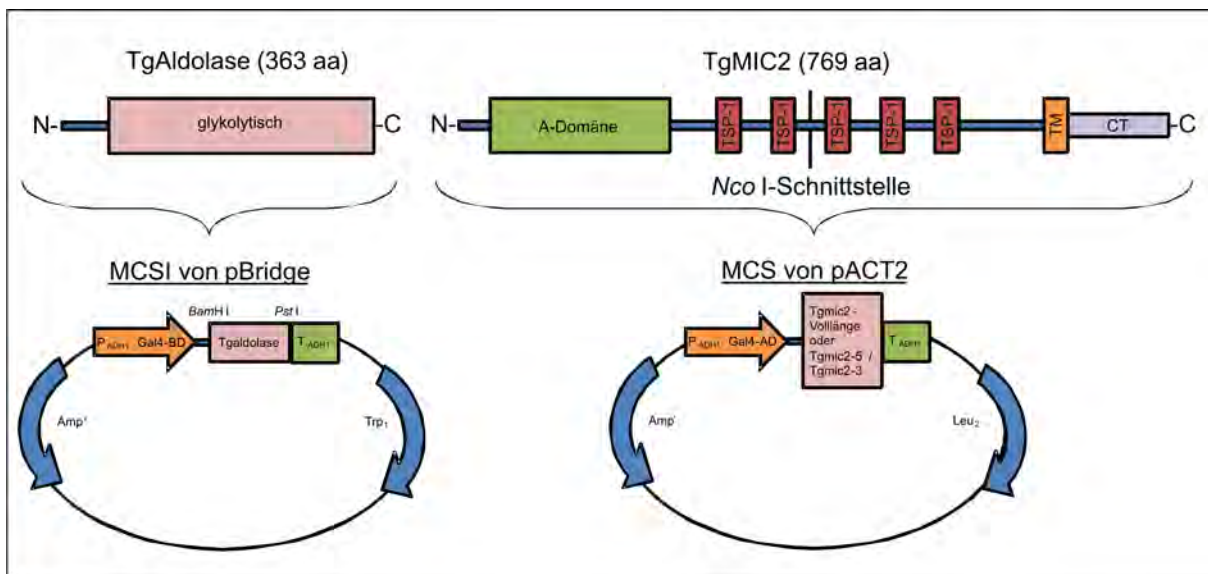


Abb. 3.44: Schematische Darstellung der prey- und bait-Konstrukte für TgAldolase und TgMIC2.

Die DNA-Sequenz für TgAldolase wurde in MCS I des bait-Vektors pBridge ligiert.

Die kodierende DNA-Sequenz für Tgmic2 wurde neben dem Vollängenklon in zwei unterschiedlichen Ansätzen versucht in den prey-Vektor pACT2 zu klonieren. Dabei wurde versucht die DNA-Sequenz der 5'-Teilsequenzen und der 3'-Teilsequenz zu ligieren. Trotz verschiedenster Primerkombinationen mit unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen konnte nicht eindeutig davon ausgegangen werden, dass es gelungen war, die Tgmic2-Sequenz in den Hefevektor pACT2 umzuklonieren.

Tabelle 3.8: Verwendete Primerkombination für die Klonierung von Tgm2 in pACT2-Vektor.

Klon	Primerkombination	Größe (bp)
Tgm2-Volllänge	HeScTgMIC2-pACT2for(<i>EcoRI</i>) HeScTgMIC2-pACT2rev(<i>XhoI</i>)	2307
Tgm2-5' Teilsequenz	HeScTgMIC2-pACT2for(<i>EcoRI</i>) HeScTgMIC2middle-pACT2rev(<i>NcoI</i> , <i>XhoI</i>)	941
Tgm2-5' Teilsequenz	HeScTgMIC25'-pACT2for(<i>SmaI</i>) HeScTgMIC2middle-pACT2rev(<i>NcoI</i> , <i>XhoI</i>)	941
Tgm2-3' Teilsequenz	HeScTgMIC2middle-pACT2for(<i>NcoI</i> , <i>EcoRI</i>) HeScTgMIC2-pACT2rev(<i>XhoI</i>)	1369
Tgm2-3' Teilsequenz	HeScTgMIC2middle-pACT2for(<i>NcoI</i> , <i>EcoRI</i>) HeScTgMIC2-pACT2rev(<i>SmaI</i>)	1369

3.9.2.2 Klonierung der prey (Beute)- und bait (Köder)-Konstrukte für *E. bovis*

3.9.2.2.1 Identifizierung der DNA-Sequenz von EbAldolase

Die DNA-Sequenz von EbAldolase war bisher noch nicht bekannt und sollte über eine Amplifikation mit degenerierten Primern identifiziert werden. Mittels Multialignment wurden die DNA-Sequenzen unterschiedlicher Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolasen von verschiedenen Apikomplexa-Arten miteinander verglichen und aufgrund dieser Sequenzinformationen wurden degenerierte Primer konzipiert (Abb. 3.45).

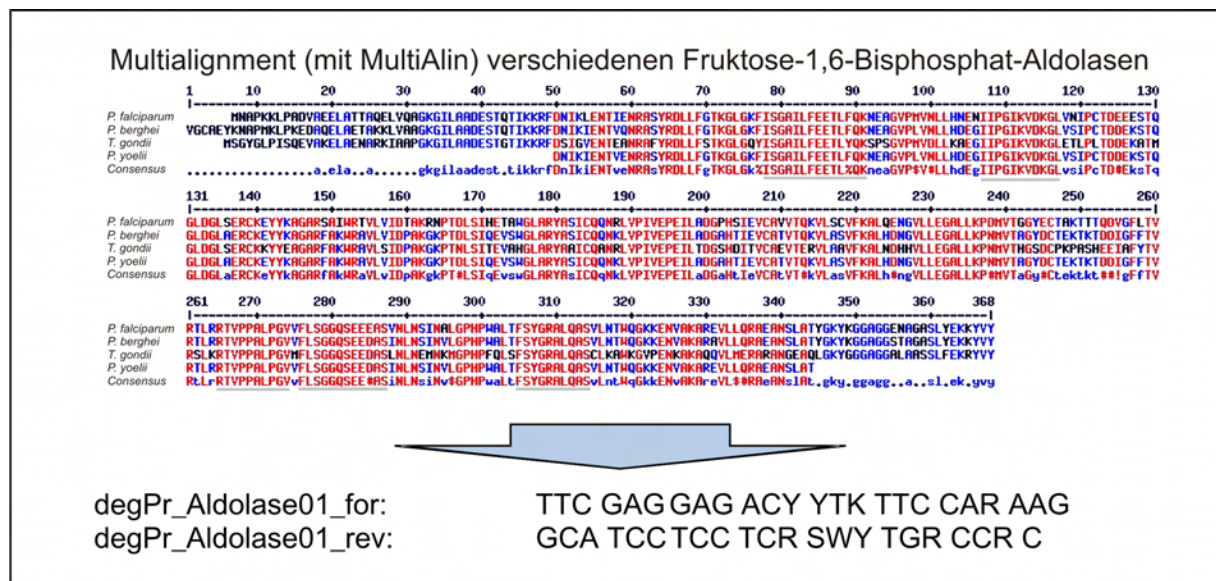


Abb. 3.45: Auswahl degenerierter Primer für die Identifikation der EbAldolase-Sequenz.

Grundlage war ein Multialignment verschiedener Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolasen von anderen Apikomplexa-Arten (*P. falciparum*, *P. berghei*, *T. gondii* und *P. yoelii*). Hochkonservierte Bereiche (rot, doppelt unterstrichen) dienten als Vorlage für die degenerierten Primer.

Die Amplifikation erfolgte mittels RT'-PCR, wobei die RT'-Reaktion mit Total-RNA aus *E. bovis*-Merozoiten sowie -Sporozoiten und einem OligodT(20)-Primer durchgeführt wurde. Die anschließende PCR erfolgte mit den degenerierten Primern. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die erhaltenen Produkte in den pDrive-Vektor kloniert und sequenziert. Es konnte eine Teilsequenz von EbAldolase (ca. 1000 bp) identifiziert werden (Sequenz im Anhang A, zu 3.4).

Diese Sequenz war die Grundlage für einen „Genome Walking“-Ansatz zur Identifizierung der vollständigen Sequenz von EbAldolase. Mit verschiedenen Primerkombinationen wurde nach den 3'- und 5'-Enden gesucht (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Primerkombinationen für die Identifikation der vollständigen DNA-Sequenz von EbAldolase mittels „Genome Walking“.

Gesuchte Sequenz	Primer (SP1 und SP2)
EbAldolase-5'-Ende	GW_EbAldolase_SpecPr01_outer_rev GW_EbAldolase_SpecPr01_nested_rev
EbAldolase-3'-Ende	GW_EbAldolase_SpecPr01_outer_for GW_EbAldolase_SpecPr01_nested_for

Die Amplifikate wurden in den pDrive-Vektor kloniert und sequenziert. Identifiziert wurde das bisher fehlende 3'-Ende der DNA-Sequenz von EbAldolase. Aufgrund eines großen Introns am 5'-Ende der identifizierten DNA-Sequenz konnte der Anfang der kodierenden DNA-Sequenz nicht vollständig erfasst werden (Sequenz im Anhang A, zu 3.4). Verglichen mit der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase von *T. gondii* (Abb. 3.46) auf Proteinsequenzebene, war das fehlende Stück 15 bp lang. Für den YTH-Ansatz wurde die fehlende Sequenz von TgAldolase übernommen und mittels spezifischer Primer vor die bekannte Sequenz während der Amplifikation gehängt.

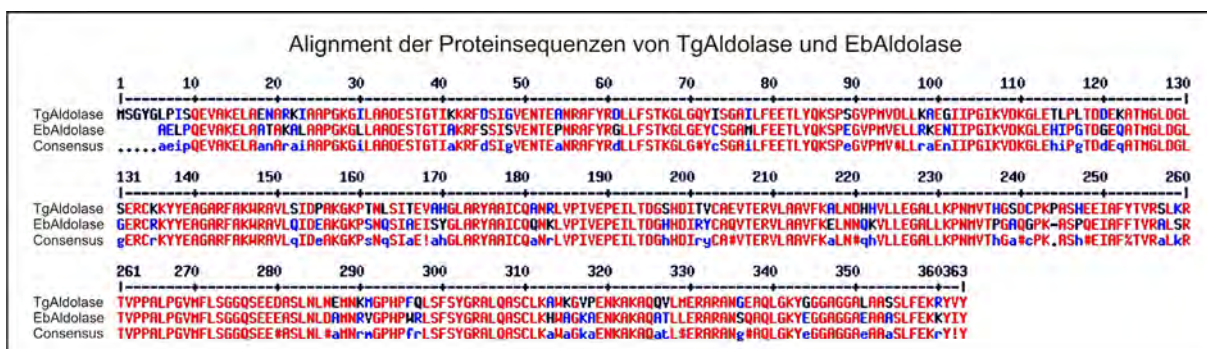


Abb. 3.46: Alignment der Proteinsequenzen von TgAldolase und EbAldolase.

Sichtbar wird, dass am N-terminalen Ende der Sequenz von EbAldolase fünf Aminosäuren fehlen, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten. Diese wurden für den YTH-Ansatz von der TgAldolase übernommen und angehängt.

3.9.2.2.2 Klonierung des bait-Konstruktes für *E. bovis*

Die kodierende DNA-Sequenz der EbAldolase wurde über einen RT'-PCR-Ansatz amplifiziert. Die cDNA wurde mittels RT'-Reaktion mit einem OligodT(20)-Primer und der Total-RNA aus *E. bovis*-Merozoiten als Template hergestellt. Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte mit dem Primerpaar HeScEbAldo_pBridge_for(5' *Bam*HI) und HeScEbAldo_pBridge_rev(3' *Pst*I), wobei an dem vorwärtsgerichteten Primer hinter der Restriktionsschnittstelle die 15 fehlenden Basen eingefügt wurden. Nach der Ligation des Amplifikationsproduktes in den pDrive-Vektor wurde das Insert mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I ausgeschnitten und in die MCSI des vorbereiteten Gal4-Bindedomänen-Hefevektors pBridge gerichtet und in frame ligiert.

3.9.2.2.3 Klonierung des prey-Konstrukte für *E. bovis*

Die entsprechende DNA-Sequenz vom C-terminalen Ende von EbMIC4 war bereits und im Klon GW_2Bf#7 in pDrive kloniert. Die Amplifikation für den YTH-Ansatz erfolgte mit den Primern He-ScEbMIC4_pACT2_for(5' *Bam*HI) und He-ScEbMIC4_pACT2_rev(3' *Xho*I). Das Amplikat wurde auch hier zuerst in den pDrive-Vektor ligiert, dann mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I ausgeschnitten und gerichtet und in frame in den linearisierten Gal4-Aktivierungsdomäne-Hefevektor pACT2 ligiert und in kompetente *E. coli* transformiert.

Nachfolgend ist der Aufbau der Hefevektoren nach einer erfolgreichen Klonierung schematisch dargestellt (Abb. 3.47).

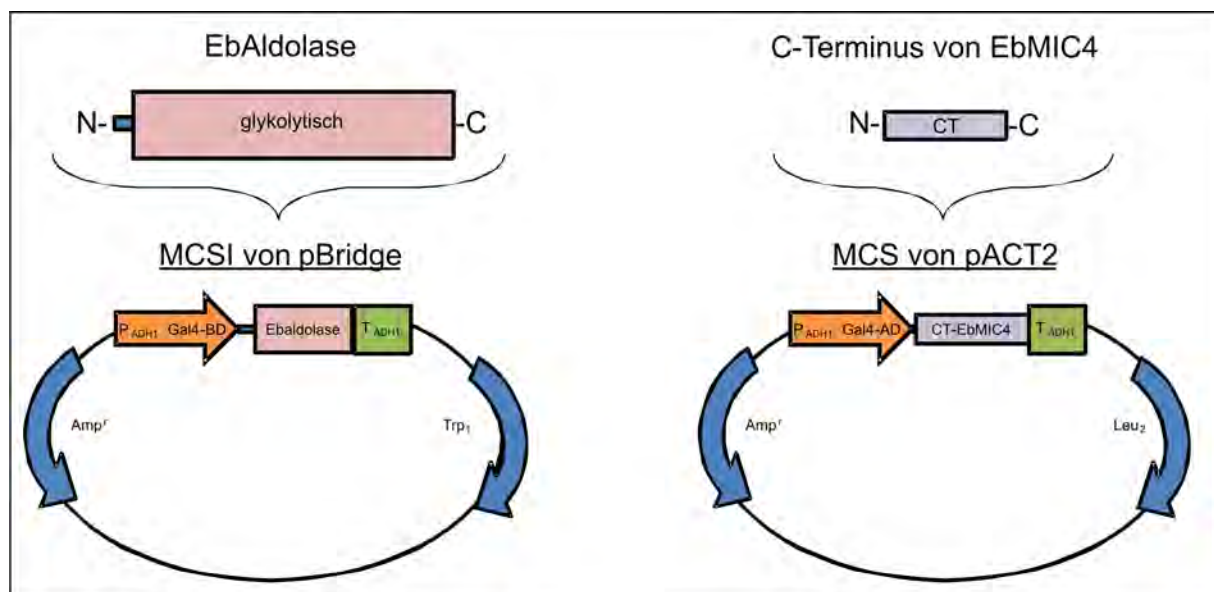


Abb. 3.47: Schematische Darstellung der prey- und bait-Konstrukte für EbAldolase und EbMIC4-Cterm.

Die DNA-Sequenz für EbAldolase wurde in MCS I des bait-Vektors pBridge ligiert, die vom C-Terminus von EbMIC4 in die MCS vom prey-Vektor pACT2.

3.9.2.3 Kotransformation in Hefen und Selektion

Für den YTH-Ansatz wurden die Hefevektoren mit den entsprechenden Inserts in kompetenten Bakterien vermehrt und isoliert. Vor dem eigentlichen Ansatz wurden alle verwendeten Klone sequenziert, um die Sequenz zu überprüfen. Da Hefevektoren aufgrund ihrer Größe schwierig zu sequenzieren sind, wurden auch die entsprechenden pDrive-Klonierungen überprüft. Die Ligationen in den pDrive-Vektoren waren alle korrekt. Die Sequenzen der pBridge-Klone zeigten, dass die Umklonierung der Aldolasen ebenfalls erfolgreich war und alle Sequenzen gerichtet und im richtigen Leserahmen integriert waren. Die Sequenzierung der verschiedenen pACT2-Klone zeigte dagegen keine auswertbaren Ergebnisse. Aufgrund der richtigen Sequenz im pDrive-Vektor wurde davon ausgegangen, dass die Sequenzen stimmten. Für den eigentlichen Versuch wurde jeweils ein Aldolase-bait-Konstrukt mit einem Mikronemen-prey-Konstrukt in Hefen kotransformiert. In der Tabelle 3.10 sind die Kombinationen dargestellt.

Tabelle 3.10: Verwendete Kombinationen für die Kotransformation der bait- und prey-Konstrukte im YTH-Ansatz und der Erfolg durch Selektion auf -Trp/-Leu-Selektionsmedien.

Bait-Konstrukt	Prey-Konstrukt	Selektion (-Trp,-Leu)
TgAldolase-pBridge	TgMIC2-3'Ende-pACT2 (vermeintlich positive Klon)	++
	TgMIC2-5'Ende-pACT2	++
	EbMIC4-CT-pACT2	-/+
EbAldolase-pBridge	TgMIC2-3'Ende-pACT2 (vermeintlich positive Klon)	++
	TgMIC2-5'Ende-pACT2	++
	EbMIC4-CT-pACT2	-

Die Kultivierung der kotransformierten Hefen auf Doppelmangelmedium (-Trp, -Leu) selektionierte jene Hefen, die beide Plasmide beinhalten. So wuchsen nur Hefen, die mit den Konstrukten von TgMIC2 und den zwei verschiedenen Aldolasen kotransformiert waren. Die Kotransformation von C-Terminus von EbMIC4 zeigte nur in Kombination mit der TgAldolase wenige Hefekolonien. Im weiteren Verlauf wurden die auf Doppelmangelmedium selektierten Hefen auf sehr stringenten Mangelmedien (-Trp, -Leu, -His, -Ade) umgestrichen, um eine mögliche Wechselwirkung der Proteine zu untersuchen. Unter diesen Bedingungen war kein Wachstum der Hefen mehr zu beobachten.

Anhand dieser ersten Ergebnisse konnte keine Interaktion der Aldolasen mit dem TgMIC2 oder EbMIC4-Cterm nachgewiesen werden. Da die bereits beschriebene Interaktion von TgAldolase und TgMIC2 (Positivkontrolle) unter Verwendung des YTH-Systems auch nicht eindeutig funktionierte, was auf methodischen Problemen bei der Klonierung und Umklonierung zurückgeführt werden kann, ist eine abschließende Interpretation der Ergebnisse ohne weitere Versuche nicht möglich.

3.10 Untersuchungen zum Einfluss von *E. bovis* auf seine Wirtszelle

Ein besonderes Charakteristikum im Lebenszyklus von *Eimeria bovis* ist die Bildung von sehr großen Makromeronten ($\leq 300 \mu\text{m}$) im Verlaufe der ersten Merogonie in den Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren der Mikrovilli des Ileums. Der Entwicklungszeitraum beträgt *in vivo* 14-18 Tage. Diese lange Persistenz in einer sehr reaktiven Zelle impliziert hochangepasste Invasions- und Evasionsstrategien des Parasiten. Beispielsweise zeigten frühere Studien, dass *E. bovis* in die Transkription mehrerer immunmodulierender Gene eingreift (Hermosilla et. al., 2006; Taubert et. al., 2006a). Um erste Einblicke in die Modulation auf Proteinebene zu erhalten, wählten wir einen Proteomic-Ansatz, bei dem das Gesamtzell-Proteom von nicht infizierten Wirtszellen mit dem von *E. bovis*-infizierten Wirtszellen (14 Tage p. i.) verglichen werden sollte. Dazu wurden die Proben für eine zweidimensionale Gelelektrophorese aufgearbeitet und aufgetrennt. Nach der Auswertung der Gelbilder mit dem Programm Proteomweaver wurden die interessierenden Spots mittels MALDI-TOF analysiert und ausgewertet. Nicht regulierte Proteine wurden nicht näher untersucht.

3.10.1 Suche nach einem Referenzprotein

Problematisch bei diesem Ansatz war, dass durch die Entwicklung des Parasiten viele parasitenspezifische Proteine neu exprimiert werden. Durch diese neuen Proteine verschiebt sich der prozentuale Anteil der wirtszellspezifischen Proteine in der Gesamtprobe, wodurch der Vergleich der beiden Proben erschwert wird. Dieses Problem ist nur dann zu lösen, wenn ein Referenzprotein gefunden werden kann, das während der Entwicklung von *E. bovis* unbeeinflusst bleibt. Frühere Studien zeigten, dass *E. bovis* mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen oder nur geringen Einfluss auf die Transkription des Vimentin-Gens (Hermosilla, pers. Mittlg.) sowie auf die Proteinexpression von Vimentin (Hermosilla et. al., 2008a) und auf die Proteinexpression bei MHC I und MHC II (Hermosilla et. al., 2008b) ausübt.

3.10.1.1 Überprüfung der Proteinexpression potentieller Referenzproteine

Zur Überprüfung des Expressionsmusters wurden BFGC-Kulturen mit *E. bovis*-Sporozoit $\ddot{e}$ n *in vitro* infiziert und an bestimmten Tagen (1., 7., 14. Tage p. i. sowie eine nicht-infizierte Kontrolle am 14. Tage p. i.) die Proteinproben in Form von Zellhomogenaten gewonnen. Mit der Proteinbestimmung nach Bradford wurde die Konzentration der löslichen Proteine der einzelnen Proben bestimmt. Für die SDS-PAGE wurden je Probe 30 μg Gesamtprotein/Spur aufgetragen und aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden dann auf

Nitrozellulosemembran transferiert. Für die anschließenden Immunreaktionen wurden monoklonale Antikörper gegen bovines Vimentin (Abb. 3.49) sowie bovine MHC-I und MHC-II-Moleküle verwendet. Die Antikörper, die gegen die bovinen Moleküle MHC I und MHC II gerichtet waren, zeigten im Immunoblot ein komplexes Bandenmuster, weshalb die Ergebnisse nicht gezeigt werden.

Frühere Untersuchungen charakterisierten die Eigenschaften des verwendeten Antikörpers. In SDS-PAGE-Analysen von menschlichen osteogenen Sarkom-4-998-Zellen zeigte der verwendete monoklonale Antikörper anti-Vimentin Klon Vim 3B4 eine Reaktion mit einem 60 kDa Polypeptid, das als Vimentin definiert wurde. Weiterhin traten mehrere schwache Banden mit geringerem Molekulargewicht auf, bei denen es sich um Abbauprodukte des Vimentins handelt (Stathopoulos et. al., 1989). In Immunreaktionen mit Zytoskelettproteinen von Nierenepithelzellen und Erythrozyten des Krallenfroschs detektierte der Antikörper eine Bande bei ~57 kDa (Herrmann et. al., 1989). Der verwendete Antikörper reagiert kreuz mit Vimentin-äquivalenten Proteinen in Mensch (Heid et. al., 1988), Huhn (Olah et. al., 1992), Rind (Heid et. al., 1988), Hund (Ramos-Vara et. al., 2000), Hamster (Bohn et. al., 1992), Pferd, Affe, Kaninchen (Bohn et. al., 1992) und Krallenfrosch (Herrmann et. al., 1989).

Im Immunoblot mit anti-Vimentin wurden in allen Wirtszellproben eine dominante Bande bei ca. 59 kDa beobachtet (Abb. 3.48-A, Pfeil) sowie weitere schwächer markierte Proteinbanden von geringerem MW, bei denen es sich aufgrund des MW und dem ähnlichen Bandenmuster in allen Proben um Abbauprodukte oder modifizierte Moleküle handelt. Ähnliche Ergebnisse wurden schon von Stathopoulos et. al. (1989) beschrieben, die diese Banden als Abbauprodukte definierten. In Abb. 3.48-B, einem Immunoblot mit anti-Vimentin-Antikörpern gegen Sporozoiten- und Merozoitenantigen von *E. bovis*, erfasste der Antikörper im ersteren Fall kein Protein, wohl aber bei Merozoiten-Antigen. Aufgrund der Gewinnung der Merozoiten I aus der *in vitro*-Kultivierung in bovinen Zellen kann dies mit Verunreinigung durch Wirtszellproteine erklärt werden (Abb. 3.48-B, Pfeil), zumal die Sporozoiten keine Markierung zeigten. Untermauert wird diese Hypothese durch frühere Immunfluoreszenz-Untersuchungen (IIFAT, KLSM) zum Zytoskelett von infizierten Zellen. Dabei zeigte der anti-Vimentin Antikörpers keine Markierungen bei *E. bovis*-Merozoiten und Sporozoiten (pers. Mittlg. Hermosilla). Zusammenfassend kann somit davon ausgegangen werden, dass der Antikörper keine parasitären Proteine markiert, sondern nur gegen ein wirtsspezifisches Antigen gerichtet ist.

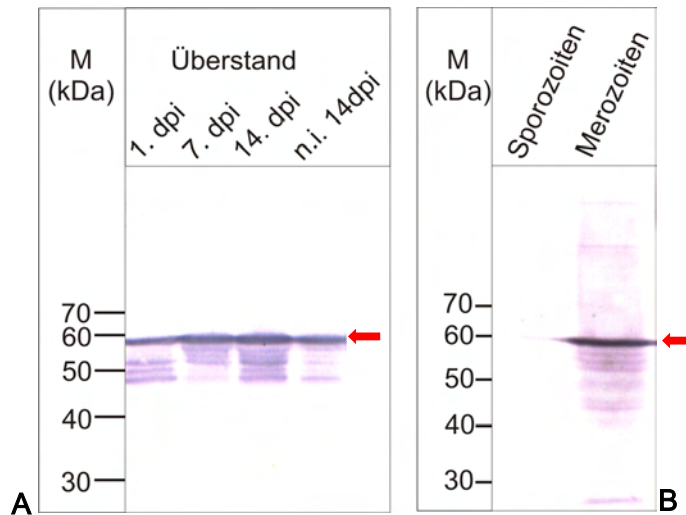


Abb. 3.48: Immunoblotanalysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen bovines Vimentin in *E. bovis*-infizierten BFGC (A) sowie in *E. bovis*-Sporozoiten und –Merozoiten (B).

Bild A zeigt die Reaktion von anti-Vimentin (1:1000) mit Wirtszellextrakt. Im Bild B wurde die Reaktion von anti-Vimentin (1:1000) mit Sporozoiten- sowie Merozoitenextrakt dargestellt.

3.10.1.2 Transkription des bovinen Vimentin-Gens in *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten BFGC am 17. Tag p. i.

Neben der Analyse zur Proteinexpression wurde überprüft, ob die Transkription des bovinen Vimentins (bovVim) von *E. bovis* beeinflusst wird. Dazu wurde Total-RNA von *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten BFGC-Wirtszellen am Tag 17 nach der Infektion isoliert und in einer RT-PCR-Analyse unter den gleichen Bedingungen eingesetzt (siehe auch Kapitel 3.5.2). In der Abb. 3.49 ist das Ergebnis der RT-PCR dargestellt. Dabei zeigte sich kein erkennbarer Unterschied in der amplifizierten Menge von Vimentin-Transkripten in den *E. bovis*-infizierten Wirtszellen verglichen mit den nicht-infizierten Zellen.

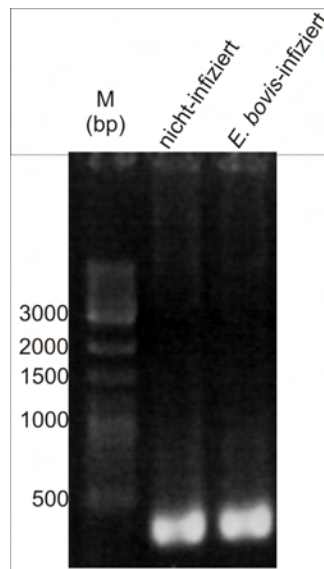


Abb. 3.49: Transkription des bovVim in *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten BFGC (17. Tag p. i.).

Zur Überprüfung, ob *E. bovis* die Transkription von Vimentin in den Wirtszellen beeinflusst, wurde die Total-RNA von *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten Wirtszellen (BFGC) isoliert. Zuerst wurde die gleichen Mengen Total-RNA mittel RT-Reaktion und OligodT(20)-Primer in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die gleichen Mengen an cDNA in der PCR-Reaktion mit den Primern BtVimentin_for/rev eingesetzt. Es zeigt sich eine ähnliche Intensität der beiden verglichenen Amplifikate.

Die Ergebnisse entsprechen auf Proteinebene den Befunden von Hermosilla et. al. (2008a). Da zudem auch die Transkription des Vimentin-Gens nicht über *E. bovis* beeinflusst zu werden scheint, haben wir Vimentin als Referenzprotein zur Normalisierung der Proteinproben in den 2D-Gel-Analysen eingesetzt.

3.10.2 Vergleich der Gesamtzell-Proteome von *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten BFGC-Wirtszellen

3.10.2.1 Probengewinnung

Die Gewinnung der Proteinproben für dieses Experiment wurde entsprechend Kapitel 2.11.1 durchgeführt. In der Abb. 3.50 sind die *in vitro*-Kulturen zum Zeitpunkt der Probengewinnung dargestellt. Die Infektionsrate lag bei ca. 10%. Am Tag der Probengewinnung (14. Tag p. i.) zeigten sich in den infizierten Zellrasen fast voll ausgereifte Makromeronten.

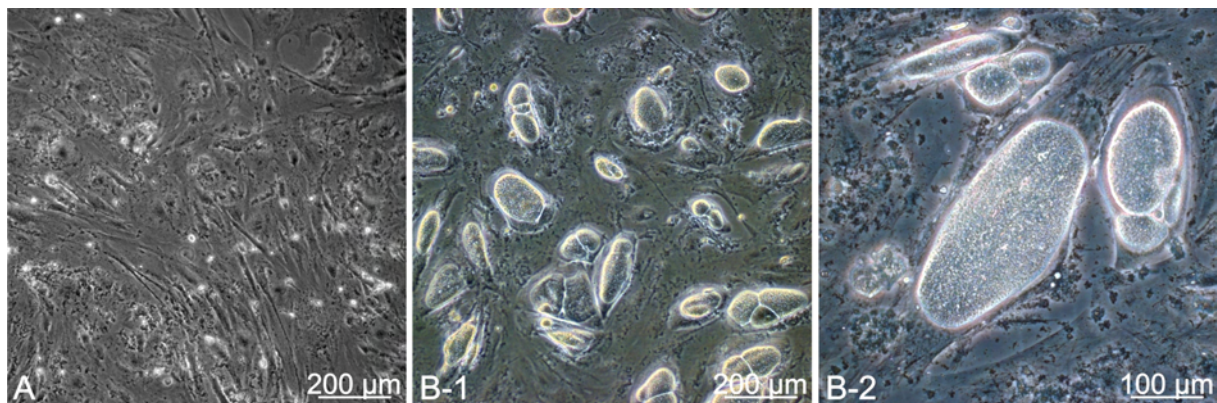


Abb. 3.50 *In vitro*-Kultur von *E. bovis*-infizierter und nicht-infizierter BFZC-Wirtszellen (14 dpi).

Abgebildet ist der Zustand der *in vitro*-Kulturen zum Tag der Proteingewinnung.

A–nicht-infizierten BFGC, B-1/2–*E. bovis*-infizierten BFGC (Phasenkontrast)

3.10.2.2 Normierung der Proben über bovines Vimentin

Für die Normierung der Proben auf bovines Vimentin wurden 300 µg Proteinlösung/2D-Gel der nicht-infizierten und der *E. bovis*-infizierten Probe mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteinmuster wurden dann entweder mit Coomassie gefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem anti-Vimentin Antikörper beprobt. In der Abb. 3.51 ist das Ergebnis der Immunreaktion (B) und das zugehörige 2D-Proteinmuster (nachgefärbt mit India Ink, A) dargestellt. Der Antikörper reagierte mit mehreren Proteinspots, was aufgrund der Position der Spots im zweidimensionalen Gel zueinander auf zwei Gründe zurückgeführt werden kann: Der Abbau des Proteins führt zu einer Verringerung des MW, was auch schon im eindimensionalen Gel beobachtet (Stathopoulos et. al., 1989) wurde; zum anderen durch einen unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad des Proteins, der sich in einer Verschiebung des pI-Wertes äußert (siehe auch Anhang C-Proteomic, potentielle Phosphorylierungsstellen des bovines Vimentins).

Um eine eindeutige Zuordnung zu erzielen, wurden das Spotmuster vom Immunoblot mit dem Coomassie-gefärbten Proteinmuster verglichen und mögliche Kandidaten für die anschließenden Untersuchungen einer anschließenden MALDI-TOF-Fingerprint-Analyse unterzogen. Vimentin-positive, eindeutige Spots sind in der Abb. 3.52 rot eingekreist. Die dazugehörige Auswertung der MALDI-TOF-Fingerprint-Analyse ist in der Tabelle 3.11 angegeben. Für die spätere Normierung beim Vergleich des Gesamtzell-Proteoms wurde der Spot 1 verwendet.

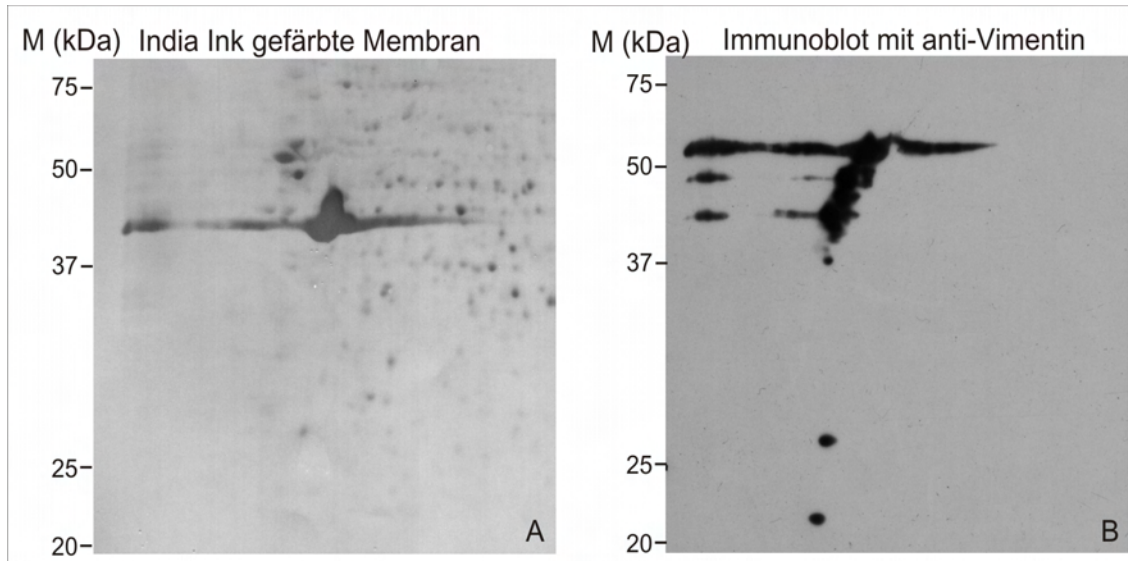


Abb. 3.51: Immunoblot mit anti-Vimentin auf 2D-getrennten Gesamtprotein von nicht-infizierten BFGC (B) und anschließend mit India Ink gefärbt (A) (Ausschnitt).

Gelausschnitte aus der zweidimensionalen Auftrennung der nicht-infizierten BFGC-Gesamtzellprobe.

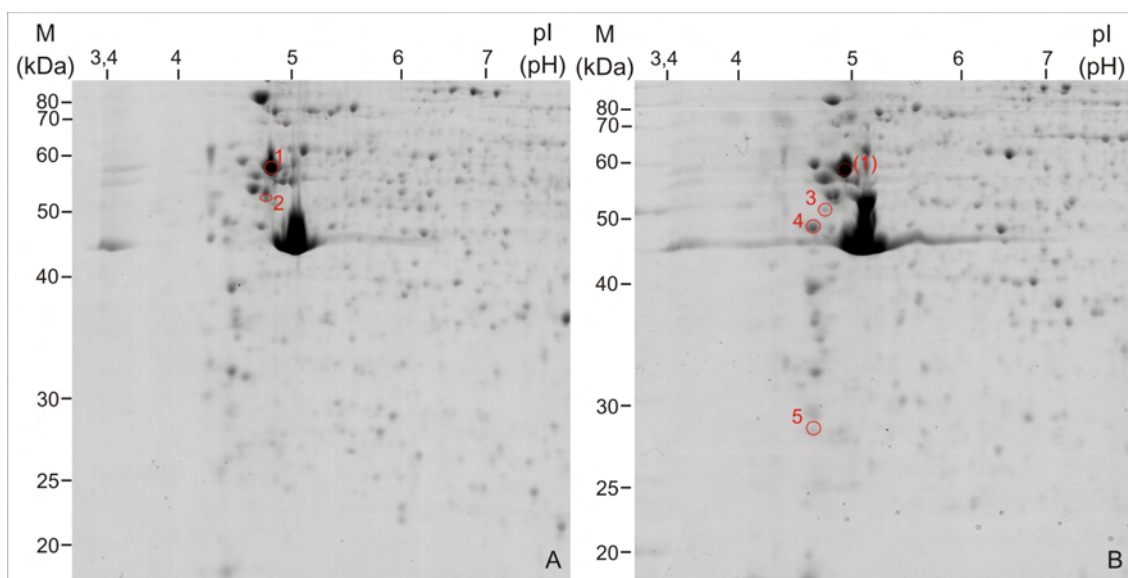


Abb. 3.52: 2D-aufgetrenntes Gesamtprotein von nicht-infizierten (A) und *E. bovis*-infizierten BFGC (B) mit Coomassie gefärbt (Ausschnitt).

Gekennzeichnet wurden die Proteinspots, die im Immunoblot von Anti-Vimentin Antikörper erkannt wurden und bei einer MALDI-TOF-Analyse genauer bestimmt werden sollten (siehe Tabelle 3.8).

Tabelle 3.11: Ergebnis der MALDI-TOF-Auswertung für bovines Vimentin (Referenzspot).

Für die weitere Analyse sollten in der nicht-infizierten Kontrolle und in der *E. bovis*-infizierten Probe Proteinspots von Vimentin identifiziert werden, die in der Immunoblot reagierten.

Probe	M (kDa)	Protein	Entry name (SwissProt)	MW (kDa) theor.	pI (pH) theor.	Auswertung		
						Mowse score	Mass value matched	Seq. cov. (%)
1	60	Vimentin <i>B. taurus</i>	VIME BOVIN	53,6	5,2	309	35	63
2	53	Vimentin <i>B. taurus</i>	VIME BOVIN	53,6	5,2	20	8	15
3	52	Vimentin <i>B. taurus</i>	VIME BOVIN	53,6	5,2	191	26	53
4	48	Vimentin <i>B. taurus</i>	VIME BOVIN	53,6	5,2	259	37	58
5	28	Vimentin (C-term) <i>B. taurus</i>	VIME BOVIN	53,6	5,2	105	10	19

Legende: MW (kDa)-Molekulargewicht (Da), pI (pH)-isoelektrischer Punkt, Mowse score – Wahrscheinlichkeits-basierender Identifikations-Index, Mass value matched - Anzahl der passenden Massenwerte, Seq.cov. (%) - Sequenzabdeckung des Proteins.

3.10.3 Ergebnis der 2D-Gelelektrophorese

Die Gesamtproteine der zu vergleichenden Extrakte aus nicht-infizierten und infizierten Zellen wurden in jeweils vier Ansätzen unter gleichen Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Beispielhaft ist jeweils ein Gel der nicht-infizierten (Abb. 3.53) und der *E. bovis*-infizierten Probe (Abb. 3.54) dargestellt. Die Gele wurden mit dem Programm Proteomweaver nach Normalisierung auf bovines Vimentin ausgewertet. Das Ergebnis der Auswertung ist im Anhang C in den Tabellen I bis II hinterlegt. Insgesamt waren nach dieser Auswertung 137 Proteinspots in ihrer Intensität in den *E. bovis*-infizierten Wirtszellen verringert, davon 23 Proteinspots in der infizierten Probe soweit, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Dem gegenüber wurden insgesamt 84 Proteinspots identifiziert, bei denen die Intensität zugenommen hatte. Davon wurden 21 Proteinspots in der *E. bovis*-infizierten Probe neu nachgewiesen und 63 Spots waren hochreguliert. Alle Spots sind in den Abbildungen der Gele mit ihren entsprechenden Identifikationsnummern (IDs) versehen, wobei die Spots mit einer in der *E. bovis*-infizierten Probe verringerten Intensität im Kontrollgel (Abb. 3.53), die mit der nach *E. bovis*-Infektion höheren Intensität im Gelbild der infizierten Probe (Abb. 3.54) eingezeichnet wurden.

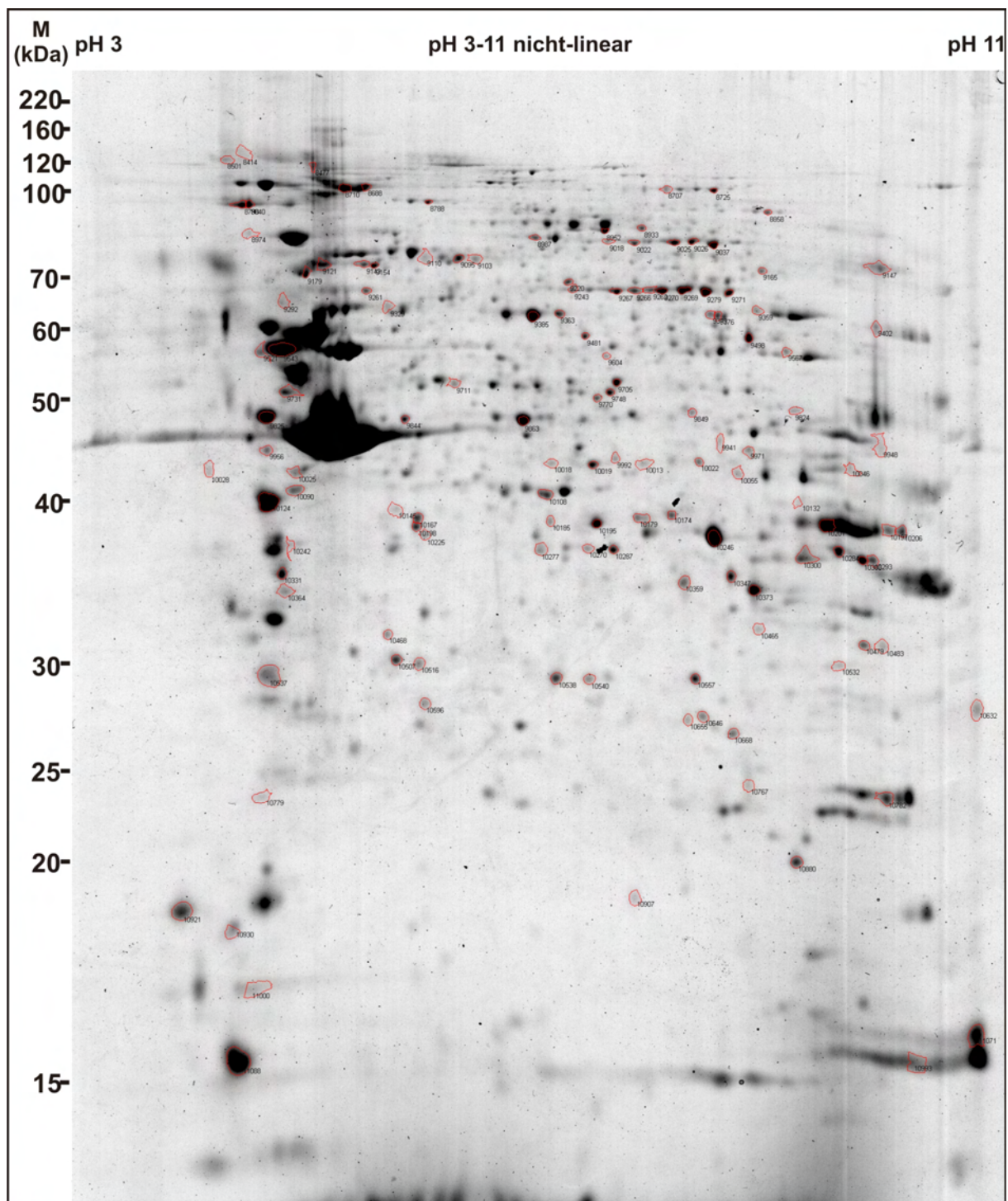


Abb. 3.53: Gesamtproteinextrakts von nicht-infizierten Wirtszellen (BFGC) nach zweidimensionaler Auftrennung.

Dargestellt ist ein Gel mit einem aufgetrennten Proteinextrakt der nicht-infizierten Kontrolle einschließlich der markierten Wirtszellproteine (angegebenen ist die ID-Nummer der Proteinspots), deren Expression in infizierten Zellen nach unten reguliert (Auswertung mit dem Programm Proteomweaver).

ID-Nummern sind in der elektronischen Version lesbar.

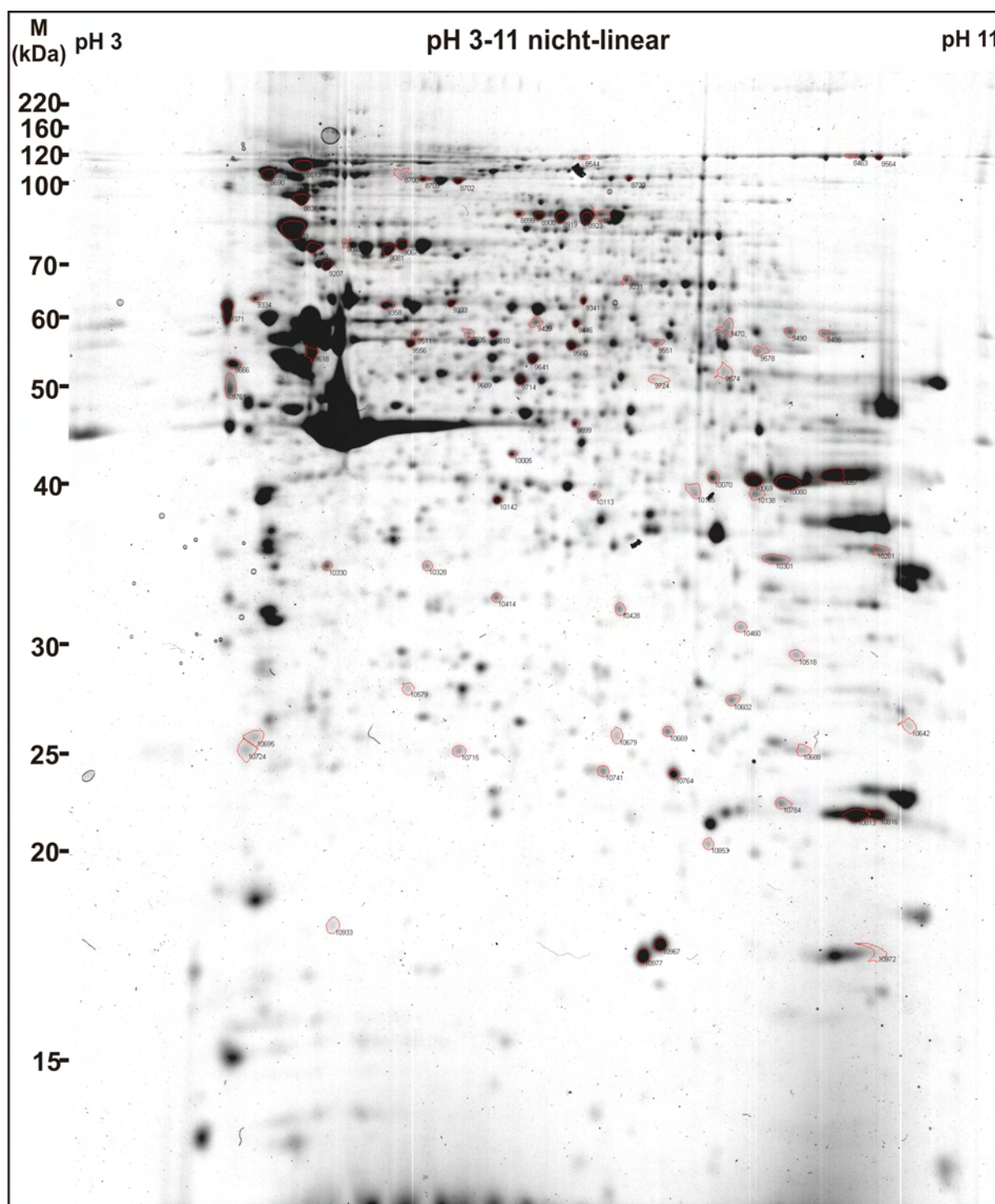


Abb. 3.54: Gesamtproteinextrakts von *E. bovis*-infizierten Wirtszellen (BFGC) nach zweidimensionaler Auftrennung.

Dargestellt ist ein Gel mit einem aufgetrennten Proteinextrakt von *E. bovis*-infizierten Wirtszellen einschließlich der markierten Wirtszellproteine (angegebenen ist die ID-Nummer der Proteinspots), deren Expression in infizierten Zellen nach oben reguliert (Auswertung mit dem Programm Proteomweaver).

ID-Nummern sind in der elektronischen Version lesbar.

3.10.4 Auswertung der MALDI-TOF-Analysen

Die in der Intensität mindestens um Faktor 2 gesteigerten oder verringerten Proteine wurden aus den Gelen ausgestochen und mit der Proteinase Trypsin im Gel in Peptide gespalten, die anschließend eluiert und einer MALDI-TOF-Analyse unterzogen wurden. Die sich daraus ergebenden Peptidmuster (Peptidfingerprint) wurden mit Eintragungen in Datenbanken (NCBI, Swiss-Prot, TrEMBL) verglichen und wenn möglich bekannten Proteinen zugeordnet. Dabei enthielten viele Spots (definiert als Mischspot) oft zwei oder mehrere Proteine, so dass Proteingemische vorlagen, wodurch sich die Auswertung erschwerte. Viele Spots, vor allem in infizierten Zellen neu auftretende, konnten keinem bekannten Protein zugeordnet werden. Gründe können in der unvollständigen Datenbank liegen, in der vor allem sehr wenige parasitäre Proteine aufgeführt sind. Daher kann man spekulieren, dass es sich bei den neu auftretenden Proteinen um parasitäre Proteine handelte.

Im Anhang B-Proteomik sind in tabellarischer Form die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analysen hinterlegt (Tabelle III und IV). Generell ist die Zahl der infizierten Proteine mit der der Anzahl der Spots nicht identisch, da Mischspots (mehrere Proteine in einem Spot) auftraten oder ein Protein in mehreren Spots identifiziert wurde. Insgesamt wurden 38 verschiedene, hochregulierte Proteine identifiziert, die dem Wirt zugeordnet wurden. Weitere 29 Proteine waren bekannte parasitäre Proteine. Bei 23 Proteinspots war die Datenbanksuche nicht erfolgreich, wodurch keine Zuordnung möglich war. Die Analyse der 137 Spots, deren Intensität verringert war, ergab 130 verschiedene Wirtszellproteine, wovon einige in mehreren Isoformen (z. B. Lamin A/C) vorlagen und andere nur in Mischspots nachgewiesen wurden. Bei sechs Spots konnten keine weitere Angabe gemacht werden.

In den Tabellen 3.13-15 sind die Proteine bezüglich ihrer Funktionen in der Zelle gruppiert. Geordnet wurden sie nach ihrem Vorkommen, ob im Einzelspot (E) oder im Mischspots (M) sowie nach ihrer Regulation. In einer gesonderten Tabelle (Tabelle 3.16) wurden die Proteine zusammengefasst, die in hoch- und runterregulierter Form mit unterschiedlichem MW und pI vorlagen, was auf Modifikationen (z. B. Phosphorylierung) hindeuten kann. Allgemein zeigte sich (Tabelle 3.12-13), dass die Hauptgruppe der hochregulierten Proteine funktionell der Biosynthese und dem Metabolismus zugeordnet werden kann, gefolgt von Hitzeschockproteinen und Proteinen des Zytoskeletts. Wenige Proteine konnten zu den Proteasen sowie Faktoren bei der Signaltransduktion gruppiert werden.

Bei den nach unten regulierten Proteinen (Tabelle 3.14-15) waren drei Hauptgruppen erkennbar, wobei insgesamt mehr Funktionsbereiche der Zelle als im oberen Fall betroffen waren. Als große Gruppe sind die Kernproteine zu nennen, die insgesamt nur nach unten reguliert wurden. Daneben befanden sich die meisten Proteine in den Gruppen der Zytoskelettelemente und Proteine, die am Metabolismus und Biosynthese beteiligt sind.

Weitere Gruppen beinhalteten Proteine, die für die Apoptose oder die Transkription bedeutend sind.

In der Abb. 3.55 wurde der prozentuale Anteil jeder Funktionsgruppe bezogen auf die vier Haupteinteilungen der Proteine nach ihrer Regulation und dem Vorkommen in Einzelspots oder Mischspots vorgenommen.

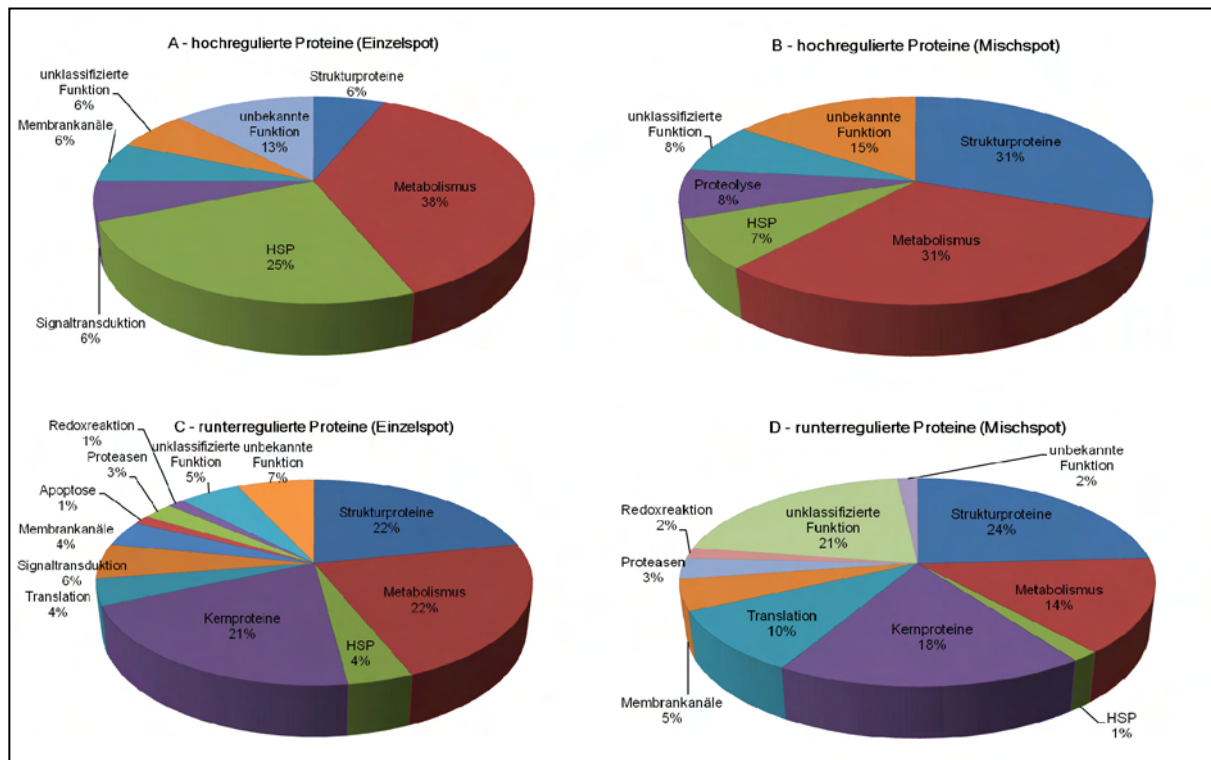


Abb. 3.55: Gruppierung der ausgewerteten Proteine und ihr prozentualer Anteil an den nach oben bzw. nach unten regulierten Proteinen.

Eine kleine Gruppe von Proteinen war in unterschiedlichen Modifikationen (MW, pI) sowohl hoch- als auch runterreguliert (Tab. 3.16). Aufgrund ihrer Funktion wurden sie den Gruppen Strukturproteine (3 Proteine), Hitzeschockproteine (2 Proteine), Metabolismus (3 Proteine) und die Gruppe der Membranproteine (2 Proteine) zugeordnet. Beim Vergleich der tatsächliche MW sowie der isoelektrischen Punkte zeigte sich, dass bei allen Proteinen die hochregulierten andere Charakteristika besaßen als die runterregulierten Formen der Proteine. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Proteine modifiziert wurden, wodurch jeweils eine Modifikationsform hoch- und die andere Form runterreguliert wurden. Lag ein Mischspot vor (ein Spot enthält mehrere Proteine), konnte nicht festgestellt werden, welches der enthaltenen Proteine reguliert wurde.

Die Betrachtung der Gesamtheit der beeinflussten Proteine zeigt, dass insgesamt mehr Proteine runterreguliert wurden. In der Kategorie Strukturproteine wurden bis auf wenige

Ausnahmen wie Transgelin-2 und Calponin-2 die Proteine runterreguliert, darunter Intermediärfilamente wie Lamin A/C oder Aktin-regulierende Proteine wie Gelsolin, L-Plastin oder Tropomodulin-3. Auch bei den Proteinen, die am Metabolismus beteiligt sind, ist der Anteil der runterregulierten Proteine wesentlich höher. Viele davon sind beteiligt an den wichtigen Biosynthesewegen wie Glykolyse und dem Citratzyklus, vielleicht ein Hinweis auf einen heruntergefahrenen Stoffwechsel. Bei den Hitzeschockproteinen ist die Anzahl der hoch- und runterregulierten Proteine ähnlich. Hitzeschockproteine haben neben ihrer Funktion als Chaperon viele Aufgaben in der Zelle. So sind einige beispielsweise an der Regulation der Apoptose beteiligt. Um eine definierte Aussage treffen zu können, müsste die Funktion der einzelnen Proteine in weiteren Tests genauer untersucht werden. Auch in der Kategorie Signaltransduktion wurden mehr Proteine runterreguliert, die vor allem an Ras/Rab-Signalweg beteiligt sind. Dieser Signalweg ist an der Kontrolle vieler zellulärer Prozesse wie Aktin-Zytoskelett-Integration, Proliferation, Differenzierungsprozesse, Zelladhäsion, Apoptose oder Zellmigration beteiligt.

Viele der runterregulierten Proteine konnten in Kategorien eingeordnet werden, die bei den hochregulierten Proteinen nicht zu finden waren. Herausragend war dabei der Anteil der Kernproteine, die einen großen Teil der runterregulierten Proteine ausmacht. Dies kann als Hinweis auf die Beeinflussung der Proteinbiosynthese der Wirtszelle auf Transkriptionsebene gelten. Dies korreliert auch mit dem Ergebnis, dass weitere Proteine der Proteinbiosynthese außerhalb des Zellkerns runterreguliert wurden.

Auch wenn der Anteil der identifizierten, pro-apoptotischen Proteine nicht sehr hoch ist (Kaspase 8), kann ihre negative Modulation als ein Zeichen dafür gewertet werden, dass der Parasit seine Wirtszelle bis zur vollständigen Ausreifung der Merozoiten vor dem programmierten Zelltod versucht zu bewahren.

Tabelle 3.12: Hochregulierte Proteine in *E. bovis*-infizierten Wirtszellen (Nachweis in Einzelspots).

Zugangsnummer	Protein	Funktion
	<u>Strukturproteine (Zytoskelett)</u>	
Q5E9F5	Transgelin-2	gehört zur Calponin-Familie, Funktion unklar
	<u>Stoffwechselenergie (Erzeugung und Speicherung)</u>	
P00366	Glutamat-Dehydrogenase 1	Stickstoffmetabolismus, Harnstoffzyklus
Q5EAD2	D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	Serin-Biosynthese
P20000	Aldehyd-Dehydrogenase	Alkoholabbau
P48962	ADP-ATP-Translokase 1	Oxidative Phosphorylierung, katalysiert den Austausch von ADP/ATP über die innere Mitochondrienmembran
Q58DM8	Enoyl-CoA-Hydratase	Fettsäureabbau
P08760	GTP:AMP-Phosphotransferase	Metabolismus, Energiebereitstellung, Mitochondrien
	<u>Hitzeschock / Proteinfaltungsproteine</u>	
Q95M18	Endoplasmin (Heat shock protein 90 kDa)	Chaperon, Prozessierung und Transport von Sekretionsproteinen
gi 77735995	Hitzeschockprotein 70kDa 9B	Chaperon
P52193	Calreticulin	Ca-bindendes Chaperon
Q3T0K1	Calumenin	Ca-bindendes Chaperon im ER
	<u>Membranrezeptoren, Signaltransduktion</u>	
P50397	"RAB-GDP dissociation inhibitor beta"	Vesikeltransport, Regulierung des GDP/GTP Austausch bei den meisten Rab-Proteinen
	<u>Membrankanäle und -pumpen</u>	
P31408	vakuoläre ATP-Synthase B-UE	nichtkatalytische UE der V-ATPase, Ansäuerung von intrazellulären Kompartimenten
	<u>Proteine mit unklassifizierter Funktion</u>	
Q8IWJ2	GRIP und coiled-coil domain-containing protein 2	Aufrechterhaltung der Struktur des Golgi-Apparates
	<u>Proteine mit unbekannter Funktion</u>	
gi 73975430	hypothetisches Protein XP_532413	unbekannt
gi 73949814	"homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1"	unbekannt

Tabelle 3.13: Hochregulierte Proteine in *E. bovis*-infizierten Wirtszellen (Nachweis in Mischspots).

Zugangsnummer	Protein	Funktion
	<u>Strukturproteine (Zytoskelett)</u>	
gi 71030334	Myosin-1	Muskelkontraktion
P06394	Keratin, Typ I cytoskelett 10	Zytoskelett
Q5S6V2	Mikrotubulin-assoziiertes Protein tau	Zytoskelett, Steuert den Aufbau und die Stabilisierung der Mikrotubuli
Q3SYU6	Calponin-2	Ca ²⁺ -bindendes Protein, inhibiert die ATPase Aktivität von Myosin
	<u>Stoffwechselenergie (Erzeugung und Speicherung)</u>	
Q8WXW3	Progesteron-induzierter Blockierungsfaktor	Metabolismus
gi 109511192	Phosphatidylinositol Polyphosphat 5-Phosphatase	Metabolismus
Q9D939	Sulfotransferase 1C2	katalysiert die Translokation einer Sulfatgruppe
gi 37360608	mKIAA1990 protein (Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase)	Metabolismus, regulatorische Untereinheit des Enzyms
	<u>Hitzeschock / Proteinfaltungsproteine</u>	
O43852	Calumenin	Ca-bindendes Chaperon im ER
	<u>Proteolyse</u>	
Q2KHU4	putative ATP-abhängige Clp-Protease proteolytische UE	Proteolyse
	<u>Proteine mit unklassifizierter Funktion</u>	
P81125	„α-soluble NSF attachment protein“	Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Apparat
	<u>Proteine mit unbekannter Funktion</u>	
gi 6572442	Dysferlin	unbekannt
Q9CZA6	“nuclear distribution protein nudE homolog 1”	unbekannt

Tabelle 3.14: Runterregulierte Proteine in *E. bovis*-infizierten Wirtszellen (Nachweis in Einzelspots).

Zugangsnummer	Protein	Funktion
	<u>Strukturproteine (Zytoskelett)</u>	
gi 119910351	alpha-Actinin-4	Aktin-Quervernetzung
gi 74356373	Gelsolin	Zellwachstum, Aktin-Depolymerisationsfaktor
Q2HJ49	Moesin	Mitglied der Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Protein-Familie, Zellausläufer der Filopodien, Verbindung zw. Aktinzytoskelett und PM, Signalaustausch
gi 77404182	Lamin A/C	Intermediärfilament
gi 77736385	L-Plastin (Lymphocyte cytosolic protein 1)	aktinbindendes Protein aus der alpha-Actinin-Familie
gi 110347570	Vimentin	Intermediärfilament
P60712	beta-Aktin	Zellmotilität
gi 30466254	Gelsolin-ähnliches "capping protein"	blockiert das schnellwachsende Enden vom F-Aktin
gi 115496236	Tropomodulin 3	blockiert die Elongation und Depolymerization von F-Aktin
gi 83778524	beta-Tropomyosin	bindet F-Aktin, beteiligt an der Stabilisierung des Zytoskeletts
Q5E9E1	PDZ and LIM domain protein 1	Zytoskelettprotein, Transport von Proteine zum Zytoskelett
Q5E997	F-Aktin "capping protein subunit alpha-2"	bindet am schnellwachsenden Ende von F-Aktin (Ca^{2+} -abh.), blockiert den Austausch der Monomere
gi 110347570	Vimentin (fragment)	Intermediärfilament
P84198	Vimentin (fragment)	Intermediärfilament
Q9TS87	Transgelin	Aktin-Vernetzer/Gelierungsprotein, ähnlich zu Calponin
Q5E9E2	Myosin, regulator. leichte Kette 2	nichtmuskulär
	<u>Hitzeschock- / Proteinfaltungsproteine</u>	
Q76LV2	Hitzeschockprotein HSP 90- α	molekulares Chaperon mit ATPase Aktivität
Q76LV1	Hitzeschockprotein HSP 90- β	molekulares Chaperon mit ATPase Aktivität
P61603	Hitzeschockprotein 10 kDa	interagiert mit HSP60 und unterdrückt dessen ATPase-Aktivität bei Anwesenheit von Mg-ATP, wichtig für mitochondriale Proteinsynthese,
	<u>Metabolismus und Biosynthese</u>	
gi 119885261	Prokollagen-Lysin-2-Oxoglutarat-5-Dioxygenase 2	Hydrolysiert Lysinreste in der -Xaa-Lys-Gly- Sequenz von Kollagen
P20004	Aconitat-Hydratase	Citratzyklus
Q6B855	Transketolase	Pentosephosphatweg
gi 78369310	Stress-induziertes Phosphoprotein 1	vermittelt die Verbindung der Chaperone HSC70 und HSP90
Q3SYV4	Adenylyl-Cyclase-assoziiertes Protein 1	Kontrolle der Adenylyl-Cyklase, cAMP-Syntheseweg

Q9XSJ4	alpha-Enolase	Multifunktionelles Enzym, Glykolyse, Teil weiterer Prozesse wie Zellwachstum, allergische Reaktionen
Q9Y2J8	Protein-Arginin-Deiminase Typ-2	Deimination von Arginin-Resten (Syn. Arginin-Dihydrolase)
gi 77736067	Acyl-CoA Thioesterase 9	Acetyl-CoA-Synthese; Hydrolyse von Acetyl-CoA
gi 77736067	LOC505323 (Ornithin-Aminotransferase)	Aminosäuresynthese
gi 119916947	Fruktose-1,6-Bisphosphat Aldolase A	Glykolyse
gi 109939980	Isocitrat-Dehydrogenase 3 (NAD ⁺) alpha	Citratzyklus
P10096	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	Glykolyse, KH-Abbau
P19858	L-Lactat-Dehydrogenase A-Kette	katalytische Aktivität: S-Lactat+NAD ⁺ =Pyruvat+NADH
Q91X52	L-Xylulose-Reduktase	katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion verschiedener Pentosen, Tetrosen, Triosen oder L-Xylulose, Kohlenhydratmetabolismus
Q3SZ62	Phosphoglycerat-Mutase 1	Glykolyse
Q5E956	Triosephosphat-Isomerase	Glykolyse
	<u>Membrankanäle und -pumpen</u>	
P19483	vakuoläre ATP Synthase katalytische UE-A	Bildung von ATP mittels Protonengradient
Q9MZ13	spannungsabh. Anion-selektiver Kanal-Protein 3	Anionenkanal durch die äußere Mitochondrienmembran
Q9XSA7	Chlorid-intrazelluläres Kanalprotein 4	Regulation von zellulären Prozessen wie zelluläres Membranpotential, transepithelialer Transport, intrazellulärer pH, Regulation des Zellvolumens
	<u>Kernproteine</u>	
gi 119895555	Matrin-3	nukleäres Matrixprotein
Q3T0D0	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein K	hnRNP-Familie; bindet an die pre-mRNA im Kern, RNA-Prozessierung
gi 115497226	LOC513868 (Kernmatrix-Protein 200)	pre-mRNA Prozessierungsfaktor
gi 76620242	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein D0B Isoform 6	hypothetisches Protein
Q5E9A3	Poly(rC)-bindendes Protein 1	bindet einzelsträngige Nukleinsäuren
gi 3953617	SET	DNA-Bindung, Transkription, Zusammensetzung der Nukleosomen
gi 14141157	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein H3	Splicing Prozess, an der frühen Hitzeschock-induzierten Hemmung des Splicing Prozesses beteiligt
Q2HJ60	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein A2/B1 (bovin)	involviert in der Prozessierung der pre-mRNA
P22626	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	involviert in der Prozessierung der pre-mRNA

P10103	"high mobility group" Protein B1	bindet vorzugsweise an einzelsträngige und ungewundene doppelsträngige DNA
P68002	"high mobility group" Protein B1	bindet vorzugsweise an einzelsträngige und ungewundene doppelsträngige DNA
Q3T054	GTP-bindendes Kernprotein Ran	GTP-bindendes Protein involviert im nukleozytoplasmatischen Transport Chromatinkondensation
P02316	nichthistonaes, chromosomales Protein HMG-14	bindet an die nukleosomale DNA und verändert die Interaktion zwischen DNA und Histonen
P62808	Histonprotein H2B Typ 1	Histonbildung
P58876	Histonprotein H2B Typ 1-D	zentrale Rolle in der Bildung der Nukleosomen
<u>Membranrezeptoren, Signaltransduktion</u>		
P80746	Integrin alpha-V	Membranrezeptor Fkt. vielfältig
P21856	Rab-GDP-Dissoziation-Inhibitor alpha	Regulierung des GDP/GTP Austausch bei den meisten Rab-Proteinen
Q5E9C0	Ras-Suppressorprotein 1	Ras-Signaltransduktionsweg
Q3SZI4	14-3-3-Protein theta	Regulation von vielen Signalwegen
<u>Apoptose</u>		
gi 114051073	Kaspase 8	Apoptose, Nekrose und Inflammation
<u>Proteasen</u>		
P00432	Katalase	Verringerung des oxidativen Stresses
Q2KIW6	26S Protease, regulatorische UE S10B	ATP-abhängige Degradierung von ubiquitären Proteinen
<u>Redoxreaktion</u>		
Q9BG12	Peroxiredoxin-4	Redoxregulation der Zelle
<u>Proteinsynthese (Translation)</u>		
gi 95769122	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	Untereinheit des Elongationsfaktor-1-Komplexes, notwendig für Proteinbiosynthese, Ribosom
Q2NL22	probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	Initiation der Translation, Splicing & Prozessierung der RNA
P63273	40S ribosomales Protein S17	Ribosomen
<u>Proteine mit unklassifizierter Funktion</u>		
P46193	Annexin A1	Plasmamembran, Signaltransduktion, inhibiert die Phospholipase A2 Aktivität, wirkt antiinflammatorisch
P04272	Annexin A2	Ca ²⁺ -regulierendes, membranbindendes Protein
P81287	Annexin A5 (V)	Apoptosemarker
gi 119919671	Glypican 4	Zelloberflächen-Proteoglycan, trägt Heparansulfatreste
<u>Protein mit unbekannter Funktion</u>		
Q3SYU2	Elongationfaktor 2	unbekannt
gi 122692301	LOC504957("alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein")	hypothetisches Protein

gi 58339172	Wachstumshormon-ähnliches Protein 1	unbekannt
Q9CTN5	Protein SIX6OS1	unbekannt
Q0VFX8	Cystein-reiches Protein 2	unbekannt

Tabelle 3.15: Runterregulierte Proteine in *E. bovis*-infizierten Wirtszellen (Nachweis in Mischspots).

Zugangsnummer	Protein	Funktion
	Strukturproteine (Zytoskelett)	
Q27991	Myosin-10	Zellteilung, Zytokinese
gi 27806351	Villin 2	Verankerung des Zytoskeletts an die PM
gi 114601440	Lamin B1	Intermediärfilament; involviert in Kernstabilität, Chromatinstruktur und Genexpression,
gi 77736385	L-Plastin ("lymphocyte cytosolic protein 1")	aktinbindendes Protein aus der alpha-Actinin-Familie
gi 119895049	Lamin B2	Intermediärfilament; involviert in Kernstabilität, Chromatinstruktur und Genexpression
gi 77736385	Lamin A/C	Intermediärfilament
P69893	Tubulin beta 5	Hauptbestandteil von Mikrotubulin, bindet GTP
gi 74204140	Tubulin beta 5	Hauptbestandteil von Mikrotubulin, bindet GTP
gi 114052148	LOC534206 (Tubulin beta 6)	Hauptbestandteil von Mikrotubulin
gi 110347570	Vimentin	Intermediärfilament
P61160	Aktin-ähnliches Protein 2	Kontrolle der Aktin-Polymerization
P60712	beta-Aktin	Zellmotilität
P52907	F-Aktin-capping protein UE-alpha-1	bindet am schnellwachsenden Ende von F-Aktin (Ca-abh.), blockiert den Austausch der Monomere
gi 61821551	"capping protein" alpha UE	F-Aktin-Kappenprotein, dass am schnellwachsenden Ende bindet, blockiert den Austausch der Monomere
gi 61888866	Tropomyosin 1 alpha Kette	bindet F-Aktin, beteiligt an der Stabilisierung des Zytoskeletts
	Hitzeschock- und Proteinfaltungproteine	
Q61081	Hsp90 co-Chaperon Cdc37	Co-Chaperon, interagiert mit Kinasen und steuert deren Interaktion mit HSP-90
	Metabolismus und Biosynthese	
Q0VCK0	bifunktionales Purin-Biosynthese-Protein	Purin-Biosynthese
P48818	"very-long-chain specific" Acyl-CoA Dehydrogenase	Fettsäuresynthese
gi 73587283	LOC512571 (Pyruvat Kinase)	Glykolyse
gi 118151024	LOC525335 (K-Glutaminase)	Aminosäuremetabolismus
Q07130	UTP-Glucose-1-Phosphat-Uridyltransferase 2	Zentrale Rolle als Glukosyl-Donor im Zellstoffwechsel

Q3T0P6	Phosphoglycerat Kinase 1	Glykolyse und Glukoneogenese
gi 119902010	LOC512571 (Pyruvat-Kinase)	Glykolyse
Q5E9B1	L-Laktat-Dehydrogenase B-Kette	Oxidation von Laktat zu Pyruvat mit Bildung von NADH
Q3T145	Malat-Dehydrogenase (Zytoplasma)	Citratzyklus
	<u>Membrankanäle und -pumpen</u>	
Q29048	vakuoläre ATP Synthase katalytische Untereinheit A	Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente
gi 162705	vakuoläre H ⁺ -ATPase A	Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente
Q9MZ13	spannungsabh. Anion-selektives Kanalprotein 3	Anionenkanal durch die äußere Mitochondrienmembran
	<u>Kernproteine</u>	
Q1KMD3	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein	Bestandteil des hnRNP-Komplexes im Kern, Prozessierung der prä-mRNA
P52272	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein M	Bestandteil des hnRNP-Komplexes im Kern, prä-mRNA-Prozessierung, -Metabolismus und -Transport
Q3MHE2	U4/U6 kleines Kern-Ribonukleoprotein Prp4	mRNA Splicing mittels Spliceosom im Kern
Q15233	non-POU "domain-containing octamer-binding protein"	DNA- und RNA-Bindeprotein, in viele nukleäre Prozesse involviert
Q3MHL3	Histon-bindendes Protein RBBP4	Bestandteil der Histone
gi 119914925	TIP49	Komponente des NuA4 Histone-Acetyltransferase-Komplexes, involviert in der Transkriptionsaktivität best. Gene, DNA-Reparatur, Zellproliferation
Q5E9A3	poly(rC)-bindes Protein 1	bindet einzelsträngige Nukleinsäuren (oligo dC)
Q99729	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein A/B	bindet an einzelsträngige RNA, bindet an APOB-mRNA Transkripte um die RNA-Editing-Region
gi 73977325	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein C	Bestandteil des hnRNP-Komplexes im Kern, Prozessierung der prä-mRNA
gi 119906216	eukaryotisches Translation-Elongations-Faktor 1 delta (fragment)	Transkription, GTP-abhängiges Binden von Aminoacyl-tRNA an das Ribosom
Q2HJ60	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein A2/B1 (human)	Bestandteil des hnRNP-Komplexes im Kern, Prozessierung der prä-mRNA
	<u>Proteasen</u>	
P00432	Katalase	Verringerung des oxidativen Stresses
O00487	26S Proteasome, nicht-ATPase regulatorische UE 14	regulatorische Untereinheit des 26S Proteasomes, ATP-abhängiger Abbau von ubiquitären Proteinen
	<u>Redoxreaktion</u>	
Q9BGI3	Peroxiredoxin-2	Redoxreaktion der Zelle, involviert im Abbau von Peroxiden über den Metabolismus

	<u>Proteinsynthese (Translation)</u>	
Q29465	Tyrosyl-tRNA Synthetase	Proteinbiosynthese, Apoptosemarker
P26452	40S ribosomales Protein SA (Laminin-Rezeptor 1)	Laminin Rezeptor Aktivität und strukturelle Komponente von Ribosomen, Zytoskelett, Intermediärfilament
Q5E966	eukaryotischer Translations-initiation-Faktor 3 UE-2	bindet an die 40S-UE der Ribosomen, steuert die Bindung von Methionyl-tRNAi und mRNA
Q95140	60S ribosomales Protein P0	Bestandteil der Ribosomen
gi 60592767	ribosomales Protein, groß, P0	Bestandteil der Ribosomen
Q3SYR7	60S ribosomales Protein L9	Ribosomenaufbau
	<u>Proteine mit unklassifizierter Funktion</u>	
gi 114326282	Transferrin	Protein des Blutes, bindet Eisen
Q2KJH6	Serpin H1	Kollagen-bindendes Protein; 47 kDa HSP
P53619	„Coatomer subunit delta“	zytosolischer Proteinkomplex, bindet an Golgi-Vesikel, vermittelt die Verbindung der Chaperone HSC70 und HSP90
gi 78369494	Septin 11	Zytokinese
gi 62751962	Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor-assoziiertes Protein	Bildung und Verteilung des Splicosoms
gi 73853762	Annexin I	Regulation der Membranfusion, Exozytose
gi 76623595	Annexin Vi	Regulation der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern
P81287	Annexin A5 (V)	Interaktion mit der Umgebung
gi 76662301	Phosphopantetheinyl-Transferase	posttranslationale Modifikation von Zielproteinen durch Phosphopantethein
Q9MZ13	Galaktose-spezifisches Lectin (fragment)	Innate und adaptive Immunantwort, Beitrag zur phagozytischen Beseitigung von Mikroorganismen und apoptotischen Zellen
Q3T165	Prohibitin	Tumorsuppressor, inhibiert die Zellproliferation und reprimiert die Aktivität von E2F
P15497	Apolipoprotein A-I	Sekretionsprotein, beteiligt am Rücktransport von Cholesterol vom Gewebe zur Leber
Q6BDS2	UHRF1-bindendes Protein 1 (fragment)	Negativer Regulator des Zellwachstums
	<u>Proteine mit unbekannter Funktion</u>	
gi 114650046	Progesteron-induzierter Blockierungsfaktor 1 (fragment)	unbekannt

Tabelle 3.16: Modifizierte Proteine, die in hoch- und runterregulierter Form vorliegen (gekennzeichnet durch unterschiedliche MW, pI).

Zugangsnummer	Protein	Funktion
	<u>Strukturproteine (Zytoskelett)</u>	
Q3B7N2	α -Actinin	F-Aktin-Vernetzung an intrazelluläre Strukturen
gi 27806276	Caldesmon 1	bindet Aktin und Myosin, an der Regulation der Interaktion von Aktin und Myosin beteiligt
O62654 / gi 110347570	Desmin	Intermediärfilament
	<u>Hitzeschock- / Proteinfaltungsproteine</u>	
P19120	HSP (verwandtes) 71 kDa	Chaperon, konstitutiv exprimiert, Interaktion mit PACRG
gi 115495027	HSP 70kDa 5	Chaperon
	<u>Metabolismus und Biosynthese</u>	
P38657	Protein-Disulfid-Isomerase A3	Katalyse von S-S-Brücken bei entstehenden Proteinen im ER
Q9XSG3	Isocitrat-Dehydrogenase	Citratsäurezyklus
Q32LG3	Malat-Dehydrogenase	Citratsäurezyklus
	<u>Membrankanäle und -pumpen</u>	
P19483	ATPase-Synthase α -UE	Energiegewinnung, regulatorische UE
Q3SYU6/ P68002	spannungsabh. Anionen-selektiver Kanal Protein 2	Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen durch die Zellmembran

Kapitel 4: Diskussion

4.1 Das Mikronemenprotein EbMIC4

Homologiestudien

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Mikronemenprotein von *E. bovis* beschrieben. Die Anzahl der bisher identifizierten Mikronemenproteine bei den einzelnen Gattungen der Apikomplexa beläuft sich auf mehr als 40 Proteine. Die meisten wurden dabei bisher bei *T. gondii* identifiziert und teilweise charakterisiert. Daneben wurden auch Mikronemenproteine bei *Eimeria* spp., *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Sacrocystis* sp. und *Theileria* spp. identifiziert und manche davon genauer beschrieben (Tomley and Soldati, 2001). Bei der Datenbankanalyse zeigte sich, dass die bisher identifizierte Proteinsequenz von EbMIC4 die höchste Homologie zu zwei Mikronemenproteinen bei verschiedenen Hühnerkokzidien aufweist: EtMIC4 (Tomley et. al., 2001) und EmTSP250 (Witcombe et. al., 2003). Witcombe et. al. (2003) zeigten weiterhin, dass homologe Proteine zu EmTSP250 auch bei weiteren *Eimeria*-Arten vorkommen. In anderen Apikomplexa-Gattungen wurden bisher keine gleichartigen Proteine dieser Größe beschrieben (siehe auch Abb. 1.3). Außerhalb der Apikomplexa weist EbMIC4 eine große Übereinstimmung zu der Gruppe der Fibrilline auf (siehe Abb. 3.19), die in der extrazellulären Matrix von Vertebraten wie *Homo sapiens* lokalisiert sind (Vakonakis and Campbell, 2007). Alle bisher identifizierten Fibrillin-Isoformen sind große Glykoproteine (ca. 350 kDa) und bilden die Hauptkomponenten der Mikrofibrillen in der extrazellulären Matrix (Vakonakis and Campbell, 2007). Ihre Struktur wird durch die Aneinanderreihung von 47 EGF-like Domänen, davon 43 EGF-Ca-Domänen beherrscht (Pereira et. al., 1993; Zhang et. al., 1994; Kielty et. al., 2002), die von einzelnen „transforming growth factor β -binding protein-like (TB) Domänen unterbrochen werden (Abb. 4.1).



Abb. 4.1: Durch SMART vorhergesagte Domänenstruktur von Fibrillin-1 von *H. sapiens*.

Erkennbar wird die dominante Vorherrschaft der EGF-Ca Domänen, deren Aneinanderreihung nur von vereinzelt TB Domänen unterbrochen werden. (Zugangsnummer: BAD16739)

Die Ca^{2+} -bindenden EGF-Ca-Domänen wurden bei Fibrillin-1 intensiv untersucht, wobei sich zeigte, dass sie eine wichtige Rolle bei Ca^{2+} -abhängigen Protein-Protein-Interaktionen spielen (Rao et. al., 1995). So interagiert Fibrillin-1 mit einer Vielzahl von Matrixkomponenten, wie Integrine (Lee et. al., 2004), Heparin (Cain et. al., 2005) oder

verschiedenen Isoformen von Fibulin (El Hallous et. al., 2007). Bedeutsam sind die Fibrilopathien beim Menschen, wie das Marfan-Syndrom. Bedingt durch verschiedene Mutationen im Fibrillin-1-Gen verändert sich die Struktur des Bindegewebes und führt zu einer vielfältigen Symptomatik (Kielty, 2006).

Sequenzanalyse von EbMIC4

Untersuchungen zur Organisation des Genortes von EbMIC4 mittels Southern Blot-Analysen von Restriktionsenzym-geschnittener gDNA zeigten, dass EbMIC4 nur von einem Gen kodiert wird. Auch andere TRAP-Proteine wie EmTSP250 (Witcombe et. al., 2003), PbTRAP (Sultan et. al., 1997) sowie PbCTRP (Dessens et. al., 1999) von *P. berghei* sind sogenannte „single copy“-Gene. Vor allem für Mutationsexperimente wie sie bei *T. gondii* oder *Plasmodium* spp. praktiziert werden, ist es nicht unwichtig den Genort zu kennen.

Die DNA-Sequenz von EbMIC4 zeigte eine komplexe Intron-Exon-Struktur, wie sie auch schon bei EmTSP250 nachgewiesen wurde (Witcombe et. al., 2003). Die identifizierte gDNA-Sequenz beläuft sich auf ca. 8700 bp. Die kodierende Sequenz, verifiziert über RT'-PCR, umfasst 5481 bp, aufgeteilt auf acht Exons, die von kleinen Introns unterbrochen und von größeren eingerahmt werden (siehe Abb. 3.11).

Die vorhergesagte Proteinsequenz weist 1827 aa, mit einem berechneten Molekulargewicht von 191,45 kDa und einem pI von 4,14 auf. Das homologe Protein von *E. tenella* EtMIC4 ist das größte identifizierte Mikronemenprotein, das bei der Fraktionierung und Charakterisierung der Mikronemenantigene von *E. tenella*-Sporozoiten (Kawazoe et. al., 1992) identifiziert wurde. Es besitzt ein theoretisch ermitteltes Molekulargewicht von 218 kDa und der vorhergesagten isoelektrischen Punkt (pI) liegt bei 4,0 (Tomley et. al., 2001). Für EmTSP250, das Pendant bei *E. maxima*, wurde ein Molekulargewicht von 246 kDa und ein pI von 4,2 vorhergesagt (Witcombe et. al., 2003). Die ähnlich sauren isoelektrischen Punkte der drei Proteine sind auf einen erhöhten Anteil negativ geladener Aminosäuren zurückzuführen.

EbMIC4 ist bezogen auf die anderen beiden Proteine wesentlich kleiner. Dies ist nicht auf die fehlende N-terminale Sequenz zurückzuführen, wie Sequenzvergleiche zeigen.

Wie EtMIC4 und EmTSP250 (Tomley et. al., 2001; Witcombe et. al., 2003) weist auch EbMIC4 eine dreigeteilte Struktur auf. Eine kurze Transmembrandomäne nahe des C-terminalen Endes teilt das Protein in einen kurzen zytoplasmatischen Bereich und einem großen extrazellulär liegenden Hauptteil. Analysen der Polypeptidsequenz offenbarten eine Vielzahl von strukturellen und funktionellen Merkmalen, die EbMIC4 zur TRAP-Proteinfamilie der Apikomplexa zuordnen lassen. Mitglieder der TRAP-Familie besitzen eine oder mehrere Kopien der Typ-1-Wiederholung des humanen Blutplättchen-Thrombospondins (TSP-1

Domäne) und sind bei Apikomplexa an der Mobilität und Invasion des Parasiten in die Wirtszelle beteiligt. So wurde durch homologe Rekombination das „single copy“-Gen von PbTRAP in *P. berghei*-Sporozoiten ausgeschaltet, wonach sich zeigte, dass das TRAP-Protein zwar keinen Einfluss auf die Bildung der Sporozoiten besitzt, wohl aber auf deren Bewegungs- und Invasionsfähigkeit. Beides war gegenüber den Kontrollen deutlich herabgesetzt (Sultan et. al., 1997). Ohne PbTRAP war es den Sporozoiten nicht möglich, sich *in vitro* zu bewegen oder in die Speicheldrüsenzellen der Anopheles-Mücke einzudringen. Auch das „circumsporozoite-TRAP-related“ Protein (CTRP) in *P. falciparum*-Ookineten und das Protein TgMIC2 von *T. gondii* gehören zu dieser Proteingruppe. Unterschiedliche Mutationen und Deletionen im zytoplasmatischen Teil dieser Proteine führten auch hier zu einer herabgesetzten Invasionsfähigkeit (Kappe et. al., 1999).

Wie in Abb. 3.15 erkennbar, zeigt EbMIC4 viele Übereinstimmungen mit dem C-terminalen Teil diverser TRAP-Proteine. Wie die meisten anderer TRAP-Proteine befindet sich nahe dem Ende des C-Terminus ein hoch konservierter Tryptophanrest, der in der Protein-Protein-Interaktion eine wichtige Rolle spielen soll. In Untersuchungen an *T. gondii* wurde als potentieller Interaktionspartner von TgMIC2 die Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, dem Schlüsselenzym der Glykolyse, identifiziert (Jewett and Sibley, 2003), der man auch die Fähigkeit zur Interaktion mit F-Aktin bescheinigt (Wang et. al., 1997; Schindler et. al., 2001). Mit Hilfe von „site-directed“-Mutagenese-Experimenten wurde bei *T. gondii* gezeigt, dass bestimmte Aminosäuren der Aldolase (R₄₂, K₁₀₇, R₁₄₈ und K₂₂₉) für die Interaktion mit F-Aktin verantwortlich sind (Wang et. al., 1996). Diese Aminosäuren konnte auch bei der EbAldolase, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und kloniert wurde, festgestellt werden (siehe Abb. 3.46). In dem dort dargestellten Sequenzvergleich sind die konservierten Aminosäuren Arginin an Position 43 und Lysin an Position 231 (bezogen auf *T. gondii*) zu finden. Aufgrund dieser Erkenntnisse lässt sich spekulieren, dass auch die hier identifizierte Aldolase von *E. bovis* mit F-Aktin interagiert und so ein Bestandteil des Glideosoms in den invasiven Stadien darstellt, wenn man annimmt, dass dieser Invasionsmechanismus auch bei *E. bovis* konserviert ist.

Untersuchungen zur Interaktion von TgMIC2 mit der TgAldolase zeigten, dass das hoch konservierte Tryptophan am C-terminalen Ende von TgMIC2 eine Schlüsselrolle bei der Interaktion mit der Aldolase spielt und, dass es zu einer direkten Interaktion der beiden Proteine kommt (Jewett and Sibley, 2003). Gezeigt wurde dies mit GST-Pulldown-Assays, wenn im Protein TgMIC2 das Tryptophan (W) durch Alanin (A) ersetzt wurde, war das veränderte Protein TgMIC2 (W/A) nicht mehr in der Lage an die Aldolase zu binden.

Auf Grundlage der Ergebnisse bei *T. gondii* wurde mit Hilfe von GST-Pulldown-Assays und Yeast-Two-Hybrid (YTH)-Analysen versucht, die Interaktionspartner von EbMIC4 zu finden.

Bei dem GST-Pulldown-Assay wurde generell nach potentiellen Bindungspartnern gefahndet, doch konnten mit dem beschriebenen Protokoll von Jewett und Sibley (2003) keine Proteine identifiziert werden, die mit dem zytoplasmatischen Teil von EbMIC4 interagieren. Da nicht auszuschließen war, dass zu geringe Proteinkonzentrationen diesen Versuch scheitern ließen, wurde mit der YTH-Analyse ein spezifischeres Verfahren herangezogen. Mit Hilfe der YTH-Analyse sollte die mögliche, direkte Interaktion von EbMIC4-C-Terminus mit der EbAldolase oder TgAldolase untersucht werden. Auch bei diesem Experiment konnte jedoch keine Interaktion festgestellt werden. Da auch der als interne Kontrolle mitgeführte Versuch zur beschriebenen Interaktion von TgMIC2 und TgAldolase nicht erfolgreich war, müssen auch experimentell-technische Ursachen für das Fehlschlagen in Betracht gezogen werden. Problematisch war von Anfang an die Klonierung bestimmter Sequenzen von *T. gondii* TgMIC2 in den Hefevektor pACT2. Die Ergebnisse der Sequenzierung der klonierten Sequenzen in den pACT2-Vektor waren sehr unzureichend, weshalb nie genau geklärt werden konnte, ob die richtigen Sequenzen kloniert wurden. Es war bisher nicht möglich, die fehlenden Sequenzen eindeutig zu klonieren.

Alternativ erhebt sich natürlich die Frage, ob EbMIC4 überhaupt in dieser Konformation an die Aldolase binden kann. EbMIC4 sowie EtMIC4 und EmTSP250 zeigen doch einige Unterschiede zu TgMIC2 (siehe Abb. 3.15):

1. Die drei ersteren Proteine besitzen einen längeren zytoplasmatischen Teil als TgMIC2, mit mehreren Aminosäuren im Anschluss an den Tryptophanrest (siehe Abb. 3.15),
2. neben dem hochkonservierten Tryptophan befindet sich bei den drei Proteinen ein Tyrosin, und
3. es besteht eine hohe Homologie der C-terminalen Aminosäuren der drei Proteine im Vergleich zu TgMIC2.

Zellen besitzen eine Vielzahl von Möglichkeiten ihre Proteine zu bearbeiten und zu verändern. Diese als posttranslationale Modifikationen bezeichneten Prozesse laufen entweder konstitutiv ab, oder werden durch die Umwelt beeinflusst. Ein Beispiel für eine mögliche Modifikation ist das kovalente Binden einer Phosphatgruppe an einen Aminosäurerest. Die häufigsten Aminosäuren, die phosphoryliert werden, sind Serin, Threonin und Tyrosin. Tyrosinreste werden weit weniger für Phosphorylierungen genutzt als Serin- und Threoninreste (1:2000). Phosphorylierungen sind wichtige Regulatoren in den biologischen Zellabläufen. Aufgrund der Anlagerung einer Phosphatgruppe kann es zu einer Konformationsänderung des Proteins kommen, wodurch zwei unterschiedliche Formen des Proteins vorliegen (aktiv, inaktiv). Aber auch Protein-Protein-Interaktionen werden durch eine mögliche Phosphorylierung gesteuert (Lodish et. al., 1996).

Auf Grundlage der *in silico*-Analyse lag das Potential für eine mögliche Phosphorylierung des Tyrosinrestes neben dem Tryptophan im C-terminalen Ende von EbMIC4 bei fast 100%. Aufgrund dieses Ergebnisses kann spekuliert werden, dass diese Phosphorylierungsstelle für die Funktion von EbMIC4 wichtig ist. Vielleicht kommt es durch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes zu einer Konformationsänderung, die es dem Protein dann ermöglicht, mit einem anderen Protein über den bis dahin blockierten Tryptophanrest zu interagieren, der bei TgMIC2 bekanntlich mit der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase interagiert (Jewett and Sibley, 2003).

Wie der zytoplasmatische Teil ist auch die Transmembrandomäne, die die Plasmamembran durchspannt, bei den TRAP-Proteinen hochkonserviert (siehe Abb. 3.15, Abb.4.2). Die kurze Sequenz besteht bei EbMIC4 je nach Computerprogramm aus 24-29 aa und wird durch die aliphatischen, hydrophoben Aminosäuren Alanin, Glycin, Valin und Leucin dominiert.

	Transmembrandomäne
EbMIC4	AAVAGGVGGLLLIAAMGGGYAA ^Y
EtMIC4	AAVAGGVGGVLLIAAVGGGVAA ^F
EmTSP250	AAVAGGVGGVLLLAAGGGVAA ^Y
EtMIC1	AAVAGGVAGGVLAIAAGAG-A ^F
TgMIC2	GAIAGGVIGGLILLGAAG-GAS ^Y
TgMIC6	GAIAGGVIGGLLLLSAAGAGVAY
TgMIC12	AAIAGGVVGGVLLIAGGAGAAV ^Y
PbTRAP	IKIAGGIIGGLAIIGCIG--VG ^Y
PfTRAP	YKIAGGIAGGLALLACAG--LA ^Y

Abb. 4.2: Vergleich der Aminosäuresequenz der TM-Domäne verschiedener Mikronemenproteine.

Unterlegt sind die stark konservierte Aminosäurereste in der TM (rot) und der konservierte Tyrosinrest am C-terminalen Ende der TM (gelb). Mikronemenproteine von *Eimeria ssp.* (EbMIC4, EtMIC4, EmTAP250, EtMIC1), *T. gondii* (TgMIC1, TgMIC2, TgMIC12) und *Plasmodium ssp.* (PbTRAP, PfTRAP) (modifiziert nach Opitz et. al., 2002).

Untersuchungen bei verschiedenen TM-tragenden Mikronemenproteinen bei den Apikomplexa zeigten, dass in der Region eine hochkonservierte, proteolytische Schnittstelle vorhanden ist (Dowse and Soldati, 2004). Aktive, extrazellulär liegende Proteasen zerschneiden die Mikronemenproteine auf der Parasitenoberfläche, wenn die entsprechenden TM-Proteine am distalen Ende des Parasiten angelangt sind, um eine Störung des Invasionsprozesses zu verhindern. So wurde gezeigt, dass zwei verschiedene Proteasen (TgMPP1 und TgMPP2) TgMIC2 nach der Exozytose prozessieren (Carruthers et. al., 2000). „Site-directed-Mutagenese“-Experimente bei denen die Sequenz „AGGVIGG“ durch „VALVIGV“ oder „VALVIVL“ ersetzt wurde, behinderten die postexozytotische Prozessierung am C-terminalen Ende von TgMIC2 (Opitz et. al., 2002). Die TgMPP1-Schnittstelle hatte bei TgMIC2 und TgMIC6 die Erkennungssequenz „IA*GG“ (*-Schnittstelle)

(Dowse and Soldati, 2004). TgMIC12, ein sehr großen, bisher noch nicht vollständig charakterisiertes Protein bei *T. gondii* und angeblich homolog zu EmTSP250 und EtMIC4, wird ebenfalls von der Protease TgMPP1 geschnitten (Opitz et. al., 2002; Dowse and Soldati, 2004). TgMPP-1 (rhomboid-like protease 5, Zugangsnummer: Q6GV23). gehört neben vier weiteren Proteasen bei *T. gondii* zur Superfamilie der Rhomboid-ähnlichen Proteasen und ist in den Mikronemen gespeichert (Brossier et. al., 2005). Datenbankabgleiche mit der Sequenz von TgMPP-1 ergaben bisher keine vergleichbaren Sequenzen bei Eimerien. Es zeigte sich aber, dass diese Rhomboid-ähnlichen Proteasen ubiquitär in anderen Gattungen der Apikomplexa sowie in anderen Eukaryota und in Bakterien zu finden sind. Vergleichende Analysen von EbMIC4, EtMIC4 und EmTSP250 zeigen, dass sie an der potentiellen Schnittstelle die gleiche Sequenz „**AGGVIGG**“ besitzen. Ein weiterer Hinweis, dass auch die drei Proteine an dieser Stelle geschnitten werden, ist der Umstand, dass Bestandteile von EtMIC4 im *in vitro*-Überstand von infizierten Zellen gefunden wurden (Periz et. al., 2007). Wenn man weiterhin davon ausgeht, dass die Informationen zu TgMIC12 korrekt sind, kann spekuliert werden, dass EbMIC4 ebenfalls postexozytotisch an dieser Stelle prozessiert wird, auch wenn bisher die entsprechenden Proteasen noch nicht identifiziert wurden.

Wie auch bei EbMIC4 befindet sich bei vielen anderen TRAP-Proteinen am Übergang von der Transmembrandomäne zum zytoplasmatischen Teil ein Tyrosinrest, der in der *silico*-Analyse kein Phosphorylierungspotential besitzt (Abb. 4.2, gelb). „Site-directed-Mutagenese“-Experimente an TgMIC2 offenbarten, dass dieser Tyrosinrest Bestandteil einer Zielsequenz ist, die aus zwei Motiven besteht und für den Transport des Proteins vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den Mikronemen wichtig ist (Di Cristina et. al., 2000). Solches auf Tyrosin basierende Sortierungssignale am zytoplasmatischen Teil von Proteinen wurden auch schon bei anderen eukaryotischen Organismen beschrieben (Matter et. al., 1994; Sandoval and Bakke, 1994; Mellman, 1996; Le Borgne and Hoflack, 1998). Beim ersten Motiv „**SYHYY**“ zeigt die Substitution des einzelnen Tyrosins („**SF/NHYY**“) auf eine entscheidende Rolle des Tyrosinrestes hin. Aber auch die beiden anderen Tyrosine zeigen, wenn sie gleichzeitig substituiert werden, dass sie für das Signal von wichtiger Bedeutung sind (Di Cristina et. al., 2000). Daneben gibt es ein weiteres Motiv in Richtung C-Terminus „EIEYE“, das bei TgMIC2 für den gerichteten Transport unentbehrlich ist. Dieses Motiv „EXEY/FE“ wurde bisher nur bei *T. gondii* und *N. caninum* gefunden (Di Cristina et. al., 2000). Verglichen mit TgMIC2, weist EbMIC4 nur zum ersten der beschriebenen Motive eine Ähnlichkeit auf: „**AYSRG**“. Da dieses Motiv bei EtMIC4 fast gleich ist („**AYS GG**“), kann man spekulieren, dass dieses Motiv als Tyrosin basierendes Signal für den Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den Mikronemen eine wichtige Rolle spielt. Des Weiteren gibt es bei EbMIC4, EtMIC4 sowie EmTSP250 im zytoplasmatischen Bereich eine Glutaminsäure-reiche Sequenz, die dem

Motiv „EXEY/FE“ sehr ähnlich ist (siehe Abb. 3.15) (EbMIC4: „EQVMFE“ und bei den anderen „EQVEFE“). Eine Erweiterung der Mutationsexperimente bei *T. gondii*, bei denen in der TgMIC2-Sequenz beide Motive durch die Motive von EbMIC4 ersetzt werden, könnte zeigen, ob diese Bereich in ihrer abgewandelten Form die gleiche Funktion erfüllt, nämlich den gerichteten Transport hin zu den Mikronemen. Damit würde EbMIC4 ebenfalls über ein Tyrosin basierendes Sortierungssignal verfügen, dass aus zwei Teilbereichen besteht.

Dominiert wird das Protein EbMIC4 durch die ausgedehnte extrazelluläre Domäne am N-terminalen Teil, die mehr als 95% der Gesamtlänge ausmacht. Die bisher identifizierte Sequenz zeigt eine tandemartige Aneinanderreihung von 31 EGF-like-Domänen, die von zwei Bereichen mit TSP-1-Domänen eingerahmt wird. Dieser Aufbau wurde bisher nur bei den Proteinen EtMIC4 und EmTSP250 identifiziert und beschrieben. Auch ihre Struktur wird durch Aneinanderreihung von 31 EGF-like-Domänen beherrscht. Die N-terminale Endsequenz konnte bei EbMIC4 bisher nicht identifiziert werden. Sie ist bei anderen Mikronemenproteinen (Tomley and Soldati, 2001; Soldati et. al., 2001; Meissner et. al., 2002) durch ein typisches hydrophobes Signalpeptid gekennzeichnet, wie es auch bei EmTSP250 (Witcombe et. al., 2003) und EtMIC4 (pers. Mittlg. Tomley) gefunden wurde. Diese N-terminale Signalsequenz vermittelt den kotranslationalen Transport ins Endoplasmatische Retikulum während der Synthese an den Ribosomen (Ngo et. al., 2000; Tomley and Soldati, 2001).

Bei EtMIC4 wurde gezeigt, dass die EGF-Ca-Domänen eine Ca^{2+} -bindende Aktivität besitzen (Periz et. al., 2005). Dies führt im Ca^{2+} -reichen Extrazellularbereich theoretisch zur vollständigen Absättigung der potentiellen EGF-Ca-Bindungsstellen, was eine Konformationsänderung zur Folge hat. In den Mikronemen noch kompakt und flexibel nimmt EtMIC4 dann eine stabile, verlängerte und starre Struktur (100 nm Länge) mit wenigen, potentiellen Gelenk-Regionen zwischen EGF-Ca/EGF-like-Übergängen sowie TSP-1-Domänen ein. Außerdem schützt diese Konformation gegen den proteolytischen Abbau durch Wirtsproteasen, die im Verdauungstrakt in hoher Konzentration vorkommen (Periz et. al., 2005). Auch bei den homologen Fibrillinen induziert die Bindung von Ca^{2+} an die EGF-Ca-Domänen eine Änderung der Konformation hin zu einer verlängerten stabförmigen Struktur (Ramirez et. al., 1993; Kielty et. al., 2002; Vakonakis and Campbell, 2007), wodurch sich die Interaktion und die Zusammenlagerung einzelner Fibrilline zu Makroaggregate verbessert (Ramirez et. al., 1993). Auch hier schützt die Konformation gegen den proteolytische Abbau (Ramirez et. al., 1993). Bis auf eine Domäne (EGF-like-statt EGF-Domäne) weist EbMIC4 die gleiche Verteilung der EGF-Domänen auf wie EtMIC4 und EmTSP250 (siehe Abb. 3.20). Vor allem die EGF-Ca-Domänen sind vollkommen identisch. Damit kann in hohem Maße davon ausgegangen werden, dass EbMIC4 die

gleiche, durch Ca^{2+} -Anlagerung an die EGF-Ca-Domänen hervorgerufene Konformation einnimmt, wenn die Mikronemenproteine an die Parasitenoberfläche gelangen. Andere bisher bekannten Mikronemenproteine, die über EGF-Domänen verfügen ist, weisen eine wesentlich geringere Anzahl an EGF-like-Domänen auf. Bei *T. gondii* wurden bisher fünf weitere Mikronemenproteine mit EGF-like-Domänen identifiziert: TgMIC3 und TgMIC6-9 (Garcia-Reguet et. al., 2000; Reiss et. al., 2001; Meissner et. al., 2002). TgMIC3 ist ein 90 kDa großes, lösliches Adhäsionsprotein, das an die Wirts- und Parasitenoberfläche bindet (Garcia-Reguet et. al., 2000). TgMIC6 bildet mit den löslichen Proteinen TgMIC1 und TgMIC4 einen Komplex und dient als Begleiter (Reiss et. al., 2001; Meissner et. al., 2002). TgMIC8 ist mit den Mikronemenprotein TgMIC3 assoziiert und begleitet dieses bei der Exozytose an die Parasitenoberfläche. TgMIC7 und TgMIC9 haben die gleiche Funktion in den Bradyzoiten von *T. gondii*, wo sie andere Mikronemenproteine begleiten (Reiss et. al., 2001; Meissner et. al., 2002).

Neben dieser dominanten Struktur besitzt EbMIC4 zwei Bereiche mit TSP-1-Domänen. Insgesamt wurden bei der *in silico*-Analyse von EbMIC4 nur drei TSP-1-Domänen erkannt, wobei weitere vier degradierte Domänen durch den Abgleich mit der Sequenz von EtMIC4 und EmTSP250 identifiziert werden konnten (siehe Abb. 3.14). Die Konsensussequenz von TSP-1-Domänen („xxxWxxWxxWxxCSxTCGxGxxxRxRxC“), die durch den Vergleich von verschiedensten Proteinen erhalten wurde (Adams and Tucker, 2000), wird dabei aber nicht immer genau eingehalten. Insgesamt zeigt sich, dass die TSP-1-Bereiche gegenüber EtMIC4 und EmTSP250 verkürzt sind und somit weniger TSP-1-Domänen vorhanden sind. So besitzt EtMIC4 in der unvollständigen Sequenz 12 TSP-1-Domänen (Tomley et. al., 2001), wobei in der *in silico*-Analyse mit dem SMART-Programm nur sieben erkannt wurden. EmTSP250 besitzt in drei distinkten Regionen insgesamt 16 TSP-1-Domänen (Witcombe et. al., 2003), wobei auch hier nur 11 Domänen in der *in silico*-Analyse mit dem SMART-Programm erkannt wurden. Daneben enthalten weitere bekannte Mikronemenproteine in verschiedensten Gattungen der Apikomplexa TSP-1-Domänen so beispielsweise TgMIC2, EtMIC1 und PfTRAP (Robson et. al., 1990; Tomley et. al., 1991; Wan et. al., 1997). In der *in silico*-Analyse mit dem SMART-Programm besitzen die sehr ähnlichen Proteine TgMIC2 und EtMIC2 jeweils sechs aneinandergereihte TSP-1-Domänen und PfTRAP von *P. falciparum* eine TSP-1-Domäne. Im Vergleich zu EbMIC4 sind diese Proteine wesentlich kleiner und besitzen keine EGF-like-Domänen. Stattdessen sind sie durch eine I-Domäne gekennzeichnet. Untersuchungen zur Funktion von TgMIC2 ergab, dass es am Invasionsprozess als Mittler zwischen Wirtszelloberfläche und Glideosom direkt beteiligt ist (Sultan et. al., 1997; Kappe et. al., 1999). Außerhalb der Apikomplexa besitzen TSP-1-Domäne vielfältige Funktionen wie Protein-, Heparin- und Zellbindung,

Neuronenwachstum, TGF β -Aktivierung, Inhibierung der Angiogenese sowie Proliferation und Induktion der Apoptose (Adams, 1997). Als potentielle Bindungsrezeptoren wurden CD36, HSPG, Sulfide β_1 -Intergine sowie kleine Proteine identifiziert (Chen et. al., 2000).

Verschiedene Untersuchungen bei unterschiedlichen Apikomplexa zeigten, dass die Mikronemenproteine Komplexe ausbilden, die schon früh im sekretorischen Signalweg im Endoplasmatischen Retikulum zusammengesetzt und dann in den Mikronemen gespeichert werden. Drei verschiedene Mikronemenproteinkomplexe wurden bisher bei *T. gondii* identifiziert: TgMIC4/TgMIC1/TgMIC6, TgMIC2/TgM2AP und TgMIC3/TgMIC8 (Rabenau et. al., 2001; Reiss et. al., 2001; Meissner et. al., 2002; Dowse and Soldati, 2004). Alle Komplexe beinhalten immer ein Transmembranprotein (TgMIC6, TgMIC8, TgMIC2), das u. a. für die richtige Positionierung des Komplexes essentiell ist. Daran gebunden lösliche Mikronemenproteine (TgMIC1, TgMIC4, TgMIC3), die aufgrund ihrer Domänenstruktur die Fähigkeit besitzen an unterschiedlichen Strukturen der Wirtsoberfläche zu binden (Fourmaux et. al., 1996; Garcia-Reguet et. al., 2000; Brecht et. al., 2001; Lourenco et. al., 2001). Zum Beispiel bildet TgMIC2/TgM2AP einen stabile hexameren Komplex bestehend aus jeweils drei $\alpha\beta$ -Dimeren (Jewett and Sibley, 2004), der für eine schnelle Invasion in die Wirtszelle notwendig ist (Huynh et. al., 2004). TgMIC6 stellt das Begleitprotein für die beiden löslichen Proteine TgMIC1 und TgMIC4 dar. Dabei wird TgMIC4 über TgMIC1 an TgMIC6 gebunden, die stöchiometrische Verteilung ist dabei bisher noch unklar (Reiss et. al., 2001).

Auch bei *E. tenella* wurden Komplexe aus unterschiedlichen Mikronemenproteinen identifiziert. So bilden EtMIC1 und EtMIC2, welche homolog zu den Proteinen TgMIC2 und TgM2AP sind, ebenfalls einen Komplex aus (Rabenau et. al., 2001; Periz et. al., 2007). Die Expression von EtMIC1 in *T. gondii* erlaubte das Ausschalten vom essentiellen Gen von TgMIC2 ohne Funktionsverlust (Huynh et. al., 2004). Ein weiterer Komplex wird zwischen EtMIC4 und EtMIC5 ausgebildet (Periz et. al., 2007). EtMIC5 ist ein ca. 100 kDa großes, lösliches Mikronemenprotein mit 11 tandemartig angeordneten „Apple“-Domänen und ist homolog zu TgMIC4 (Brown et. al., 2001; Brown et. al., 2003). Dabei kommt zur Ausbildung eines sehr großen zusammengesetzten Proteinkomplex mit einer Gesamtmasse von über 2 MDa, bestehend aus zwei Homomultimeren von EtMIC4 sowie EtMIC5, die in sich durch Disulfidbrückenbindungen stabilisiert werden. Diese binden nicht kovalent in der Stöchiometrie [EtMIC4] $_8$: [EtMIC5] $_4$ aneinander (Periz et. al., 2007). Aufgrund dieser Erkenntnisse kann spekuliert werden, dass EbMIC4 ebenfalls einen Komplex mit einem bisher nicht identifizierten Mikronemenprotein ausbildet, der dann an der Oberfläche des Parasiten befindlich, an die Wirtsoberfläche bindet.

Stadienspezifische Transkription von EbMIC4

Die Transkription von *Ebmic4* im Laufe der Entwicklung von *E. bovis* wurde mittels RT²-PCR Studien analysiert. Als interne Referenz und Positivkontrolle diente das Gen vom Hitzeschockprotein EbHSP70, dessen Sequenz im Zuge dieser Arbeit identifiziert und kloniert werden konnte. Namensgebend für die Hitzeschockproteine war, dass seine Expression, durch Hitzeschock induzierbar war (Tissieres et. al., 1974). Dass die Hitzeschockproteine nicht nur bei Stressbedingungen bedeutend sind, sondern auch eine wichtige Rolle im normalen Zellstoffwechsel spielen, beweisen umfangreiche Arbeiten (Nover and Hightower, 1991; Morimoto et. al., 1994). So unterstützen sie unter anderem die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine oder deren Translokation. Als „molekulare Chaperone“ [Begriffsprägung von Laskey et. al. (1978), Ellis (1990)] hielten sie in der Literatur Einzug, und heute ist bekannt, dass die Proteinfaltung *in vivo* generell von Helferproteine begleitet wird, die vornehmlich der Gruppe der Hitzeschockproteine zugeordnet werden kann (Georgopoulos and Welch, 1993; Hendrick and Hartl, 1993). Die meisten identifizierten Proteine werden den HSP60-, HSP70- oder HSP90-Familien zugerechnet (Gething and Sambrook, 1992). Aufgrund der Tatsache, dass diese Proteine an wichtigen Zellprozessen beteiligt sind, kann davon ausgegangen werden, dass HSP70-Proteine meistens konstitutiv exprimiert werden. Vortests für *Ebhsp70* zeigten eine Transkription auf annähernd gleichbleibendem Niveau, was die Anfangsvermutungen bestätigte.

Angestrebt war eine Untersuchung des Transkriptionsprofils von *Ebmic4* von unsporulierten Oozysten bis hin zu den Merozoiten I. Aufgrund der geringen Menge an isolierbarer Total-RNA aus unsporulierten und sporulierten Oozysten konnte für diese Stadien keine Aussage getroffen werden. Untersucht wurden die *E. bovis*-Sporozoiten und –Merozoiten I sowie die Entwicklungsstadien während der ersten Merogonie. Es zeigte sich, dass *Ebmic4* in Sporozoiten und Merozoiten I transkribiert wird. Dabei war aber die Transkription in *E. bovis*-Sporozoiten deutlich schwächer als in den Merozoiten, verglichen mit dem *Ebhsp70*-Kontrolltranskript (siehe Abb. 3.24). Untersuchungen zur Transkription von *Emtsp250*, dem Homologen von *Ebmic4* in *E. maxima*, zeigten, dass das Gen in Merozoiten sowie sporulierten Oozysten nicht aber in Gametozyten transkribiert wird (Witcombe et. al., 2003). *Etmic2*-Transkript aus *E. tenella* wurden in sporulierten Oozysten, Sporozoiten und Merozoiten I nicht aber in unsporulierten Oozysten nachgewiesen (Tomley et. al., 1996). Eine sehr detaillierte Untersuchung zur Transkription verschiedener Mikronemenproteine von *E. tenella* während der Sporulation zeigte, dass die mRNAs der *Etmic1-5*-Gene spätestens 12 h nach deren Beginn nachweisbar waren (Ryan et. al., 2000), d. h. im frühen Vierzellenstadium der Oozysten während der Sporulation (Ferguson et. al., 1978; Ryan et. al., 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse kann man für *E. bovis* vermuten, dass die

Transkription von Ebmic4 ebenso in einem frühen Stadium der Sporulation einsetzt. Die relativ geringere Transkriptmenge von Ebmic4 in den *E. bovis*-Sporozoiten könnte ein Hinweis sein, dass in den Sporozoiten das fertige Protein bereits zur Verfügung steht, und die Transkription nur noch auf einem geringeren Niveau fortbesteht.

Im Gegensatz zu den meisten Apikomplexa benötigt *E. bovis* für die erste Merogonie eine relativ lange Zeit, *in vitro* bis zu 3 Wochen, bis zur vollständigen Ausreifung der Merozoiten I. In einer *in vivo*-Merogonie kommt es während den ersten 2-3 Tage zum Abrunden des eingedrungenen Sporozoiten zu Trophozoiten (Hammond and Fayer, 1968), die sich in den folgenden Tagen zu immaturren Meronten weiterentwickelt. *In vivo* finden sich die ersten kleinen mehrkernigen immaturren Meronten am Tag 6 nach der Inokulation der Sporozoiten und ab dem 10. Tag p. i. sind die ersten Kammern in den Meronten erkennbar (Hammond et. al., 1946; Hammond et. al., 1966). Im Gegensatz zum Kontrollgen Ebhsp70, das über die gesamte Entwicklungszeit konstitutiv auf einem ähnlichen Niveau transkribiert wurde, zeigte Ebmic4 ein differenzierteres Bild (siehe Abb. 3.26), dass mit den Umwandlungsprozessen während der ersten Merogonie in Verbindung gesetzt werden kann. In den ersten Tagen nach der *in vitro*-Infektion war das Ebmic4-Transkript deutlich nachweisbar, teilweise verstärkte sich das Signal, war jedoch spätestens am 4./5. Tag p. i. kaum noch oder gar nicht mehr vorhanden. Der Nachweis des Ebmic4-Transkripts in den ersten drei Tagen nach der Infektion kann mit großer Wahrscheinlichkeit auf die vorhandene mRNA in den Sporozoiten zurückgeführt werden. Auch der teilweise vorhandene Anstieg der Transkriptmenge kann aufgrund der Eigenheiten der Sporozoiten erklärt werden. In der *in vitro*-Kultur lässt sich nämlich beobachten, dass die Vermehrung in den Wirtszellen nicht synchron verläuft, sondern dass während der ersten Tage immer wieder Sporozoiten aus der Zelle austreten, um sich eine neue Wirtszelle zu suchen (Behrendt et. al., 2004). Weiterhin kann man beobachten, dass sich nur ein Teil der eingedrungenen Sporozoiten weiter entwickelt (ungefähr 10%, der eingedrungenen Sporozoiten; pers. Mittlg. Taubert). Während der Bildung der Trophozoitenphase unterbleibt die Ebmic4-mRNA Synthese offensichtlich. Nach Hammond und Fayer (1968) findet die Abrundung der Sporozoiten *in vivo* in den ersten drei Tagen statt. Diese schnelle Umwandlung konnte bei der *in vitro*-Entwicklung in BUVEC nicht beobachten werden, der Parasit benötigt hier einige wenige Tage mehr. So korrelierte der niedrige Ebmic4-mRNA-Level mit der Trophozoitenentwicklung. Ab dem 10./12. Tag p. i. werden die ersten kleinen immaturren Meronten in der *in vitro*-Kultur sichtbar. Zur gleichen Zeit steigen die Transkriptmengen wieder leicht an, so dass anscheinend auch die immaturren Merozoiten zu diesem Zeitpunkt schon Ebmic4 transkribieren. Der anschließende, rasche Anstieg der Transkriptmenge von Ebmic4 zum Ende der Merogonie verläuft synchron mit der massiven Vermehrung und

Reifung der Merozoiten I. Es ist somit anzunehmen, dass die mRNA schon vor dem Austritt der Merozoiten I in einem hohen Maße synthetisiert wird. Auch hier wieder ein Hinweis, dass die muren Merozoiten I das Protein herstellen und in den Mikronemen speichern. Um die Hypothesen zu überprüfen, wurden Expressionsstudien durchgeführt.

Stadienspezifische Expression von EbMIC4

Um die Expression des Ebmic4-Gens zu erfassen, wurde nach geeigneten Antigenen für die Herstellung polyklonaler Antikörper gesucht. Dafür wurde versucht, unterschiedliche Bereiche von EbMIC4, die keine stark konservierten Domänen enthielten, rekombinant zu exprimieren. Zum einen wurde der zytoplasmatische Teil von EbMIC4 genutzt, gegen den auch Antisera hergestellt werden konnten. Weiterhin sollten Antisera gegen den extrazellulären Bereich von EbMIC4 hergestellt werden. Letzteres scheiterte an methodischen Problemen, die nicht gelöst werden konnten, so dass es nicht möglich war, weitere Bereich von EbMIC4 rekombinant zu exprimieren. Für die Herstellung eines Antiserums gegen das komplette aufgereinigte EbMIC4 wie von Tomley et. al., 2001 beschrieben, war nicht genug Ausgangsmaterial vorhanden. So standen am Ende drei Antisera für die Untersuchungen zur Verfügung:

1. Ein polyklonales, monospezifisches Antiserum gegen das EtMIC4-Gesamtprotein: RαEtMIC4 (zur Verfügung gestellt von Frau Tomley), (Tomley et. al., 2001)
2. Zwei Antisera, die gegen den rekombinant hergestellten, zytoplasmatischen Teil von EbMIC4 (anti-EbMIC4-Cterm) gerichtet waren

Die Antisera gegen das rekombinante EbMIC4-Cterm erkannten die rekombinant hergestellte Teilsequenz von EbMIC4, gegen die sie gerichtet waren (siehe Abb. 3.28). Beide Antisera erfassten in den *E. bovis*-Sporozoiten- wie -Merozoitenantigen im Western Blot eine dominante Bande bei ca. 245 kDa. Das zweite Antiserum K2 erkannte eine weitere dominante Bande bei ca. 110 kDa, weshalb es für weitere Untersuchungen zur Lokalisation von EbMIC4 als nicht spezifisch genug angesehen wurde. Grund dafür kann die Bindung der Antikörper gegen Epitope sein, die aufgrund der hohen Homologie auch in anderen Mikronemenproteine vorkommen können. Dieser Umstand eröffnet vielleicht die Möglichkeit weitere Proteine von *E. bovis* zu identifizieren.

Vergleichende Antikörper gegen den C-terminalen, zytoplasmatischen Teil von Mikronemenproteinen wurden auch im Falle anderer Eimerien hergestellt. Frühere Untersuchungen zur Immunität von Hühnern gegen Kokzidien wurde das Oberflächenantigen 5401 als potentieller Vakzinekandidat gegen die Kokzidiose identifiziert

(Danforth et. al., 1989). Später stellte sich heraus, dass dieser cDNA-Klon für den C-terminalen Teil von EtMIC4 kodiert (Tomley et. al., 2001). Auch im serologischen Nachweis von EmTSP250 wurde der C-terminale Teil einschließlich der Transmembrandomäne zur Herstellung von Antisera verwendet (Witcombe et. al., 2004). Diese markierten im aufgetrennten Gesamtprotein von sporulierten *E. maxima*-Oozysten eine Proteinbande mit einer Größe von ca. 250 kDa. Weiterhin markierten die Antisera in elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Mikronemen in den *E. maxima*-Merozoiten, sowie in lichtmikroskopischen Untersuchungen den apikalen Pol der Merozoiten von *E. maxima* und *E. tenella*, womit auch eine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden konnte (Witcombe et. al., 2004).

Das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Antiserum anti-EbMIC4-Cterm erfasste EbMIC4 im aufgetrennten Gesamtprotein (siehe Abb. 3.35) am ersten und am 20 Tag p. i. sehr deutlich und schwach am 4. Tag p. i. Dazwischen konnte EbMIC4 nicht in den Wirtszellen dargestellt werden. Damit zeigt sich, dass das von Ebmic4 kodierte Protein auch nur zu Beginn und am Ende der ersten Merogonie auftrat. Anmerken muss man, dass aufgrund der Versuchsanordnung, die Infektionsrate mit 7%- und 17%-Prozent relativ niedrig war, womit die Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Menge an Protein unter die Nachweisgrenze sinken kann. Trotzdem bestätigen die Ergebnisse die mRNA-Studien.

Um ein differenzierteres Bild auf Einzelzellebene zu erhalten, wurden Lokalisationsstudien an MeOH-fixierten Sporozoiten, Merozoiten und *E. bovis*-infizierten Wirtszellen mit anschließender Auswertung am konfokalen Mikroskop durchgeführt. Das verwendete Antiserum gegen EtMIC4 reagiert im aufgetrennten Gesamtprotein von *E. tenella*-Sporozoiten mit einer dominanten Polypeptidbande bei über 200 kDa (Tomley et. al., 2001), die dem EtMIC4 zugeordnet werden konnte. Aufgrund der Ergebnisse von Tomley et. al. (2001) kann man mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass wenn eine Kreuzreaktion mit *E. bovis* beobachtet wird, diese EbMIC4 betrifft, da die Proteinsequenzen zwischen den beiden Proteinen sehr ähnlich sind. Anti-EtMIC4 und Anti-EbMIC4-Cterm reagierten in *E. bovis*-Sporozoiten und -Merozoiten erwartungsgemäß und übereinstimmend im apikalen Bereich der Parasiten.

In abgeschwächter Form wurde EbMIC4 auch weiter distal gebunden, vor allem vom anti-EtMIC4-Antiserum. Da die Pellikula der Parasiten wegen der Fixierung mit MeOH für die Antikörper durchlässig war, konnte bei diesem Versuchsansatz nicht definiert werden, ob die Markierung außen und/oder im Zytosol erfolgte. Versuche in denen die Fixierung mit PAGA vorgenommen wurde, d. h. bei denen die Pellikula Antikörper-undurchlässig war, führten nicht zur Bindung von anti-EbMIC4-Cterm, was aufgrund der Lage des C-terminalen Teils von EbMIC4 auch erwartet werden konnte. Den Versuchsansatz mit dem Antiserum anti-

EtMIC4 durchzuführen, scheiterten an der zur Verfügung stehenden Menge an Antiserum. Bei PAGA-fixierten, nicht permeabilisierten *E. tenella*-Sporozoiten konnte mit dem gleichen Antiserum EtMIC4 an der Oberfläche nachgewiesen werden (Tomley et. al., 2001). Aus diesen Ergebnissen kann spekuliert werden, dass EbMIC4 ebenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit an der Oberfläche nachweisbar ist, da alle bisher untersuchten Mikronemenproteine durch Exozytose an die Oberfläche sezerniert werden.

In *E. bovis*-infizierten, MeOH-permeabilisierten Wirtszellen wurde die Lokalisation von EbMIC4 mit dem EbMIC4-Cterm-Antiserum untersucht. Nach der Invasion der Sporozoiten kann EbMIC4 am apikalen Pol der intrazellulären Sporozoiten in der Mehrzahl der Fälle bis zum Tag 7 p. i. nachgewiesen werden. Sporozoiten, die sich nicht weiterentwickelten, ließen die Färbung auch zu späteren Zeitpunkten noch erkennen. Ansonsten war die Färbung nach dem 7. Tag p. i. nur noch ganz schwach als diffuse Markierung erkennbar. Erst später, wenn die Merozoiten gebildet werden, wird EbMIC4 wieder nachweisbar. Ab Tag 15 p. i. werden die ersten kleinen Meronten sichtbar, in denen die Markierung erkennbar war. Auch in der ersten Merogonie von *E. tenella* konnte gezeigt werden, dass die Expression von EtMIC4 mit der Entwicklung der Merozoiten assoziiert ist (Tomley et. al., 2001).

Die Ergebnisse der getrennten Untersuchungen zur Transkription und Proteinexpression von EbMIC4 in unterschiedlichen Entwicklungsphasen zeigen, beides stadienabhängig reguliert ist. Dabei wird die mRNA schon in den immaturren Vorstufen der invasiven Stadien gebildet. Das konnte auch in umfangreichen Arbeiten zur Sporulation von *E. tenella*-Oozysten (Ryan et. al., 2000) demonstriert werden. In den reifen invasiven Stadien steht EbMIC4 als Protein, in den Mikronemen gespeichert, zur Verfügung. Gleichzeitig ist die mRNA-Menge reduziert. Verglichen mit EtMIC4 und EmTSP250, weist EbMIC4 die gleiche Verteilung in den invasiven Stadien der Parasiten auf (Tomley et. al., 2001; Witcombe et. al., 2004). Die beobachteten Kreuzreaktivitäten der Antisera, anti-EtMIC4 reagiert mit *E. bovis*-Sporozoiten und –Merozoiten (s. o.) sowie Antisera gegen EmTSP250 reagierten mit *E. tenella*-Sporozoiten (Witcombe et. al., 2004) könnte eventuell dahingehend genutzt werden, um bei anderen Apikomplexa das vielleicht vorhandene Pendant zu EbMIC4 zu identifizieren.

Der Einfluss bestimmter Substanzen auf die Sekretion und Lokalisation von EbMIC4

Um die bei anderen Apikomplexa bekannte Substanz-induzierte Freisetzung von Mikronemenproteinen bei *E. bovis* zu überprüfen wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen mit fötalem Kälberserum (FKS), dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin und Cytochalasin D, einem potenten Inhibitor der Aktinpolymerisation (Brenner and Korn, 1980; Flanagan and Lin, 1980; Goddette and Frieden, 1986) durchgeführt. Ionomycin ist ein von *Streptomyces conglobatus* produziertes Antibiotikum gegen Gram-positive Bakterien, das in Säugerzellen als potentes und selektives Ca^{2+} -Ionophor fungiert (Liu and Hermann, 1978; Kauffman et. al., 1980). Im Versuch wurden *E. bovis*-Sporozoitien mit den Substanzen bei 37°C inkubiert. Unbehandelte, nur in PBS-kultivierte Sporozoitien dienten als Negativkontrolle und zeigten eine schwache, membranständige Markierung am apikalen Pol, wie auch bei Bumstead und Tomley (2000) für *E. tenella*-Sporozoitien beschrieben. Wurden *E. bovis*-Sporozoitien dagegen mit Wirtszellen konfrontiert oder mit FKS behandelt, war ein deutlich verstärktes Signal für EbMIC4 am apikalen Ende zu beobachten, welches sich durch eine Verlängerung der Inkubationszeit noch verstärkte. Auch diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen von Bumstead and Tomley (2000), die zeigten, dass die Sekretion von Mikronemenproteinen (EtMIC2) in *E. tenella*-Sporozoitien vor allem durch der Anwesenheit von potentiellen Wirtszellen induziert wird (Bumstead and Tomley, 2000). Weiterhin zeigten sie, dass die alleinige Inkubation der Sporozoitien in FKS-haltigen Medium zu einer artifiziellen EtMIC2-Sekretion führt. Dabei kommt es zu auch zu einem postexozytotischen Transport von EtMIC2 hin zum distalen Pol, der durch die gleichzeitige Inkubation mit Cytochalasin D unterbunden werden kann (Bumstead and Tomley, 2000). Ähnliche Beobachtungen konnten wir für *E. bovis* nicht machen. Aufgrund der Ergebnisse von Bumstead and Tomley (2000) ist zu vermuten, dass es bei FKS-stimulierten *E. bovis*-Sporozoitien ebenfalls zu einer Sekretion von EbMIC4 kommt. Die Mechanismen der FKS induzierten Sekretion der Mikronemenproteine bei *Eimeria* spp. ist bisher nicht bekannt. Bumstead and Tomley (2000) vermuten, dass der Einfluss von FKS auf den Ca^{2+} -Haushalt eine Rolle spielen könnte.

Die Behandlung von *E. bovis*-Sporozoitien mit 1% Ethanol führte zu einem schwachen, kappenförmigen Signal von EbMIC4 am apikalen Pol, das von der Intensität eher dem bei unbehandelten *E. bovis*-Sporozoitien entsprach und durch eine Verlängerung der Inkubationszeit nicht verstärkt werden konnte. Damit konnte ein induktiver Einfluss von Ethanol auf die Mikronemensekretion, wie er bei *T. gondii* beschrieben wurde (Carruthers et. al., 1999), für *E. bovis* nicht gezeigt werden. Carruthers et. al. (1999) zeigten, dass die Sekretion von TgMIC2 durch unterschiedliche Alkohole sowie Acetaldehyd ausgelöst werden kann. Als Mechanismus vermuten Carruthers et. al. (1999), dass Ethanol und ähnliche

Substanzen zu einer deutlichen Erhöhung des intrazellulären $[Ca^{2+}]$ -Spiegels führt, evtl. über die Beeinflussung des Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C abhängigen Signalweges, wie schon in Säugerzellen gezeigt (Rubin and Hoek, 1990; Higashi et. al., 1994; Higashi et. al., 1996).

Wie bei *E. bovis* konnte auch bei *E. tenella* keine Sekretion von Mikronemenproteinen durch Ethanol induziert werden (Wiersma et. al., 2004).

Die Induktion der Sekretion von Mikronemenproteinen durch Ionomycin, wie bei *T. gondii* beschrieben (Carruthers and Sibley, 1999), konnte für EbMIC4 nicht gezeigt werden. Auch Untersuchungen bei *E. tenella*-Sporozoiten zeigten, dass die Sekretion von EtMIC1 und EtMIC2 durch die Behandlung mit Ca^{2+} -Ionophoren nicht induziert werden konnte (Wiersma et. al., 2004). Damit nehmen die *Eimeria* spp. eine Sonderstellung bei der Induktion der Sekretion der Mikronemenproteine ein. Weiterhin war bei *E. bovis* keine postexozytotische Wanderung von EbMIC4 hin zum distalen Pol zu beobachten.

Hypothetische Funktionsweise von EbMIC4

Die „gliding motility“ über die Zelloberfläche sowie die Wirtszell-Invasion sind zwingend an die Freisetzung der Mikronemenproteine am apikalen Pol des Parasiten und ihre Verteilung zum distalen Pol gekoppelt (Soldati et. al., 2001). Diese Form der Fortbewegung setzt hochkomplexe Interaktionen von zellulären Molekülen mit dem parasitären Aktomyosinmotor voraus. Umfangreiche Untersuchungen zu *T. gondii* und *Plasmodium* spp. führten zur Erstellung eines Modells, das im Kapitel 1.6 näher erläutert wurde. Neben dem Aktomyosinmotor sind demnach vor allem die Mikronemenproteine am Aufbau des Glideosoms beteiligt. Aufgrund der Tatsache, dass viele Mikronemenproteine bei unterschiedlichen Apikomplexa-Arten gleichermaßen zu finden sind (siehe auch Tabelle 1.1), kann die Hypothese aufgestellt werden, dass das Glideosom bei allen Apikomplexa einen ähnlichen Aufbau besitzt. Datenbankabgleiche identifizierten bisher keine homologen Mikronemenproteine zu EbMIC4 außerhalb der Eimerien, publizierte Daten zeigen aber, dass TgMIC12 von *T. gondii* (unvollständige Sequenz in der NCBI-Datenbank) ein homologes Sequenzen zu EtMIC4 und EmTSP250 besitzt (Opitz and Soldati, 2002; Dowse and Soldati, 2004; Carruthers and Tomley, 2008). In Carruthers and Tomley (2008) ist zudem ein schematischer Aufbau zu TgMIC12 dargestellt, der dem vom EbMIC4 in großen Teilen ähnelt. Weiterhin zeigten Datenbankvergleiche der EbMIC4-Sequenz mit den komplett sequenzierten Genomen von *P. gallinaceum* oder *P. falciparum* Contig-Sequenzen auf, die übereinstimmende Bereiche zur Ebmic4-Sequenz besitzen. Diese Ergebnisse lassen

Spekulationen zu, dass EbMIC4-Homologe nicht nur bei *Eimeria* spp. und *T. gondii*, sondern auch bei anderen Apikomplexa zu finden sind.

Bei der Betrachtung des komplexen Vorganges der Wirtszellsuche und der anschließenden Invasion, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass unterschiedliche Mikronemenproteine (-komplexe) zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem Aktinomyosinkomplex interagieren und am Aufbau des Glideosom beteiligt sind. Leider erfolgt in der Literatur keine Differenzierung. Während der Suche nach einer geeigneten Wirtszelle bewegen und gleiten die invasiven Stadien über die Zelloberfläche mit Hilfe des Glideosoms. Sie benötigen Ankerproteine, die an Oberflächenstrukturen binden, die von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen präsentiert werden. Zur eigentlichen Invasion benötigt der Parasit Informationen, die nur eine geeignete Wirtszelle besitzt, damit er im nächsten Schritt in diese eindringen kann. Bei *T. gondii* wurde gezeigt, dass Mikronemenkomplexe bestehend aus löslichen Proteinen und Transmembranproteinen (TM-Proteine) das Bindeglied zwischen Aktomyosinkomplex und Wirtszelloberfläche bilden. Diese Komplexe werden im Allgemeinen durch ein ansteigendes $[Ca^{2+}]_i$ -Signal, wie bei *T. gondii* zeigt, nach außen sezerniert. Wenn man davon ausgeht, dass verschiedene Mikronemenkomplexe zeitlich differenziert benötigt werden, müssen weitere Steuerungsmechanismen vorliegen. So könnte spekuliert werden, dass der zytoplasmatische Teil der TM-Proteine eine wichtige Rolle spielt. Hinweis darauf kann vielleicht die Position des Tryptophans, das laut Untersuchungen von Jewett und Sibley (2003) eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, dem Bindeglied zum Aktinomyosinmotor, geben. Dieser Tryptophanrest befindet sich entweder dicht am C-terminalen Ende (2./3. Aminosäure; Bsp. TgMIC2) oder weiter entfernt (5.-22. Position vom C-Terminus; Bsp. TgMIC12, TgAMA-1, EtMIC4 oder EbMIC4). Spekuliert werden kann, dass die Position einen Einfluss auf die mögliche Interaktion mit der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase hat. Eine Besonderheit von EbMIC4, EtMIC4 und EmTSP250 ist die Anwesenheit eines Tyrosinrestes neben dem Tryptophan, das über ein hohes Phosphorylierungspotential verfügt. Vielleicht hat dies auch eine Funktion bei der Steuerung der Interaktion mit der Aldolase, bei der die Phosphorylierung von Tyrosin eine Konformationsänderung induziert. Allerdings sind bisher noch keine Modelle etabliert, um diese Hypothesen zu untermauern. Auch der Vergleich der Behandlungsstudien bei *T. gondii*, *E. tenella* und *E. bovis* geben einen Hinweis darauf, dass EbMIC4 weitere oder andere Einflüsse benötigt, um zum distalen Pol zu wandern.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die unterschiedlichen Mikronemenkomplexe entweder an ubiquitären oder wirtszellspezifischen Oberflächenmolekülen binden und somit zu unterschiedlichen Zeitpunkten als Ankermoleküle zum distalen Pol wandern.

Abschließend kann man sagen, dass über die Funktion von EbMIC4 aufgrund bisheriger Untersuchungen an anderen Apikomplexa nur Hypothesen aufgestellt werden können. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist EbMIC4, wie auch andere TRAP-Proteine, am Aufbau des Glideosoms beteiligt. Die Struktur von EbMIC4 zeigt, dass es über die gleichen wichtigen Sequenzelemente verfügt wie andere TM-Mikronemenproteine. Diese ermöglichen den Transport der Proteine zu den Mikronemen, oder die proteolytische Spaltung nach der Exozytose und Wanderung zum distalen Pol. Allerdings zeigt EbMIC4 auch feine Unterschiede zu anderen charakterisierten Mikronemenproteinen, die vielleicht eine differenzierte Sichtweise über den zeitlichen Ablauf der Invasion erlauben.

4.2 Die Interaktion von *E. bovis* mit seiner Wirtszelle

Im zweiten Teil der Arbeit wurde sich mit der möglichen Manipulation der Wirtszelle durch *E. bovis* beschäftigt. Dazu wurden vergleichende Analysen der Proteinexpression zwischen *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten Wirtszellen am 14. Tag p. i., also am Ende der ersten Merogonie durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt der *in vitro*-Entwicklung waren die Merozoiten in den Meronten teils schon ausgereift und nahe der Freisetzung.

Um überhaupt einen Einfluss auf die Wirtszelle ausüben zu können, muss der Parasit Mechanismen entwickelt haben, die die Vorgänge in den Wirtszellen beeinflussen, dazu gehören auch Transportsysteme oder Poren durch die Membran der parasitophoren Vakuole, mit der der Parasit vom Wirt getrennt ist. Erste Untersuchungen von Behrendt et. al. (2000) an *E. bovis*-infizierten Wirtszellen weisen darauf hin, dass es keine nichtselektiven Poren in der Membran der PV gibt. Andere Untersuchungen an *T. gondii* zeigten, dass der Parasit durch kleine Poren in der Membran der PV kleine lösliche Metaboliten (13-19 kDa) wie Glucose, Aminosäuren, Nukleotide oder Eisen mittels Diffusion aufnehmen kann (Laliberte and Carruthers, 2008). Größere oder unlösliche Metaboliten werden aktiv mittels Trägerproteinen über die Membran der PV transportiert. Diese Trägerproteine stammen bei *T. gondii* aus den Rhoptrien und den Dichte Granula und sind nicht nur in vielen Prozessen der Nährstoffrekrutierung involviert, sondern interagieren auch mit Mitochondrien und dem ER oder strukturieren das Zytoskelett des Wirtes neu (Martin et. al., 2007; Laliberte and Carruthers, 2008). Neben der Positionierung der Rhoptrienproteine an der PVM, ist ein weiterer Manipulationsort der Wirtszellkern. Auch bei *Theileria parva* und *Theileria annulata*, die Erreger des Ostküstenfiebers und der tropischen Theileriose beim Rind, wurde nachgewiesen, dass die befallenden bovinen Immunzellen eine dramatische Veränderung in der Signaltransduktion erfahren, wenn sie vom Parasiten befallen sind (zusammengefasst in Dobbelaere and Heussler, 1999). Es kommt beispielsweise zu einer konstitutiven Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren wie NF κ B oder Proteinkinasen wie Phosphoinositid-3-Kinase oder Casein-Kinase sowie einer erhöhten Sekretion von Zytokinen (zusammengefasst in Dobbelaere and Kuenzi, 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Parasit über aktive oder passive Transportmechanismen durch die Membran der PV verfügen muss, damit er mit der Wirtszelle in Kontakt treten kann.

Bei *Eimeria* spp. wurden bisher wenige Untersuchungen in dieser Art durchgeführt. Untersuchungen bei *E. bovis* zeigten, dass sie die Immunmodulation (Hermosilla et. al., 2006; Taubert et. al., 2006a; Taubert et. al., 2006c; Taubert et. al., 2007), Apoptosefähigkeit (Lang, 2008) und Zytoskelettumbildungen (Hermosilla et. al., 2005) der Wirtszelle beeinflussen. Auch Untersuchungen an *E. tenella* und *E. necatrix* zeigten, dass sie die Wirtszelle

manipulieren und die Apoptose inhibieren (del Cacho et. al., 2004). Diese Arbeit sollte weitere Anhaltspunkte für den Einfluss von *E. bovis* auf seine Wirtszelle aufzeigen. Ähnliche Untersuchungen, bei der die Gesamtproteome von nicht-infizierten und infizierten Wirtszellen verglichen wurden, wurden bisher bei *T. gondii* durchgeführt (Nelson et. al., 2008). Die Daten unserer Studie sind nicht abschließend und müssen durch andere Versuche auf Transkriptions- und Proteinexpressionsebene bestätigt werden.

Um eine Bewertung der Proteomanalysen erreichen zu können, bedürfte es einer Reihe von Vorüberlegungen. Aufgrund der mengenbezogenen Zuordnung der Proteinproben und dem unbekannten prozentualen Anteil der parasitären Proteine mussten die 2D-Gelbilder normiert werden. Die von Nelson et. al. (2008) verwendete Normierung, die Zugabe der gleichen Menge an Parasitenprotein zu der nicht-infizierten Probe bei der Proteingewinnung, konnte bei uns nicht angewandt werden, da eine massive Vermehrung von *E. bovis* während der ersten Merogonie stattfand. Alternativ wurde ein Wirtszell-eigenes Referenzprotein gesucht. Dies war schwierig, weil nicht bekannt war, welche Proteine keiner Modulation durch den Parasiten unterliegen. Hinzu kam, dass das Kontingent an nutzbaren Antikörpern im bovinen System begrenzt ist und somit erst Untersuchungen zur Kreuzreaktivität anderer Antikörper notwendig gewesen wäre. Frühere konfokalmikroskopische Untersuchungen am Zytoskelett *E. bovis*-infizierter Wirtszellen hatte allerdings gezeigt, dass Vimentin im Gegensatz zu anderen Zytoskelettelementen wie Aktin, α -Tubulin und azetyliertes Tubulin, nur in geringem Maße beeinflusst wird (Hermosilla et. al., 2008a). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt, die bestätigten, dass die Vimentinexpression der Wirtszelle durch *E. bovis* nicht signifikant beeinflusst wird. So wurde Vimentin, ein Intermediärfilament, als Referenzprotein verwendet. Der verwendete monoklonale Antikörper reagierte im Immunoblot eindimensional aufgetrennter Gesamtproteine mit einer dem Vimentin zugeordneten Hauptbande von ca. 60 kDa (SDS-PAGE). In der zweidimensional aufgetrennten Proteinprobe wurde eine Vielzahl von Proteinspots markiert. Letzteres dürfte mit den möglichen, vielfachen Modifikationen des Vimentins zusammenhängen, evtl. auch Degradierungsprodukte der Moleküle anzeigen. Für die Normierung wurde der dominanteste Vimentinspot mit dem experimentell ermittelten MW von 60 kDa und einem pI von 4,9 für die Normierung verwendet.

Die Auswertung der 2D-Gelelektrophorese zeigte, dass im Verhältnis zu Vimentin die Proteinexpression in infizierten Zellen teils hoch-, aber in der Mehrzahl der Fälle nach unten reguliert wird. Im weiteren Verlauf der Analyse mittels MALDI-TOF wurden 38 hochregulierte Wirts- und 29 Parasitenproteine sowie 130 runterregulierte Wirtszellproteine identifiziert. Letztere lagen in mehreren Isoformen vor oder wurden in gemischten Spots nachgewiesen.

Erklärt werden könnte die häufigere Regulation nach unten damit, dass zum Untersuchungszeitpunkt die Proliferation der Parasiten weitgehend abgeschlossen war und nun durch eine Parasiten-induzierte Verringerung der Proteinexpression des Wirtes Ressourcen gespart werden sollen. Möglich ist auch, dass die Knappheit an Nährstoffen zu diesem Zeitpunkt aufgrund der massiven Vermehrung des Parasiten die Wirtszelle zwingt ihre Proteinexpression zu minimieren; zudem wird in der infizierten Zelle auch der Platz für die eigenen Zellkompartimente immer geringer.

Passend zur letzten Vermutung und auffallend war, dass in den *E. bovis*-infizierten Wirtszellen Kernproteine und Proteine sind, die an der Transkription und Translation beteiligt, nach unten reguliert wurden. Neben Proteinen, die am Aufbau von Histonen und Ribosomen beteiligt sind (Histonproteine H2B Typ1/Typ1-D, „high mobility group“ Proteine, 40S ribosomales Protein S17), kristallisierte sich bei der Analyse eine weitere Proteingruppe heraus: die Gruppe der heterogenen Ribonukleoproteinpartikel (hnRNP). Im komplizierten Prozess der Genexpression durchläuft das synthetisierte Primärtranskript eine Reihe von Prozessierungsschritten, bevor ein funktionelles mRNA-Molekül entsteht, das dann zur Translation ins Zytosol transportiert wird (Lodish et. al., 1996). Während dieses Vorganges wird die prä-mRNA an nukleare Proteine, den hnRNPs gebunden (Lodish et. al., 1996). Diese Bindung ist durch eine hohe Affinität aber unterschiedliche Spezifität gekennzeichnet (Dreyfuss et. al., 1993). Neben den unterschiedlichen Bindungsstellen variieren die hnRNP-Proteine auch bezüglich ihrer Position in der Zelle. Einige verbleiben stationär im Zellkern, andere wandern, an der prozessierten mRNA gebunden, ins Zytosol, wo sie dann durch andere RNA-bindende Proteine ersetzt werden und kehren danach in den Kern zurück (Pinol-Roma and Dreyfuss, 1993). Die volle Bandbreite der Funktionen und ihr Wirkmechanismus sind bisher noch nicht erforscht. Generell beeinflussen sie durch die Bindung an die hnRNA deren Struktur und verhindern die Bildung von intramolekularen Sekundärstrukturen (Dreyfuss et. al., 1993). Sie erleichtern oder verhindern die Interaktion der hnRNA mit anderen Proteinen, die an den Prozessierungsprozessen notwendig sind und beeinflussen so das Schicksal der hnRNA. Auch an der Interaktion der hnRNA mit anderen nukleären Strukturen sowie am Transport der mRNA ins Zytosol sind die hnRNP-Proteine beteiligt (Dreyfuss et. al., 1993). Sind diese Proteine in einer geringeren Anzahl in der Zelle zu finden, kann man spekulieren, dass die Genexpression nach unten reguliert und weniger mRNA hergestellt wurde. Diese Hypothese wird durch weitere Befunde untermauert, nach denen weitere Proteine in einer geringeren Konzentration vorlagen. Darunter fiel das Protein LOC513868, ein Homolog zum Protein PRP19/PSO4 (nukleäres Matrixprotein 200 von *S. cerevisiae*), das auch in verschiedenen Säugern identifiziert wurde (Lu and Legerski, 2007). In den ersten Untersuchungen an *S. cerevisiae* hatte sich gezeigt, dass das Protein an den

Spleißing-Prozessen der prä-mRNA beteiligt ist (Cheng et. al., 1993), wobei es dabei mit dem Spleißosom assoziiert ist (Tarn et. al., 1993a; Tarn et. al., 1993b). Spätere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass das Protein in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert ist (Grey et. al., 1996; Zhang et. al., 2005). Auch das Protein Matrin-3, das an der Transkription beteiligt und mit anderen Matrixproteinen ein fibrogranuläres Netzwerk im Kern bildet (Valencia et. al., 2007), war in verminderter Menge vorhanden und für das gezeigt wurde, dass es mit dem ebenfalls nach unten regulierten hnRNP-Protein K interagiert (Rual et. al., 2005).

Auch Proteine, die an der Translation beteiligt sind, wie Elongationsfaktoren oder Teile der Ribosomen, waren in der Menge beeinträchtigt. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die Transkription und Translation herunterreguliert wurden, was wie ausgeführt mit dem Zeitpunkt der Messung im Zusammenhang stehen kann, da der Parasit die Merogonie I weitgehend vollendet hat.

Die Strukturproteine sind eine weitere große Gruppe, die einer Modulation in Folge der Infektion mit *E. bovis* unterliegt. Konfokalmikroskopischen Untersuchungen von Hermosilla et. al. (2008a) zeigten, dass es während der Merontenbildung zu einer Umorientierung von Zytoskelettelementen kommt. Im Verlauf der ersten Merogonie kommt es zu einer signifikanten Akkumulation von Aktinfilamenten und einer Reorganisation von Mikrotubuli in der Nähe der parasitophoren Vakuole. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Hermosilla et. al. (2008a), die mit anderen Methoden durchgeführt wurden, war in dieser Studie β -Aktin minimal nach unten reguliert. Auch viele Proteine, die mit Aktin interagieren wie α -Actinin-4, Gelsolin, Tropomodulin-3 oder Transgelin wurden mehr oder weniger stark nach unten reguliert. Alle diese Proteine sind an der Elongation oder Depolymerization der Aktinfilamente beteiligt. Spekuliert werden kann, dass diese Proteine am 14. Tag p. i. nicht mehr benötigt werden, da die Reorganisation der Aktinfilamente, wie von Hermosilla et. al. (2008a) beschrieben, schon abgeschlossen ist. Dabei muss auch beachtet werden, dass die Untersuchungen in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt wurden. Hermosilla et. al. (2008a) nutzten unter anderem die BSLEC (bovine spleen lymphatic endothelial cells), in denen sich der Parasit langsamer entwickelt als in BFGC.

In der vorliegenden Studie wurde keine Veränderung der Konzentration an α -Tubulin beobachtet. Dieses Ergebnis korreliert nicht mit den Ergebnissen von Hermosilla et. al. (2008a), die herausfanden, dass die Menge an α -Tubulin in den BSLEC ab dem 15. Tag p. i. signifikant erhöht war.

Weitere Zytoskelettelemente wie nichtmuskuläres Myosin oder Moesin waren nach unten reguliert, wie dies auch in *T. gondii*-infizierten Wirtszellen der Fall ist (Nelson et. al., 2008).

Ein sehr dominantes Protein bei der Auswertung der runterregulierten Proteine war das Protein Lamin A/C (gi-Nummer: 77404182), ein Intermediärfilamentprotein des Kerns. Als eine Hauptkomponente der Kernmembran stützt es als anliegende Faserschicht aus einem Netzwerk von Laminfilamenten die innere Lipiddoppelschicht der Kernmembran. Die Funktion der Lamine wird durch einen unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad gesteuert und steht mit der Auflösung der Kernhülle während der Mitose in einem direkten Zusammenhang (zusammengefasst in Gruenbaum et. a., 2000). Ausgelöst durch die Phosphorylierung, kommt es zu einer Depolymerisation der Lamine, womit sich die stützende Kernfaserschicht auflöst und die Kerndoppelmembran in kleine Vesikel zerfällt, wie es während der Mitose der Fall ist (Ottaviano and Gerace, 1985). Bei der Untersuchung der nach unten regulierten Proteine wurde in mehreren Spots (12) das Protein Lamin A/C nachgewiesen. Die tatsächlichen MW lagen bei 65-81 kDa und damit deutlich höher als der theoretisch ermittelte MW von 65 kDa, was mit der vorhergesagten Phosphorylierung einiger Isoformen korreliert. Vor allem die phosphorylierten Formen des Lamins A/C waren nach unten reguliert, ein möglicher Hinweis auf eine geringere Mitoseaktivität der Zellen in einem der *E. bovis*-infizierten Zellrasen. Die Beobachtungen hinsichtlich der Lamine und die Kernproteine stehen möglicherweise in einem direkten Zusammenhang mit den morphologischen Veränderungen am Kern der Wirtszelle während der Entwicklung von *E. bovis*. Lichtmikroskopische Beobachtungen der *in vitro*-Kultur von BUVEC (Abb. 4.3) zeigen eine morphologische Veränderung des Kerns ab dem 10. Tag p. i., die mit dem Sichtbarwerden der ersten Meronten einhergeht (Abb. 4.3-C). Die Kerne von nicht-infizierten Zellen in einer konfluenten Zellschicht zeichnen sich durch einen runden bis ovalen Kern aus, in dem mehrere kleine, dunkle Strukturen höchstwahrscheinlich die Nukleoli in dem dunkleren Karyoplasma (Heterochromatin) identifiziert werden konnten (Abb. 4.3-B, roter Kreis). Zellen, die teilungsaktiv sind, besitzen weniger, dabei aber größere Nukleoli in einem helleren Karyoplasma (Euchromatin, Abb. 4.3-A, schwarzer Kreis). Kerne von infizierten Zellen besitzen in der Regel ein oder zwei sehr große Nukleoli und das Karyoplasma ist sehr hell (Abb. 4.3-C/D, gelber Pfeil). Beschrieben wird, dass das Aussehen eines Nukleolus vom Zelltyp und vom Funktionszustand der Zelle abhängt (Hees and Sinowatz, 2000). So besitzen nicht mehr teilungsaktive Zellen, wie Nervenzellen, einen sehr großen Nukleolus (Jastrow, 2008) wie er auch bei *E. bovis*-infizierten Zellen zu finden ist (Abb. 4.3-C/D, gelber Pfeil).

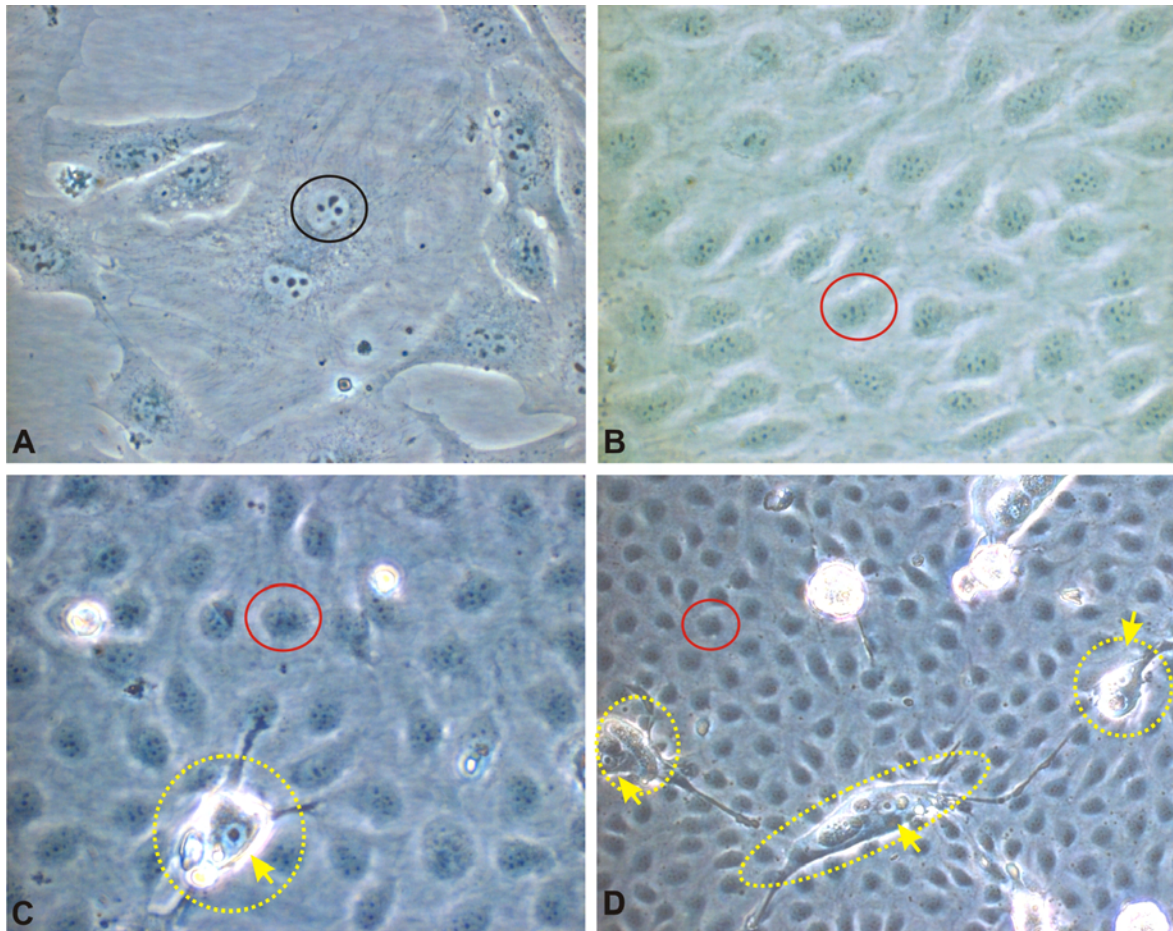


Abb. 4.3: Morphologie des Wirtszellkerns während der *in vitro*-Kultivierung von *E. bovis* (Phasenkontrast).

A – nicht-infizierte, sich teilende Zellen, **B** - nicht-infizierte, konfluente Zellen, **C** – *E. bovis*-infizierte Zellen, 10. Tag p. i., **D** – *E. bovis*-infizierte Zellen, 17. Tag p. i.

Schwarzer Kreis in **A**: Zellkern einer teilungsaktiven, nicht-infizierten Zelle; roter Kreis in **B-D**: Zellkern einer nicht-infizierten Zelle im konfluenten Zellrasen; gelber, gepunkteter Kreis in **C** und **D**: Meront mit dem typischen Kern in infizierten Zellen (gelber Pfeil)

Elektronenmikroskopische Aufnahmen, wie sich auch schon in früheren Arbeiten gezeigt wurden (Hammond et. al., 1966), offenbaren die Unterschiede zwischen den Zellkernen von infizierten und nicht-infizierten Wirtszellen noch genauer (Abb. 4.4). Erkennbar ist der enorm vergrößerte Zellkerns der infizierten Zelle (Abb. 4.4, roter Pfeil) mit einem kugeligen, elektronendichten, basophilen Nukleolus (Heterochromatin), der in einer Ansammlung von Euchromatin liegt. Aufgrund des vermeintlich höheren Anteils an Euchromatin könnte man auf eine hohe Transkriptionsaktivität schließen, was aber den Ergebnissen aus dieser Studie zu den Kernproteinen widerspricht. Erklärt werden kann dies damit, dass die Transkription während der Entwicklung der Merozoiten I deutlich erhöht war, dass aber zum Ende der Merogonie I die Transkription vermindert wurde. Vielleicht ist die Menge an Euchromatin

aber auch gar nicht erhöht, sondern es erscheint nur so, weil der Kern größer ist. Im Gegensatz dazu der Kern einer nicht-infizierten Zelle, der wesentlich kleiner und elektronendichter ist, was auf einen höheren Anteil von Heterochromatin schließen lässt (Abb. 4.4, schwarzer Pfeil). Das Heterochromatin ist dichter gepackt und liegt in einer an Histonen und Nichthistonproteinen gebundenen Form vor (Hees and Sinowatz, 2000).

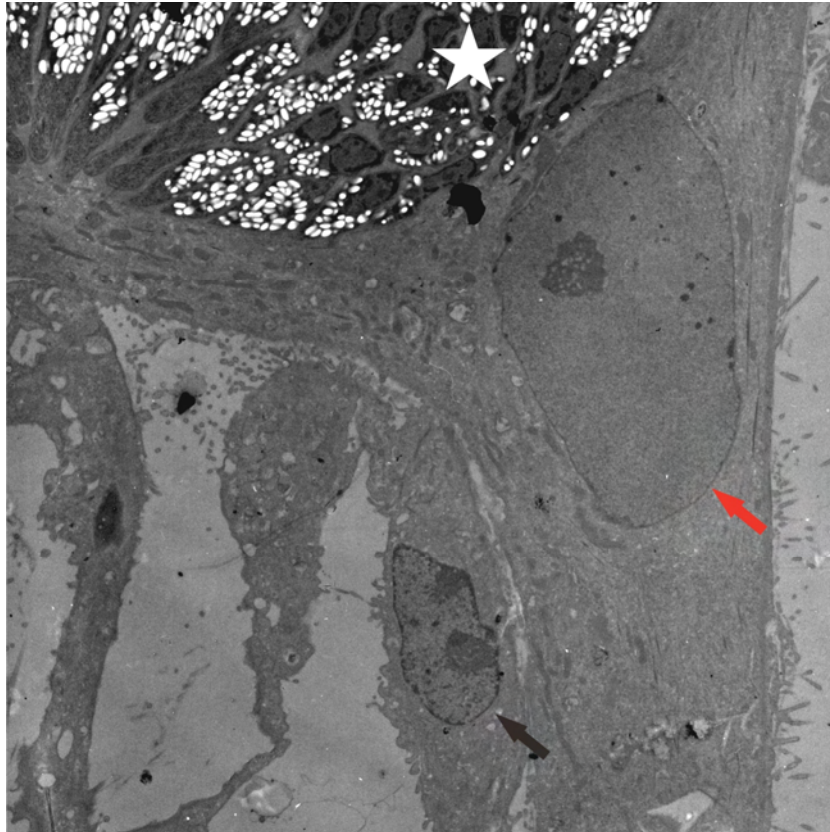


Abb. 4.4: *E. bovis*-infizierten BUVEC 21.Tag p. i. (TEM-Aufnahme).

Erkennbar sind der Makromeront mit den fast ausgereiften Merozoiten (Stern) und der enorm vergrößerten Zellkern der infizierten Wirtszelle (roter Pfeil). Daneben der wesentlich kleinere Kern einer nicht-infizierten Zelle (schwarzer Pfeil) (mit freundlicher Genehmigung von J. H. Behrendt und M. König, Gießen).

Um die vorangegangenen Ergebnisse zu überprüfen, müssten weitere TEM- und Proteom-Studien zu anderen Entwicklungszeitpunkten durchgeführt und verglichen werden, um die Morphologie des Kernes und den Proteinstatus der Wirtszelle genauer verfolgen zu können. Dann könnten auch genauere Aussagen über den Transkriptionsstatus der Wirtszelle getroffen werden.

Die Auswertung der Proteine, die am Stoffwechsel der Wirtszelle beteiligt waren, ergab, dass zum untersuchten Zeitpunkt auch aus dieser Gruppe wesentlich mehr Proteine nach unten als hochreguliert waren. Vor allem Proteine, die an der Glykolyse, dem Citratzyklus oder dem Kohlenstoffmetabolismus beteiligt sind, wurden herunterreguliert. Dies steht im Gegensatz zu den Daten aus der Untersuchung von Nelson et. al. (2008) an *T. gondii*, die die Modulation der Wirtszelle durch Tachyzoiten untersucht haben. *T. gondii*-Tachyzoiten entsprechen der Entwicklung nach den *E. bovis*-Merozoiten I und benötigen für ihre Vermehrung *in vivo* 48-36 h (Taubert et. al., 2006c; Behrendt et. al., 2008). Die Probennahme fand in der Studie von Nelson et. al. (2008) nach 24 h statt, also noch in der Proliferationsphase des Parasiten. Dies könnte die Unterschiede zwischen den eigenen Befunden und denen von Nelson et. al. (2008) erklären.

Eine weitere auffälliger Proteingruppe betraf Moleküle, die im Zusammenhang mit der Apoptose stehen. Die Regulation der apoptotischen Fähigkeiten einer Wirtszelle durch den intrazellulär lebenden Parasiten ist von enormer Bedeutung. Würde die infizierte Wirtszelle aufgrund einer Stresssituation absterben, wäre die Entwicklung des Parasiten natürlich ebenfalls unterbrochen. Allgemein sind drei klassische Wege der Apoptose bekannt (Heussler et. al., 2001): (1) der Granzym B/Perforin-Weg, (2) der TNF-Rezeptor-vermittelte Weg sowie (3) der intrazelluläre, mitochondriale Apoptoseweg. Im Vergleich der Gesamtproteine von *E. bovis*-infizierten und nicht-infizierten Wirtszellen fiel eine stark reduzierte Proteinmenge von Kaspase 8 in infizierten Wirtszellpopulationen auf. Durch die Verringerung des Proteins Kaspase 8 wird der TNF/Fas-Rezeptor-vermittelter Weg der Apoptose beeinträchtigt und könnte somit von der Wirtszelle nicht mehr genutzt werden. Auch in *T. gondii*-infizierten Zellen verringert sich die Menge an aktiver Kaspase 8, wodurch der apoptotische TNFR/Fas-Rezeptorweg gestört wird (Vutova et. al., 2007). Das *E. bovis* nicht nur direkt in den Signaltransduktionsweg eines Apoptoseweges eingreifen kann, sondern auch die Expression von Apoptosehemmern erhöhen kann, belegen weitere Untersuchungen bei *E. bovis* (Lang, 2008). Dabei wurden die Apoptosehemmer c-IAP1 und c-FLIP in *E. bovis*-infizierten Wirtszellen signifikant stärker exprimiert als in nicht-infizierten Wirtszellen. Das heißt, dass *E. bovis*-Sporozoiten aktiv in den rezeptorvermittelten Apoptoseweg (c-FLIP) eingreifen sowie die Kaspase 9 und die Effektor-kaspase 3 (c-IAP1) blockieren können. Auch *T. gondii* kann die Expression anti-apoptotischer Moleküle wie Bcl2, die zu einer Degradierung von pro-apoptotischen Faktoren wie Bax und Bad führen (Molestina et. al., 2003; Laliberte and Carruthers, 2008), induzieren.

Ein weiteres Protein, das vielfältige Funktionen besitzt und in *E. bovis*-infizierten Wirtszellen runterreguliert wurde, ist das spannungsabhängige Anionenkanal-Protein-3 (VDAC-3). Als

Teil einer Pore durch die äußere Mitochondrienmembran, durch die Adenin-Nukleotid-transportiert werden (Sampson et. al., 1996). In Stresssituationen, kann die permeablen Pore an der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien beteiligt sein, was den mitochondrialen Weg der Apoptose einleitet (Crompton, 1999). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass *E. bovis* wie *T. gondii* (Keller et. al., 2006) auch den dritten Apoptoseweg beeinflusst.

Im Zusammenhang mit der Apoptose müssen auch die Hitzeschockproteine genannt werden, da sie in die Abläufe der Apoptose hemmend oder aktivierend eingreifen können. So werden Mitglieder der HSP27-, HSP70- und HSP90-Proteinfamilien mit einer antiapoptotische Wirkung im TNF-Rezeptor-vermittelter Weg sowie intrazellulären, mitochondrialen Apoptoseweg in Zusammenhang gebracht (Beere, 2005). Bei HSP70 wurde gezeigt, dass es sowohl die Freisetzung von Cytochrom c als auch die Kaspaseaktivität beeinflussen kann (Beere et. al., 2000). Dabei beruhen die antiapoptotischen Effekte von HSP70 und HSP90 auf eine direkter Interaktion mit dem APAF-1-Protein, das das Apoptosom aufbaut (Pandey et. al., 2000; Saleh et. al., 2000). In der vorliegenden Studie erwies sich die Expression verschiedener HSPs, die den HSP70- und HSP90-Familien zugeordnet werden konnten, teils nach unten, teils nach oben reguliert. Allein aus der veränderten Proteinkonzentration kann allerdings noch keine Aussage über den Einfluss der Moleküle auf die Steuerung der Apoptosefähigkeit der Wirtszelle getroffen werden, da HSPs eine Vielzahl anderer Funktionen in der Zelle übernehmen. So sind sie als Chaperone in der Lage die richtige Faltung der Proteine zu steuern, falsch gefaltete oder denaturierte Proteine abzubauen oder neu zu falten (Pandey et. al., 2000; Saleh et. al., 2000). Aufgrund der generell verringerten Proteinexpression, kann es auch zu einer Verringerung der daran beteiligten Proteine kommen. Davon muss aber den Einfluss der HSPs auf die Apoptose nicht beeinflusst sein.

Die hier erarbeiteten Daten zur Modulation der Proteinexpression der Wirtszelle können als erster Schritt zur Analyse von Steuerungsvorgängen durch *E. bovis* in der Wirtszelle angesehen werden. Um weitere Aussagen über Vorgänge während der Entwicklung treffen zu können, müssten vergleichende Wirtszellproteom-Studien zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der ersten Merogonie durchgeführt werden. Ergänzend wurden in unserer Arbeitsgruppe Mikroarray-Analysen zur Überprüfung der Transkriptionslevel zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der ersten Merogonie durchgeführt. Deren abschließende Auswertungen liegt allerdings noch nicht vor. Vorläufig lässt sich aus den bisherige Daten der Mikroarray-Analysen feststellen, dass bis zum 8. Tag p. i. die Zahl der veränderten Transkripte sehr gering war und zum Tag 8 p. i. hin anstieg. Dabei stieg die Zahl

der hochregulierten Transkripte stärker als die runterregulierten (pers. Mittlg. A. Taubert). Mit der Kombination beider Methoden könnte vielleicht ein differenzierteres Bild über die Abläufe in der Wirtszelle während der ersten Merogonie von *E. bovis* erstellt werden.

Kapitel 5: Zusammenfassung

Eimeria bovis ist ein intrazellulärer Darmparasit und einer der pathogensten Erreger der bovinen Kokzidiose. Die endogene Entwicklung verläuft über zwei Merogonien, wobei die erste zur Bildung von *in vivo* bis zu 300 µm großen Makromeronten im Verlauf von >2 Wochen führt. Als Mitglieder der Apikomplexa besitzen alle invasiven Stadien spezielle Organellen und Strukturen, die in ihrer Gesamtheit als Apikalkomplex bezeichnet werden. Die Mikronemen stellen spezialisierte sekretorische Organellen dieses Komplexes dar, die ihre Proteine bei einer stimulierten Exozytose sezernieren. Die Mikronemenproteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Fortbewegung des Parasiten und der Invasion einer Wirtszelle. Mitglieder dieser Proteinfamilie stellen Verbindungsglieder zwischen der Oberfläche der Wirtszelle und dem Aktinomyosinmotor des Parasiten dar.

Ein Ziel dieser Studie war die Charakterisierung von *E. bovis*-spezifischen Mikronemenproteinen. Mittels verschiedenster Methoden wurde eine genomische DNA-Sequenz („single copy“-Gen) mit ca. 8700 bp identifiziert. Die kodierende Sequenz, verifiziert über RT-PCR, umfasst 5481 bp, aufgeteilt auf acht Exons. Die vorhergesagte Proteinsequenz besteht aus 1827 aa, mit einem berechneten Molekulargewicht von 191,45 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 4,14.

Homologievergleiche sprechen für ein homologes Protein zum Mikronemenprotein 4 von *Eimeria tenella* (EtMIC4). Das identifizierte Protein wurde daher als EbMIC4 bezeichnet. Charakterisiert als Transmembranprotein der TRAP-Proteinfamilie, beinhaltet es im extrazellulären Anteil 31 „epidermal growth factor“-Domänen, die von Bereichen mit Thrombospondin-1-Domänen eingerahmt werden. Daneben zeichnet sich EbMIC4 durch eine hochkonservierte Transmembrandomäne sowie einen kurzen zytoplasmatischen Teil mit konservierten Tyrosin- und Tryptophanresten aus. Außerhalb der Apikomplexa besteht eine hohe Ähnlichkeit zur Proteingruppe der Fibrilline. Vergleichende Analysen mit anderen Mikronemenproteinen zeigten, dass EbMIC4 viele Gemeinsamkeiten mit diesen Proteinen besitzt. Sequenzbereiche, die für den gerichteten Transport zu den Mikronemen bedeutend sind, waren genauso konserviert wie potentielle Phosphorylierungsstellen oder bestimmte Aminosäuren.

EbMIC4 wurde bei beiden invasiven Stadien, Sporozoiten und Merozoiten I, vor allem im apikalen Bereich nachgewiesen. Im Gegensatz zum hier ebenfalls klonierten Ebhsp70, das über die gesamte Entwicklungszeit konstitutiv transkribiert wurde, zeigte sich bei Ebmic4 ein differenzierteres Bild. Anfangs im intrazellulären Sporozoiten noch deutlich nachweisbar, war das Transkript von Ebmic4 ab dem 4./5. Tag p. i. nur noch in geringen Mengen vorhanden. Mit dem ersten Auftreten von immaturren Meronten (ca. 10./12. Tag p. i.) stiegen die

Transkriptmengen wieder an und nahmen mit der massiven Vermehrung und Reifung der Merozoiten I zu. Die Expressionsstudien von EbMIC4 während der ersten Merogonie zeigten ein vergleichbares Bild.

Erste Studien zur induzierten Sekretion der Mikronemenproteine mit bestimmten Substanzen zeigten, dass für die Sekretion von EbMIC4 einige Besonderheiten gelten. So kommt es im Gegensatz zu *T. gondii* zu keiner erhöhten Sekretion von EbMIC4 durch die Behandlung mit Ca^{2+} -Ionophoren und Ethanol. Wurden *E. bovis*-Sporozoiten mit FKS oder Wirtszellen konfrontiert, wurde EbMIC4 verstärkt im apikalen Bereich nachgewiesen, was auf eine erhöhte Sekretion schließen lässt. Nie war, wie bei *E. tenella* und *T. gondii* gezeigt, eine Ausbreitung von EbMIC4 hin zum distalen Pol zu beobachten.

Weiterhin wurden Experimente zur Interaktion des Parasiten mit seiner Wirtszelle durchgeführt. Eine Besonderheit bei *E. bovis* ist *in vivo* die lange Verweildauer während der ersten Merogonie in Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren des Ileums. Um eine so lange Zeit in einer Zelle zu überleben, erscheint es unumgänglich, dass der Parasit Vorgänge der Wirtszelle gezielt beeinflusst. Um erste Anhaltspunkte für eine mögliche Manipulation der Wirtszelle zu erhalten, wurden die Gesamtproteome von *E. bovis*-infizierten Wirtszellen mit denen nicht-infizierter Wirtszellen am 14. Tag p. i. miteinander verglichen. Dazu wurde eine zweidimensionale Auftrennung der zu vergleichenden Proteinproben mit anschließender MALDI-TOF-Fingerprinting-Analyse bezüglich hoch- oder runterregulierter Proteine vorgenommen. Allgemein wurden über *E. bovis* wesentlich mehr Proteine runter- als hochreguliert. Modifiziert wurden vor allem Proteine des Stoffwechsels und der Biosynthese, Strukturproteine, Proteine der Translation und Transkription sowie Proteine der Apoptose. Dabei bestätigten diese Studien frühere Arbeiten, bei denen gezeigt wurde, dass *E. bovis* die Apoptosefähigkeit der Wirtszelle beeinträchtigt.

Kapitel 6: Summary

Eimeria bovis is an intracellular protozoan parasite of cattle and one of the most pathogenic coccidial species. In the course of its endogenous development *Eimeria bovis* undergoes two merogonies. During the first merogony *in vivo* so called macromeronts of size of up to 300 µm are formed within 2-3 weeks containing up to 10⁵ merozoites I each. As a member of the substrain Apicomplexa, all invasive stages have specialised secretory organelles and structures which form the apical complex. Micronemes are specialised secretory organelles of this complex which secrete their proteins in the course of a stimulated exocytosis. Microneme proteins play a decisive role in parasite motility and invasion of the host cell. Recent studies demonstrated that they are the connecting link between the unique form of actin-based motor complex of the parasite and the host cell surface.

One aim of this study was the identification and characterisation of a microneme protein of *Eimeria bovis* (EbMIC4). Employing several different methods we identified a genomic DNA-sequence ("single copy gen") with a length of approximately 8700 bp. The coding sequence, verified by reverse transcriptase-PCR, consisted of 5481 bp distributed within eight exons. The predicted polypeptide sequence consists of 1827 amino acids with a molecular mass of 191 kDa and an isoelectric point of 4.14.

The polypeptide sequence shows a high homology to EtMIC4, a microneme protein of *Eimeria tenella*, and to EmTSP250 a microneme protein of *Eimeria maxima*. Therefore we called the identified protein EbMIC4. Analysis of the amino acid sequence revealed it as a novel member of the TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) family, containing 31 epidermal growth factor-like calcium binding domains and two areas with thrombospondin type-1 repeats in the extracellular domain. EbMIC4 contains a short transmembrane domain and a cytoplasmatic tail, which both are highly conserved within apicomplexan microneme proteins. The protein family of the fibrillines exhibits the highest homology to EbMIC4 beyond the Apicomplexa. EbMIC4 has many similarities to other microneme proteins. Sequence areas which are very important for the directional transport to the micronemes, potentiell phosphorylation sites or several amino acids are conserved.

Applying several different methods we analysed the gene transcription and protein expression patterns of EbMIC4. EbMIC4 was detected in the apical area of the investigated invasive stages sporozoites and merozoites I. Compared with the constitutively transcribed Ebhsp70, a gene encoded for heat shock protein of *Eimeria bovis*, which was also identified in this study, a different picture was observed for Ebmic4. The Ebmic4 transcripts were clearly detectable in intracellular sporozoites but could be found only in scarce amounts 4th or 5th day post infection. With the appearance of immature meronts (10 to 12 days p. i.), the

amounts of Ebmic4-transcripts increased and were highly abundant after the maturation of merozoites I. The expression patterns of EbMIC4 in the course of the merogony were similar to those of the transcripts.

First experiments to trigger artificially secretion of microneme proteins with various chemical showed some differences to other Apicomplexa. In contrast to *Toxoplasma gondii* the secretion of EbMIC4 by sporozoites was not increased after treatment with Ca^{2+} -ionophores or ethanol. Exposure of *Eimeria bovis*-sporozoites to foetal calf serum (FCS) resulted in an increased labeling of the apical end of the parasites, indicating an enhanced secretion of EbMIC4. In contrast to *Eimeria tenella* und *Toxoplasma gondii* microneme proteins EbMIC4 did not spread on the parasite surface to the distal part of the sporozoites.

Further experiments were performed to analyse interactions between the parasite and its host cell on the molecular level. Since *Eimeria bovis* macromeront development in vivo in endothelial cells of the lymph capillaries requires a relatively long period of time of 2-3 weeks, it appears plausible that the parasite manipulates its host cell to guarantee its survival. Thus, we compared the proteomes of *E. bovis*-infected and non infected cells 14 days post infection. Using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry we identified host cell proteins which were either down or upregulated owing to the infection. In principle, we detected more down regulated than up regulated proteins. Modified protein expressions were found in metabolic pathways particularly involved in glycolysis and with respect to structural proteins, proteins participating in transcription, translation and in apoptotic processes. Referring to the latter, this study supports recent data showing that *E. bovis* actively interferes with host cell apoptosis.

Kapitel 7: Anhang

A: Klonsequenzen

Zu 3.1.2.1 Ebmic4 Klon10 (1076 bp, pDrive Vektor)

Identifizierte Sequenz

```

1  GGTTCGTATACCTGCACTTGTGGCAAAGGTTATACGGGGTTTGGCGAGTCATGCCAGGAC
61  GTCGACGAGTGCGTCGGGAACGCTGCAGGTTGCGACATACGTGCAGTATGTACTAACCTG
121 CCCGGCTCTTTCAAGTTGTGCTTGCAAGTCGGGTTTTGAAGGCAACGGCTATGAATGCGTG
181 GAGAAGCCCGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTTGCAGTCGTGGACTGCTTGGTCAAAGTGT
241 GACGGGACCACCACAGAAAAGCAAAAGACATTGTATCGTTCTGTCGACAAAACGGAGACA
301 CGCGAATGCCCAGGGAAGGAGAAGACTGACTGCGGGGAATTTGGAGAATGGTCATCATGC
361 CCGGGCTCGGTCAACAACATGTCTCACCCTCAAAGGGAGAGGTTTGGAGAGGCAGGCTGC
421 GAAAATGCAGAAATTAGTGCAGAGTGCCCGGATGCTGAGATGGAAGAGGAATGTGGGGAT
481 TTCGGCAACTGGAGCGATTGCGGAGTTCCATCGGCGGGCCTGCGGTCAAGGGCGAGGGAT
541 CGCTGCCCTGATCAGGTGGAGTTTGAAGAGTGCTCTACCGAAGGCGGGGTTGCGCAGCTT
601 GGAGGGCCTGGCGTCGAAGGACCTACTGGCTACCAAGGGGACGGCAGGATGTGCGAGAAG
661 ACCGTTGGACCATGTGACTCAAACCCATGCGGGGACAAAGCGGATTGCGAAGTGCTTGGC
721 AACAGCTATACTTGACCTGCCACAAAGGCTATGAGATGGCAGACGGACGATGCGCGGAC
781 ATTGACGAATGCACTGCGGGAACGCACAAGTGCAGCGCATGCAAGTGACACAAACT
841 TCGGGTTCGTATACCTGCACTTGTGGCAAAGGTTATACGGGGTTTGGCGAGTCATGCCAG
901 GACGTCGACGAGTGCGTCGGGAACGCTGCAGGTTGCGACATACATACAGTATGTACTAAC
961 CTGCCCCGGCTCTTTCAGTTGTGCTTGCAAGTCAGTTTTGAAGGCAACGGCTATGAATGC
1021 GTGGAGAAGCCCGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTTGCAGTTCGTGGACTGCTTGGTC

```

Aminosäuresequenz (Forward frame 1)

```

1  GSYTCTCGKGYTGFGESCQDVDECVGNAAGCDIRAVCTNLPGSFSCACKSGFEGNGYECV
61  EKPVPVGQIFCESWTAWSKCDGTTTESKRHCIVLSTKTETRECPGKEKTDCEFGWSSC
121 PGSVNNMSHRQRFGEAGCENAEVRECPDAEMEEECGDFGNWSDCGVPSAGLRSRARD
181 RCPDQVEFEECSTEGGGAQLGGPGVEGPTGYQGDGRMCEKTVGPCDSNPCGDKADCEVLG
241 NSYTCTCHKGYEMADGRCADIDECTAGTHNCDAHAVCTNTSGSYTCTCGKGYTGFGESCQ
301 DVDECVGNAAGCDIHTVCTNLPGSFSCACKSSFEGNGYECVEKPVPVGQIFCESWTAWS

```

Proteindomänenstruktur (SMART)



Zu 3.1.3 partielle cDNA-Sequenzen der Phagenbankklone von Ebmic4

1. Phagenklon: Mic4_S4 II-1-1a-1 (1128 bp)

Identifizierte Nukleotidsequenz

```

1  AAGCTTGGGGTGGATGATTGTCACGAACACGCTGTCTGCAAGAACACTGACGGCAGTTTC
61  ACGTGCGAGTGTGCTGAAGGCTACCAAGGGGACGGCAGGATGTGCGAGAAGACCGTTGGA
121 CCATGTGACTCAAACCCATGCGGGGACAAAGCGGATTGCGAAGTGCTTGCAACAGCTAT
181 ACTTGACCTGCCACAAAGGCTATGAGATGGCAGACGGACGATGCGCGGACATTGACGAA
241 TGCCTGCGGGAACGCACAACGCGACGCGCATGCAGTGTGCACAAACACTTCGGGTTTCG
301 TATACCTGCACTTGTGGCAAAGGTTATACGGGGTTTGGCGAGTCATGCCAGGACGTCGAC
361 GAGTGCCTCGGGAACGCTGCAGTTGCGACATACATGCAGTATGTACTAACCTGCCCCGGC
421 TCTTTCAGTTGTGCTTGCAAGTCGGGTTTTGAAGGCAACGGCTATGAATGCGTGGAGAAG
481 CCGGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTTGCAGTCGTGGACTGCTTGGTCAAGTGTGACGGG
541 ACCACCACAGAAAGCAAAAGACATTGTATCGTTCTGTGACCAAAACGGAGACACGCGAA
601 TGCCAGGGAAGGAGAAGACTGACTGCGGGGAATTTGGAGAATGGTCATCATGCCCGGGC
661 TCGGTCAACAACATGTCTCACCGTCAAAGGGAGAGGTTTGGAGAGGCAGGCTGCGAAAT
721 GCAGAAATTAGTGCAGGAGTCCCAGATGCTGAGATGGAAGAGGAATGTGGGGATTTTCGGC
781 AACTGGAGCGATTGCGGAGTTCATCGGCGGGCCTGCGGTCAAGGGCGAGGGATCGCTGC
841 CCTGATCAGGTGGAGTTTGAGGAGTGCTCTACCGAAGGCGGGGGTGCAGCTTGGAGGG
901 CCTGGCGTCGAAGGACCTACTGGTGAAGTCTGCAAAACCAGGAGCGCCTGGGGTTGGGGT
961 GAGCAAGCAGAAGCACCAGGTGTGGAAGGTGAGGAGCCAGCGGGACCTGAGAAACAGCCT
1021 GAGCACCCCGAAGGACCTGGTGGTGCAGCTGAACTGCCAGAGGCACCGGGGCCACGCCG
1081 GCACCCCGAGGGACCTGGGGTGGAGACTGAGGAGCCGCTTGAATTC

```

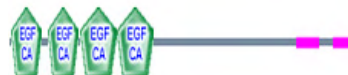
Aminosäuresequenz (Forward frame 1)

```

1  KLGVDDCHEHAVCKNTDGSFTCEAEGYQGDGRMCEKTVGPCDSNPCGDKADCEVLGNSY
61  TCTCHKGYEMADGRCADIDECTAGTHNCDAHAVCTNTSGSYTCTCGKGYTGFGESCQDVD
121 ECVGNAAGCDIHAVCTNLPGSFSCACKSGFEGNGYECVEKPVVPGQIFCESWTAWSKCDG
181 TTTESKRHCIVLSTKTETRECPGKEKTDCEGFEWSSCPGSVNNMSHRQRERFGEAGCEN
241 AELVRECPDAEMEEECGDFGNWSDCGVPSAGLSRARDRCPDQVEFEECSTEGGGAQLGG
301 PGVEGPTGESAKPGAPGVGGEQAEAPGVEGEEPAGPEKQPEHPEPGGAAELPEAPGPTP
361 EHPEPGVETEEPLEF

```

Proteindomänenstruktur (SMART)



2. Phagenklon: Mic4_S4 III-2-1a-1 (1785 bp)

Identifizierte Nukleotidsequenz

```

1  GAATTCAAGCGCAAGGGCGAGGATGGGTGTAAGAACATCGACGAATGCGTTGCTGGCAAT
61  CCATGTGAATCGTTTGGCGCTGGCGGCTATTGCGAGGATACCGAAGGGTCTTTTGTGTTGT
121 GAGTGCAAAACCGGGTTTGTCAAACGCTTCGATGACATGCAGTGATTTGAATGAGTGCCTA
181 GACGCAAAACTGAACAAATGCTCCGGTGTTGGAGGGCTATGTACAAACACAGTGGGGTCG
241 TACACTTGCGGCTGCTCGGAAGGGTACTCTGGAGACGGTTACGAATGTACGGACGTTGAC
301 GAATGCCTGACGGGGAAGCACAACTGCGGTCTCATTCCACTTGCGTGAACACCGACGGC
361 AGCTTTAAGTGCTCGTGCAACGAAGGGTTTTCTGGTGATGGAATCACGTGCGAGGATATT
421 GACGAGTGCGCGGACGACAGCCTCAACACGTGCGACACTCACAAGGGCGTGTGCAAGAAC
481 ACCGCCGGCTCTTACTCTTGCGGGTGCAAGCCCGGCTTTGACCTGTCTTCAGACGGGTTA
541 TGTGCAAAAACGTGACGAGTGTGCCGCCGGTACTGCAAAGTGCGATGAAAAGAGTTTCT
601 GTGTTGACAGCCAGGGATCGTACACGTGCGAGTGCAAATGGGTACAGGCAGTCGGGCGAT
661 GGCTGCGTTGACGTGGACGAATGTGACAGTGGGGTGGTGATTGTACGAACACGCTGCTCT
721 GCAAGAACCTGACGCGCAGTTTACGTGCGAGTGCTGTAAGGCTACCAAGGGGACGGCA
781 GGATGTGCGAGAGAAGACCGTTGGACCATGTGACTCAAACCCATGCGGGGACAAAGCGGATT
841 GCGAAGTGCTTGGCAACAGCTATACTTGACCTGCCACAAAGGCTATGAGATGGCAGACG
901 GACGATGCGCGGACATTGACGAATGCACTGCGGGAACGCACAACGCGACGCGCATGCAG
961 TGTGCACAAACACTTCGGGTTCTGATACCTGCACCTGTGGCAAAGGTTATACGGGGTTTG

```

```

1021 GCGAGTCATGCCAGGACGTCGACGAGTGCCTCGGGAACGCTGCAGGTTGCGACATACATG
1081 CAGTATGTACTAACCTGCCCGGCTCTTTAGTTGTGCTTGCAAGTCGGGTTTTGAAGGCA
1141 ACGGCTATGAATGCGTGGAGAAGCCCGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTTGCAGATCGTGGA
1201 CTGCTTGGTCGAAAGTGTGACGGGACCACCGCAGAAAGCAAAAGGCATTGTATCGTTCTGC
1261 CAATTAAGACGGAGACACACGAATGCCCGGGGAAAGAGAAGACTGACTGCGGGGAATTTG
1321 GAGAATGGTCACCATGCCCGGGCTCCGTCAACAACCTTGTCTCACCGTCAGAGGGAGAGGT
1381 TTGGAGAGGCGAGGCTGCGAAAATGCAGAAATTAGTGCAGGAGTGCCAGATGCCGAGATGG
1441 AGAAGAAATGTGGGGATTTTGGCGACTGGAGCGATTGCGGAATCCCATCGGCGGGCCTGC
1501 GGTCAAGAGCGAGGGAGCGCTGTTTCAGAAAAATTGGAATTTTCAGGTGTGCGCTCCCAGG
1561 GCCAGAGCGCGCAGCCTGGAGGATCTGGCGGTGCGGCGGGGCAACCACAAGGACCCAGTG
1621 CTGAAGGCGGAGAGCCCGGAAACCTTGAATTGAGGGTGAGCAGGAAGAAGGACCTAGGG
1681 CTGCAAGTGGAGAGGTTGCAGGACCCAATGTGGAGGGTGGAGAGGGAACCTGGAGAATCAC
1741 AAACACCTAGCGGCGAAGCTGCGCCGCACTCAGCCCGGATATGCT

```

Aminosäuresequenz (Forward frame 1)

```

1  EFKRKGEDGCKNIDECVAGNPCEISFGAGGYCEDTEGSFVCECKTGfVKLHSTCSDLNECL
61  DAKLNKCSGVGGGLCTNTVGSYTCGCGSEGYSGDGYECTDVDECLTGKHNCGPHSTCVNTDGL
121 SFKCSCNEGFSGDGITCEDIDECADDSLNTCDTHKGVCCKNTAGSYSCGCKPGFDLSSDGL
181 CAKTSTSVPPVLQSAMKRVSVLTARDRTRASANGYRQSGDGCVDVDECDGVDCCHEHAV
241 CKNTDGSFTCECAEGYQGDGRMCEKTVGPCDSNPCGDKADCEVLGNSYTCTCHKGYEMAD
301 GRCADIDECTAGTHNCDHAVCTNTSGSYTCTCGKGYTGFGECSQDVDECVGNAAGCDIH
361 AVCTNLPGSFSCACKSGFEGNGYECVEKPVVPGQIFCESWTAWSKCDGTTAESKRHCIVL
421 PIKTETHECPGKEKTDGCEFGWSPCPGSVNNLSHRQRERFGEAGCENAEVRECPDAEM
481 KKGDFDGDWSDCGIPSAGLRSRARCSEKLEFQVCAPEGQSAQPGSGGAAGQPQGPS
541 AEGGEPGNLIGIEGEQEEGPRAASGEVAGPNVEGGEGTGESQTPSGEAAPH SARIC

```

Proteindomänenstruktur (SMART)



3. Phagenklon: Mic4_S5 II-8-1a-1 (867 bp)

Identifizierte Nukleotidsequenz

```

1  AAGCGTTTGGCGCTGGCGGCTATTGCGAGGATACCGAAGGGTCTTTTGTGTTGTGAGTGCA
61  AAACCGGGTTTGTCAAACCTGCATTTCGACATGCAGTGATTTGAATGAGTGCCTAGACGCAA
121 AACTGAACAAAATGCTCCGGTGTGGAGGGCTATGTACAAACACAGTGGGGTTCGTACACTT
181 GCGGCTGCTCGGAAGGGTACTCTGGAGACGGTTACGAATGTACGGACGTTGACGAATGCC
241 TGACGGGGAAGCACAACCTGCGGTCTCATTCCACTTGCCTGAACACCGACGGCAGCTTTA
301 AGTGCTCGTGCAACGAAGGGTTTTCTGGTGATGGAATCACGTGCGAGGATATTGACGAGT
361 GCGCGGACGACAGCCTCAACACGTGCGACACTCACAAGGGCGTGTGCAAGAACACCGCCG
421 GCTCTTACTCTTTCGGGGTGAAGCCCGGCTTTGACCTGTCTTCAGACGGGTTTCATGTGCA
481 AAAACGTCGACGAGTGTGCCGCCGGTACTGCAAAGTGCGATGAAAAGAGTTTCTGTGTTG
541 ACAGCCAGGGATCGTACACGTGCGAGTGCAAAAATGGGTACAGGCAGTCGGGCGATGGCT
601 GCGTTGACGTGGACGAATGTGACAGTGGGGTGGATGATTGTCACGAACACGCTGTCTGCA
661 AGAACTGACGGCAGTTTACGTGCGAGTGTGCTGAAGGCTACCAAGGGGACGGCAGGA
721 TGTGCGAGAAGACCGTTGGACCATGTGACTCAAACCCATGCGGGGACAAAGCGGATTGCG
781 AAGTGCTTGGCAACAGCTATACTTGACCTGCCACAAAGGCTATGAGATGGCAGACGGAC
841 GATGCGCGGACATTGACGAATGCACTG

```

Aminosäuresequenz (Forward frame 3)

```

1  AFGAGGYCEDTEGSFVCECKTGfVKLHSTCSDLNECLDAKLNKCSGVGGGLCTNTVGSYTC
61  GCSEGYSGDGYECTDVDECLTGKHNCGPHSTCVNTDGSFKCSCNEGFSGDGITCEDIDEC
121 ADDSLNTCDTHKGVCCKNTAGSYSCGCKPGFDLSSDGFMCCKNVDECAAGTAKCDEKSFCVD
181 SQGSYTCCKNGYRQSGDGCVDVDECDGVDCCHEHAVCKNTDGSFTCECAEGYQGDGRM
241 CEKTVGPCDSNPCGDKADCEVLGNSYTCTCHKGYEMADGRCADIDECT

```

Proteindomänenstruktur (SMART)



4. Zusammengesetzte Sequenz der identifizierten cDNA-Klone

Nukleotidsequenz

```

1   GAATTC AAGCGCAAGGGCGAGGATGGGTGTAAGAACATCGACGAATGCGTTGCTGGCAAT
61  CCATGTGAATCGTTTGGCGCTGGCGGCTATTGCGAGGATACCGAAGGGTCTTTTGTGTTGT
121 GAGTGCAAAACCGGGTTTGTCAAACATGCATTCGACATGCAGTGATTTGAATGAGTGCCTA
181 GACGCAAAACGAACAAATGCTCCGGTGTGGAGGGCTATGTACAAACACAGTGGGGTCG
241 TACACTTGGCGCTGCTCGGAAGGGTACTCTGGAGACGGTTACGAATGTACGGACGTTGAC
301 GAATGCCTGACGGGGAAGCACAACTGCGGTCCTCATTCCACTTGCCTGAACACCGACGGC
361 AGCTTTAAGTGCTCGTGCAACGAAGGGTTTTCTGGTGATGGAATCACGTGCGAGGATATT
421 GACGAGTGCGCGGACGACAGCCTCAACACGTGCGACACTCACAAGGGCGTGTGCAAGAAC
481 ACCGCCGGCTCTTACTCTTGGCGGGTGCAAGCCCAGGCTTTGACCTGTCTTCAGACGGGTTC
541 ATGTGCAAAAACGTCGACGAGTGTGCCGCCGGTACTGCAAAGTGCGATGAAAAGAGTTTC
601 TGTGTTGACAGCCAGGGATCGTACACGTGCGAGTGCAAAAATGGGTACAGGCAGTCGGGC
661 GATGGCTGCGTTGACGTGGACGAATGTGACAGTGGGGTGGATGATTGTCACGAACACGCT
721 GTCTGCAAGAACACTGACGGCAGTTTACGTGCGAGTGTGCTGAAGGCTACCAAGGGGAC
781 GGCAGGATGTGCGAGAAGACCGTTGGACCATGTGACTCAAACCCATGCGGGGACAAAGCG
841 GATTGCGAAGTGCTTGGCAACAGCTATACTTGACCTGCCACAAAGGCTATGAGATGGCA
901 GACGGACGATGCGCGGACATTGACGAATGCACCTGCGGGAACGCACAACACTGCGACGCGCAT
961 GCAGTGTGCACAAACACTTCGGGTTCGTATACCTGCACTTGTGGCAAAGGTTATACGGGG
1021 TTTGGCGAGTCATGCCAGGACGTCGACGAGTGCGTCGGGAACGCTGCAGGTTGCGACATA
1081 CATGCAGTATGTACTAACCTGCCCGGCTCTTTCAGTTGTGCTTGCAAGTCGGGTTTTGAA
1141 GGCAACGGCTATGAATGCGTGGAGAAGCCCGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTTTCGAGTCG
1201 TGGACTGCTTGGTCTGAAGTGTGACGGGACCACACAGAAAGCAAAGACATTGTATCGTT
1261 CTGTGACCAAAACGGAGACACGCGAATGCCAGGGAAGGAGAAGACTGACTGCGGGGAA
1321 TTTGGAGAATGGTCATCATGCCCGGGCTCGGTCAACAACATGTCTCACCGTCAAAGGGAG
1381 AGGTTTGGAGAGGCAGGCTGCGAAAATGCAGAATTAGTGC GCGAGTGCCAGATGCTGAG
1441 ATGGAAGAGGAATGTGGGGATTTTCGGCAACTGGAGCGATTGCGGAGTTCCATCGGCGGGC
1501 CTGCGGTCAAGGGCGAGGGATCGCTGCCCTGATCAGGTGGAGTTTGAGGAGTGCTCTACC
1561 GAAGGCGGGGGTGCGCAGCTTGGAGGGCCTGGCGTCTGAAGGACCTACTGGTGAGTCTGCA
1621 AAACCAGGAGCGCCTGGGGTTGGGGGTGAGCAAGCAGAAGCACCAGGTGTGGAAGGTGAG
1681 GAGCCAGCGGGACCTGAGAAACAGCCTGAGCACCCCGAAGGACCTGGTGGTGCAGCTGAA
1741 CTGCCAGAGGCACCGGGGCCACGCCGAGCACCCGAGGGACCTGGGGTGGAGACTGAG
1801 GAGCCGCTTGAATTC

```

Aminosäuresequenz (Forward frame 1)

```

1   EFKRKGEDGCKNIDECVAGNPCESFGAGGYCEDTEGSFVCECKTG FVKLHSTCSDLNECL
61  DAKLNKCSGVGGLCTNTVGSYTCGCSEGYSGDGYECTDVDECLTGKHNCGPHSTCVNTDG
121 SFKCSCNEGFSGDGITCEDIDECADDSLNTCDTHKGVCNKNTAGSYSCGCKPGFDLSSDGF
181 MCKNVDECAAGTAKCDEKSFCVDSQGSYTCECKNGYRQSGDGCVDVDECDSGVDDCHEHA
241 VCKNTDGSFTCECAEGYQGDGRMCEKTVGPCDSNPCGDKADCEVLGNSYTCTCHKGYEMA
301 DGRCADIDECTAGTHNCDAHAVCTNTSGSYTCTCGKGYTGFGESCQDVDECVGNAAGCDI
361 HAVCTNLPGSFSCACKSGFEGNGYECVEKPVVPQIFCESWTAWSKCDGTTTESKRHCIV
421 LSTKTETRECPGKEKTDCEGEGEWSSCPGSVNNMSHRQRERFGEAGCENAELVRECPDAE
481 MEEECGDFGNWSDCGVPSAGLRSRARDRCPDQVEFEECSTEGGGAQLGGPGVEGPTGESA
541 KPGAPGVGGEQAEAPGVEGEPPAGPEKQPEHPEGPGGAAELPEAPGPTPEHPEGPVETE
601 EPLEF

```

Proteindomänenstruktur (SMART)



Zu 3.1.4 partielle gDNA-Sequenzen von Ebmic4

Klon: GW_2Bf#7 (981 bp) im pDrive Vektor

Nukleotidsequenz

```

1  TGGAGTTTGAGGAGTGCTCTACCGAAGGCGGGGGTGCGCAGCTTGGAGGGCCTGGCGTCG
61  AAGGACCTACTGGTGAGTCTGCAAAACCAGGAGCGCCTGGGGTTGGGGGTGAGCAAGCAG
121 AAGCACCAGGTGTGGAAGGTGAGGAGCCAGCGGGACCTGAGAAACAGCCTGAGCACCCCG
181 AAGGACCTGGTGGTGCAGTGAAGTCCAGAGGCACCGGGGCCACGCCGGAGCACCCCG
241 AGGGACCTGGGGTGGAGACTGAGGAGCCGAGGAACCTGGTAGTGAAGGTGCACAGCCTC
301 AAGCACCTGGTGCTGAAGAGGCAGGTACACCTGGTGCTGGGGCTGAGCTACCGAAAGGTC
361 CTGGTGAAAGCCGAAGCCGAGTCGGGTGAGAAGGAGGAGGGCGCTGGGTTTCCTGTGGCGG
421 CGGTTGCTGGTGGCGTGGGTGGTCTCCTTCTCATTGCCGCTATGGGAGGCGGCTATGCTG
481 CGTATTCTCGTGGAGGCGAGGGTGCGACCGATGAAGCGGAACAAGTCATGTTTGAAGGCG
541 GCGAGGTATCCGGAGCTGGAGCTGAGGCGCAGGAAGGGGACACTGTTATTGACATCACTG
601 AAGAGGATGACTATTGGGCAGATAGTGGCGATATTCAGTAAAACTCATTGCATGCCTCAA
661 GGATGTTTTCTCTTGACGGGACGCCGAATTTGGCTGTTTCCAGATTGGACCCTTGCATTG
721 GGCTTGCCCTTGTGGAATACAGCTGTACAAATACTTCTTGGGCATGGAAGGGCGTTGCAA
781 GGCACAATTAAGCACACTGAAATTCAAGGGCAGTTACTTGTCTTGCAGAACCACTAA
841 ACCCTACACCGCTGCACCTTCGCTGCTCGCCGGGGTGGCTGGTGGTGGTCCGGGCACCT
901 GCCGCCCCGAAAGCTCATGGCTCTTTTAAACGAACGCAGCGGGATACCAGCCCGGGCGT
961 CGACCACGCGTGCCCTATAGT

```

Klon: GW_2Br#9/3 (1365 bp) im pDrive Vektor

Nukleotidsequenz

```

1  AAGAAACGCGACTCGGGACCCACACGTGTGGTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCTT
61  GTCGACGAATTCAGATTAAGTCCGTCAGTGTTCTTGCAGACAGCGTGTTCTGTGACAATC
121 ATCCACCCCACTGTCACATTTCGTCCACGTCAACGCAGCCATCGCCCCACTGCCTGTACCC
181 ATTTTTGCACTCGCACGTGTACGATCCCTGGCTGTCAACACAGAACTCTTTTCATCGCA
241 CTTTGCAGTACCGGCGGCACACTCGTCGACGTCTGCGAACCAGTACCCGCAACAAAACA
301 CCATCAAGCCTTATTTTTTGTAGCACAAAAATAACCCCAAGACATGCAATGTTAGAAATG
361 GCTTTAAAAAACTTAGATTTCCCTTTGGAATGTAAGTTTTTTAAAGCCACTTCTCAGCG
421 TCGGACTTTGCGTCTTACTTTTGCACATGAACCCGTCTGAAGACAGGTCAAAGCCGGGCT
481 TGCACCCGCAAGAGTAAGAGCCGGCGGTGTTCTTGCACACGCCCTTGTGAGTGTGCGACG
541 TGTTGAGGCTGTCGTCCGCGCACTCGTCAATATCCTCGCACGTGATTCCATCACCAGAAA
601 ACCCTTCGTTGCACGAGCACTTAAAGCTGCCGTCCGTGTTTACGCAAGTGGAAATGAGGAC
661 CGCAGTTGTGCTTCCCCGTCAGGCATTTCGTCAACGTCCGTACATTTCGTAACCGTCTCCAG
721 AGTACCCTTCCGAGCAGCCGCAAGTGTACGACCCCACTGTGTTTGTACATAGCCCTCAA
781 CACCGGAGCATTGTTTCAAGTTTTCGCTCTAGGCACTCATTCAAATCACTGCATGTGCAAT
841 GCAGTTTGCACAAACCCGGTTTTTGCACATCACAAACAAAAGACCCCTTCGGTATCCTCGCAAT
901 AGCCGCCAGCGCCAAACGATTACATGGATTGCCAGCAACGCATTTCGTGATGTTCTTAC
961 ACCCATCCTCGCCCTTGCCGTTGCCTTCGTATCCGCTTCCACAAGTGCAGATGGCCTCAG
1021 TTCCGGCGTCGCTCTCGTGGCACGTGCGATGAACGCTACACTTCGTCTCCTTGCAGTGGT
1081 CAATCTTCACGCAGTGCCTTCGACGTGGCGATAGCCAGGGGCACAGTGGAAAGTGCAGC
1141 TCCCATCAGTATTCTCGCAAATGCCGTGTGCGGGACCATACAGGTGTTGTTCTCGCACT
1201 CATCGATGTCTCTGCATGAAAGCTCGGTTTCACGTTTCATATCCATCCATGCAAGAGCACA
1261 CGAATGACCCTGGTGTATTTTACAGCGAGTGTTGTGCGCCACACGGCGATTTAGTGGCGC
1321 ACTCGTCGATACCAGCCCGGGCCGTCGACCACGCGTGCCCTATAG

```

Klon: GW_3Br#17/3 (995 bp) im pDrive Vektor

Nukleotidsequenz

```
1   AAAAGAACGCGACTCGGGCCACACGTGTGGTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCTT
61  GTCGACGAATTCAGATTAAGTCCGTCAGTGTCTTGCAGACAGCGTGTTCGTGACAATC
121 ATCCACCCCACTGTCACATTCGTCCACGTCAACGCAGCCATCGCCCGACTGCCTGTACCC
181 ATTTTTCGACTCGCACGTGTACGATCCCTGGCTGTCAACACAGAACTCTTTTCATCGCA
241 CTTTGCAGTACCGGCGGCACACTCGTCGACGTCTGCGAACCAGTCAACGCAACAAAACA
301 CCATCAAGCCTTATTTTTTTGTAGCACAAAAATAACCCCAAGACATGCAATGTTAGAAATG
361 GCTTTAAAAAACTTAGATTTCCCTTTGGAAATGTAAGTTTTTTAAAGCCACTTCTCAGCG
421 TCGGACTTTGCGTCTTACTTTTGCACATGAACCCGTCTGAAGACAGGTCAAAGCCGGGCT
481 TGCACCCGCAAGAGTAAGAGCCGGCGGTGTTCTTGCACACGCCCTTGTGAGTGTGCGACG
541 TGTGAGGCTGTGCTCCGCGCACTCGTCAATATCCTCGCACGTGATTCCATCACCAGAAA
601 ACCCTTCGTTGCACGAGCACTTAAAGCTGCCGTGCGGTGTTACGCAAGTGGAATGAGGAC
661 CGCAGTTGTGCTTCCCGTCAGGCATTCTGTCACGTCCGTACATTCTGTAACCGTCTCCAG
721 AGTACCCTCCGAGCAGCCGCAAGTGTACGACCCCACTGTGTTTGTACATAGCCCTCCAA
781 CACCGGAGCATTGTTCAGTTTTGCGTCTAGGCACTCATTCAAATCACTGCATGTCGAAT
841 GCAGTTTGACAAACCCGGTTTTGCACTCACAAACAAAAGACCCTTCGGTATCCTCGCAAT
901 AGCCGCCAGCGCCAAACGATTACATGGATTGCCAGCAACGCATTCTGTCGATGTTCTTAC
961 ACCAGCCGGGCGGTGACACGCGTGCCCTATAGT
```

Zusammengesetzte Sequenz GW_2/3Br der Einzelklone GW_2Br#9/3 und GW_3Br#17/3 (1288 bp)

Nukleotidsequenz

```
1   AACTGCCGTCAAGTGTCTTGCAGACAGCGTGTTCGTGACAATCATCCACCCCACTGTCAC
61  ATTCGTCCACGTCAACGCAGCCATCGCCCGACTGCCTGTACCCATTTTTGCACTCGCACG
121 TGTACGATCCCTGGCTGTCAACACAGAACTCTTTTCATCGCACTTTGCAGTACCGGCGG
181 CACACTCGTCGACGTCTGCGAACCAGTCAACGCAACAAAACACCATCAAGCCTTATTTT
241 TTGTAGCACAAAAATAACCCCAAGACATGCAATGTTAGAAATGGCTTTAAAAAACTTAGA
301 TTTCCCTTTGGAAATGTAAGTTTTTTAAAGCCACTTCTCAGCGTCGGACTTTGCGTCTTA
361 CTTTTGCACATGAACCCGTCTGAAGACAGGTCAAAGCCGGGCTTGCACCCGCAAGAGTAA
421 GAGCCGGCGGTGTTCTTGCACACGCCCTTGTGAGTGTGCGACGTGTTGAGGCTGTGCTCC
481 GCGCACTCGTCAATATCCTCGCACGTGATTCCATCACCAGAAAACCCTTCGTTGCACGAG
541 CACTTAAAGCTGCCGTGCGTGTTCACGCAAGTGGAATGAGGACCGCAGTTGTGCTTCCCC
601 GTCAGGCATTCTGTCACGTCCGTACATTCTGTAACCGTCTCCAGAGTACCCTTCCGAGCAG
661 CCGCAAGTGTACGACCCCACTGTGTTTGTACATAGCCCTCCAACACCGGAGCATTGTTC
721 AGTTTTGCGTCTAGGCACTCATTCAAATCACTGCATGTCGAATGCAGTTTGACAAACCCG
781 GTTTTGCCTCAGCAACAAAAGACCCTTCGGTATCCTCGCAATAGCCGCCAGCGCCAAAC
841 GATTACATGGATTGCCAGCAACGCATTCTGTCGATGTTCTTACACCCATCCTCGCCCTTG
901 CCGTTGCCTTCGTATCCGCTTCCACAAGTGCAGATGGCCTCAGTTCCGGCGTGCCTCTCG
961 TGGCACGTGCGATGAACGCTACACTTCGTCTCCTTGCAGTGGTCAATCTTACGCAGCTG
1021 CCTTCGACGTGGCGATAGCCAGGGGCACAGTGGAAAGTGCAGCTCCCATCAGTATTCTCG
1081 CAAATGCCGTGTGCGGGCACCATACAGGTGTTGTTCTCGCACTCATCGATGTCTCTGCAT
1141 GAAAGCTCGGTTTTCAGTTCATATCCATCCATGCAAGAGCACACGAATGACCCTGGTGTA
1201 TTTTCACAGCGAGTGTGTCGCCACACGGCGATTTAGTGGCGCACTCGTCGATACAGCC
1261 CGGGCCGTGACACGCGTGCCCTATAG
```

Klon: GW_3Dr#1 (527 bp) im pDrive Vektor**Nukleotidsequenz**

```

1   CGACGGCCATAAATGTGAAGACATCGATTTCTGCGGTGACGGGAGACACGACTGCAACGT
61  CAAAGCCGAGTGCGCTGAGAGCGCTGACAACCTCAACGTTCAAATGCACTTGTGCTCCAGG
121 CTACACTGGCAATGGGCACGGCCCCGAGGGGTGCAAGGACATTGATGAGTGTGCGGGGGG
181 TAATGTATGCGGAGAGAACACAACCTTGCACTAACACTGCTGGAAGCTTTGAGTGTGCGTG
241 CAAAGACGGCTTTGACGGGTCTAAAGAAGGGGACGAGCTGACATGTGTGGATGTTGACGA
301 GTGCGGTGACACTTCTCGAAATACCTGTGCATCCGCAGCGGACGGCGGTTCTTGCGAGAA
361 TACAGTCGGAAGCTATAAGTGTTCGTGCCTTCCAGGCTATGAGGGAGACGGCCATAACTG
421 CACGGATATCGACGAGTGCGCCGCTAAATCGCCGTGTGGCGACAACACTCGCTGTGAAA
481 TACACCAGGGTCATTCGTGTGCTCTTGATGGATGGATATGAACGTG

```

Klon: GW_4Dr#1 (1051 bp, Teilsequenz) im pDrive Vektor**Nukleotidsequenz**

```

1   CGATGTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGTCCTAGACA
61  GCAAGAAAAGCTGCTCTGACGTCAATGAGTGCGCTGACCCCGGTTTGAAGGTTCTGAAA
121 ACTGTCAATGCGCGAACACTGAGGGTAGCTACAAATGGGAACCTAAATTAGGCTATGAGC
181 TGGTGGGCAACTCGGAGTGCCGCAAGATTGACTACTGCTCACTCGGCCCTTGCAACAGTC
241 TTGCAGACTGTAAAGAGAACCCTGAGGGCACCAAAGCGATATGCACGTGCAAAGTGGGCT
301 ATGCTGGAGACGGCTCAGCGGGGAGTGTGTGCGCCGACATCAACGAATGTGAAGGGAACA
361 ATACTTGTGCAGCACCGGGGGACGGCGGTATCTGCGAGAACACAGTGGGATCTTACGTCT
421 GTAAGTGCGCAGCAGGTTATCAGGGAGATGGAAGTGCTTGCAAGTACATCGATGAGTGCG
481 CGACTAATGCACACAACCTGCCATCCTTCGGCCACGTGCACGAACACAGCTGGAAGCTACC
541 GCTGTACTTGCAATAATGGCTTTTCTGGCGACGGCGTTGAGTGTGTGGACATTGACGAGT
601 GCTCCACAAATGCTGACGACTGCGGAAACAACACTGAATGCTCAAACACAATTGGCAGCT
661 TTGAGTGCGTTTGCCGAACCTGGGTATTCAAGACAGGATGCAAAGAAGTGCCTCGATATTG
721 ACGAGTGCTCTGACGGTACCCACACCTGTTCTTCCTTCGCCGCCTGCAGCAACACCGACG
781 GATCTTACAGGTGCCAGTGTAAGCTGGTTACGAAGGCGACGGCCATAAATGTGAAGACA
841 TCGATTTCTGCGGTGACGGGAGACACGACTGCAACGTCAAAGCCGAGTGCGCTGAGAGCG
901 CTGACACTCACGTTCAATGCACTTGTGCTCCAAGCTACACTGCATGACACGCCCGAGGGG
961 TGCAGACATTGATGATGTGCGGGGGTATGTATGCGAAGAACACATTTGCACTACACTTCT
1021 GGAGCTTTGAGTGGTGCGTGCAAGACGGCTTG

```

Zusammengesetzte Sequenz aus 3Dr#1 und 4Dr#1 (1341 bp)**Nukleotidsequenz**

```

1   CGATGTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGTCCTAGACA
61  GCAAGAAAAGCTGCTCTGACGTCAATGAGTGCGCTGACCCCGGTTTGAAGGTTCTGAAA
121 ACTGTCAATGCGCGAACACTGAGGGTAGCTACAAATGGGAACCTAAATTAGGCTATGAGC
181 TGGTGGGCAACTCGGAGTGCCGCAAGATTGACTACTGCTCACTCGGCCCTTGCAACAGTC
241 TTGCAGACTGTAAAGAGAACCCTGAGGGCACCAAAGCGATATGCACGTGCAAAGTGGGCT
301 ATGCTGGAGACGGCTCAGCGGGGAGTGTGTGCGCCGACATCAACGAATGTGAAGGGAACA
361 ATACTTGTGCAGCACCGGGGGACGGCGGTATCTGCGAGAACACAGTGGGATCTTACGTCT
421 GTAAGTGCGCAGCAGGTTATCAGGGAGATGGAAGTGCTTGCAAGTACATCGATGAGTGCG
481 CGACTAATGCACACAACCTGCCATCCTTCGGCCACGTGCACGAACACAGCTGGAAGCTACC
541 GCTGTACTTGCAATAATGGCTTTTCTGGCGACGGCGTTGAGTGTGTGGACATTGACGAGT
601 GCTCCACAAATGCTGACGACTGCGGAAACAACACTGAATGCTCAAACACAATTGGCAGCT
661 TTGAGTGCGTTTGCCGAACCTGGGTATTCAAGACAGGATGCAAAGAAGTGCCTCGATATTG
721 ACGAGTGCTCTGACGGTACCCACACCTGTTCTTCCTTCGCCGCCTGCAGCAACACCGACG
781 GATCTTACAGGTGCCAGTGTAAGCTGGTTACGAAGGCGACGGCCATAAATGTGAAGACA
841 TCGATTTCTGCGGTGACGGGAGACACGACTGCAACGTCAAAGCCGAGTGCGCTGAGAGCG
901 CTGACACTCACGTTCAATGCACTTGTGCTCCAAGCTACACTGGCAATGGGCACGGCCCCG
961 AGGGGTGCAAGGACATTGATGAGTGTGCGGGGGTAAATGTATGCGGAGAGAACACAACCTT
1021 GCATAACACTGCTGGAAGCTTTGAGTGTGCGTGCAAAGACGGCTTTGACGGGTCTAAAG
1081 AAGGGGACGAGCTGACATGTGTGGATGTTGACGAGTGCGGTGACACTTCTCGAAATACCT

```

1141 GTGCATCCGCAGCGGACGGCGGTTCTTGCGAGAATACAGTCGGAAGCTATAAGTGTTCTG
1201 GCCTTCCAGGCTATGAGGGAGACGGCCATAACTGCACGGATATCGACGAGTGCGCCGCTA
1261 AATCGCCGTGTGGCGACAACACTCGCTGTGAAAATACACCAGGGTCATTCTGTGTCTCTT
1321 GCATGGATGGATATGAACGTG

Klon: GW_1Fr#5 (2787 bp) im pDrive Vektor

Nukleotidsequenz

1 CTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCCGGGCTGGTAAAATGATCTAATGTGCTGGTGAGC
61 ACAGGGGGCAGCCGGACCCGACCTTGCCTCATCCACAAGCATTTTCCCTTGTGCTAAAAG
121 GCTCAAAGGCAGTGTAAGCTTTACCGGACTGGGGTCGCCGCTGCTTGGCCAAGCGTCGTA
181 CTTTTCGGTTGCGTCAATAGCAAGTCCATTTTCATCCGCCTTGCCTACGGCGCCACACATT
241 GCCAACCGCCAGCGACTTGTTCGGCCTTCTTGATAGACAACCGTCCCTCGTTTTACAAAG
301 CATGTGCTCAGCCTGCATCGGTTGCAAGAAGAAGGATACTAGTTTAATTGGCAGCTGCAA
361 GCGGAAATTCGCCGACGTTTTTCTTCCCCACCGCCTCTACTTCGCCCCCAGGCCACCTAG
421 TTCTGTGGTTGCCAGCTTTACTTTCAAGCCTTCTGCTTTTGGCCGATTTTATGCACAC
481 ATAAAATAGGGCTAAAAGCAAAAGGCTTAAAGGTGAAGCTGCATCTTCATCGTCAAGCTT
541 TTTTGGTTTTCCATTTTTGCCACTAGCTTAACTGACTTACCTGCGTCAAATCTAACT
601 TTTCGGCTGCATACCTTCGACTATGCGCTCCGCCACTGGGACTGCTTGGCCAGCACCAGG
661 CCTTAAGATTTCCACCGGCAGCGTTCTACGGGCGCCATCTTAAGTGCAGGAGAGATTGA
721 TATGCGCTGCTACTTCTTCGGCAATATACGCTTTGACGTTACAGCCTTTGTGTGTGCTTT
781 GGTTAGGCACTGACGTCTCTTGTCACGGCACGTGGACACCGTGGACCGCCTGCAGCAACG
841 ATACTGGTCTTCAAGAAAGGCACAATACAAAGTGCGAGACGTGGGTTGAAGTGCAAGAGT
901 GCAAGAAAAAATCAGAATGTAAGCACACGATACCGGAAGCGCCTTGGCATCTCCAGCACC
961 AACGCGTCTGCGTTTGTGTTTGCAGCGTGTAAGAAATTTGGGGGTTGCGTATTCAGGT
1021 GGAGAGTTTTCGCCGTGGACGCCTGGGAAGGCAGCCTGTGTCAACGGCCAGGTCCAGACG
1081 CGTGTTAGGGATTCCCTGCCCTGAAGTTCAGGAAATAAAAATTTGCAAGCCACCTCCACCG
1141 CAGTGCATGGATGACTGGACGGATTGGACAAATTGTCAGGGTACAAATTGTCAGGGTACA
1201 AAGACTCAAGAAAGGCACAATGCGAGTTGCCTGCAGACAGAAGTCCGCGAGTGCAACCTG
1261 ACTGCAGAGGAAGTCGAGAAATGTGAGTGATGCGAAGACGACCCAGCAAGAAGGGGCTTG
1321 GTGCTGCCTAAACATTTCCCTGCACGAACGTGGTGCGCGGCCATTTTGGCATATTTGTT
1381 TTCAGGCGGCCCTTTCACGGAGTGGGCTCCGCCACTAACGAAAACTGCATTCCAGGGGA
1441 CGAGCACAGGCGGTGGCGTGTAAGCTGTCTGACAGGAAGGAAGTTCGAATATGCGGAGC
1501 GTTTGAGTGTAATCAGTGCTCCAGCAATGCAACATGCGATTTTCATTGCTGGACAATGCAC
1561 CTGCAAGCCGGGCTTTAGGGGCGACGGCAAGACATGCGAGGCATTCGATCCCTGTTCCGA
1621 GACCCAGCTCCCTGTGATACAAACGCCACCTGCGCCGCCGATGGAAGCACTCCCAAGTG
1681 CAAGTGTAAGAGCGGGTGAATGCAGATGACAAGGCAGGCGCTAACAACTATCCTTGCGT
1741 GGAGCTGGATGAATGTGCTGCCAATACTCATAAATGTCCAGCCCACTCAGACTGCCAAAA
1801 CACCCCGGGATCGTACATGTGCAATTGTGCGAACGGATGGCAGAAGACAAGTGACAGAAG
1861 TTGCGAAGACGTGATGAGTGCGCTCGGGGAGACCACGGGTGTCCTGCAAACCTCCACATG
1921 TGTCAAACACTGTGGGAAGCTTTGAATGCCAGTGCAACGAAGGGTATCGAGGAGGCGGTAC
1981 GGACGAAAGTCCTTGTATGAATGTGAACGAGTGCGAGAACCCGAACGCGTGTCTGCGCA
2041 TGCCACTTGACGGACTCACCCGGGTCATACACCTGCAGCTGTCCAGAAGGGTACAGCGG
2101 AGAGGGTACTCACAAGTCTCTTGCTCGAAAATTGACTACTGCGCTAACTCGGCCCTCAA
2161 CAACTGCGGAGTACACTCCAAATGCGTCAACACGCTCACGACTTTCAAGTGCGTATGCGA
2221 TGCTGGATATGCGGGGTTGGGCACGCATGAAAACCTTGTGTGGATATTGACGAGTGCTC
2281 TTCTGATAGACCGGCAATGACTGCCATCGCGACGACAGTGACAAAACACTGATGGGTC
2341 GTACACCTGCAAGTGCAAACCTGGATTTACTGGGGATGGAGTCGGTGCTGGTGGGTGCAC
2401 TGATGTGATGAGTGTGCTCAATCCCCATGCCACGCAAACGCTACGTGTACCAATACGAA
2461 GGGCTCATACACTTGACATGCAACGAGGGGTATGTAGATGCGTCAAATGATGGACGCGA
2521 ATGTCGCGATGTTGACGAGTGTGAGAACGGACTTGAGTGTGTACGCTTCGGCACAGTG
2581 CCTCAACACCGTGGGCAGCTACGAGTGTAAAGTGTGACGGTTTTCGTGGGAGATGGGAA
2641 GGTTTGCAACGATGTCAACGAATGCTTTGCGAATGAATCCCCATGCGGGCTGAACGCCGA
2701 ATGCCATAACACAATCGGCAGTTATGAGTGCGCGTGCAAGGACGGATATGGAGGCCTAGA
2761 CAGCAAGAAAAGCTGCTCTGACGTCAA

Klon: GW_2Lr#1 (1084 bp) im pDrive Vektor**Nukleotidsequenz**

```

1   CGACGGCCCCGGGCTGGTATCCTGGTTAGGCACGGTAGCTGGTAGTGATGCGCGGGTGAGA
61  AACTTTTTTTTTTCGCTTTACTCTTGTGTCTGGCCTTAAGCTTGCAATGCCATAGAAGTT
121 TTTGGCTGTGGAGAATTTGGTTTCAGACAATTTTGGCTTCACTGCGGTCTTATGGCGTCA
181 CTAAACGTGCAAATACGCTGACCCTTCTAACAAAGGTGTCTAGCTGCGAATAAACTTTA
241 ATACTGTAATGGCACCAGGAGTCGCATGTGACCATTTTAGGTATCACACTGGTTGTAAG
301 GCGAGCGTGGTGGAGGAACTCAGGGAACGTAGAACAGATTGATAGAGGCAGTGTCAGAG
361 AAGCGGTTGAAATTACTTGTGCGGAACCGTTATTTATAGTTGGTGACAGTGCAATCCAT
421 CCTGCGTCATATTGGGCTATGTGGGCACTTGAAGAGCTCCATTTCTGGCATCTGGCACTG
481 CTCTTGCGTTGGTTCGCCGATGGCGTCTTTGCCTCTACTATTATATCGACATTTTGCATT
541 TCGTCAGCTGCCTTAGAATCTACTCAAAGCTTTGCGTTTTAAAGTCAGTTTACGGTTTAG
601 GCGTATGGTGGGTACCGTGAGCGAATTCGAGTGCCTGTGAGTAGACTTCAGGCCCTGTTT
661 CTCAGGTGGGCGGGCTCGCCTGCGCGTAGAAAGAATCTATTGGATGCCAGGGCGCAAAT
721 TTTTACGTACATAAAAAAGACATGCGTACTTGCATGCCGCTGAATTTTCGGCAGATTTT
781 CCGTTGAGCTTAGAAAAGAGGAACGCTTCCTGCAAAGCTTTCTTAAGGGTTGCTGGCCGCC
841 TGGCACGCGTCAAGCATCTTTGCGCTGCACTGTTTCTCCATGACGGCAGGGTGTTGTAG
901 AAGGCATTTCTTTAAATGATCTAATGTGCTGGTGAGCACAGGGGGCAGCCGACCCGAC
961 CTTGCGTCATCCACAAGCATTTTCCCTTGTGCTAAAAGGCTCAAAGGCAGTGTAAGCTTT
1021 ACCGGACTGGGGTCGCCGCTGCTTGGCCAAGCGTCGTACTTTTCGGTTGCGTCAATAGCA
1081 AGTC

```

Klon: GW_2Sr#29 (1928 bp) im pDrive Vektor**Nukleotidsequenz**

```

1   CGTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGAGGCCCGGGCTGGTATCGACGAGTGC
61  GCCACTAAATCGCCGTGTGGCGACAACACTCGCTGTGAAAATACACCAGGGTCATTTCGTG
121 TGCTCTTGCGATGGATGGATATGAACGTGAAACCGAGCTTTCATGCAGAGACATCGATGAG
181 TGCGAGAACAACACCTGTATGGTGCCCGCACACGGCATTTCGCGAGAATACTGATGGGAGC
241 TGCACTTTCCACTGTGCCCTGGCTATCGCCACGTGCAAGGCAGCCGCGTGAAGATTGAC
301 CACTGCAAGGAGACGAAGTGTAGCGTTCATGCGACGTGCCACGAGAACGACGCCGGAAC
361 GAGGCCATCTGCACTTGTGGAAGCGGATACGAAGGCAACGGCAAGGGCGAGGATGGGTGT
421 AAGAACATCGACGAATGCGTTGCTGGCAATCCATGTGAATCGTTTGGCGCTGGCGGCTAT
481 TGCGAGGATACCGAAGGGTCTTTTGTGTTGTGAGTGCAAAACCGGGTTTGTCAAACATGCAT
541 TCGACATGCAGTGATTTGAATGAGTGCCTAGACGCAAACTGAACAAATGCTCCGGTGTT
601 GGAGGGCTATGTACAAACACAGTGGGGTCGTACACTTGCAGGCTGCTCGGAAGGGTACTCT
661 GGAGACGGTTACGAATGTACGGACGTTGACGAATGCCTGACGGGGAAGCACAACATGCGGT
721 CCTCATTCCACTTGCGTGAACACCGACGGCAGCTTTAAGTGCTCGTGCAACGAAGGGTTT
781 TCTGGTGATGGAATCACGTGCGAGGATGTTGACGAGTGCGCGGACGACAGCCTCATACGT
841 GCGACACTCACAAGGGCGTGTGCGAAGACGCGGCTCTTACTCTGCGGTGCAAGCCGGCT
901 TGACTGTCTTCAGACGGGTTTCATGTGCAAAAGTAAGACGCAAAAGTCCGACCTGAGAAGT
961 GGCTTTAAAAAATTACATTTCCAAAGGGAATCTAAGTTTTTTAAAGCCATTTCTAACA
1021 TTGCATGTCTTGGGGTTATTTTTGTGCTACAAAAAATAAGGCTTGATGGTGTTTTGTGTC
1081 GGTGATTTGGTTTCGACAGCGTCGACGAGTGTGCCGCCGGTACTGCAAAGTGCGATGAAAA
1141 GAGTTTCTGTGTTGACAGCCAGGGATCGTACACGTGCGAGTGCAAAAATGGGTACAGGCA
1201 GTCGGGCGATGGCTGCGTTGACGTGGACGAATGTGACAGTGGGGTGGATGATTGTCACGA
1261 ACACGCTGTCTGCAAGAACACTGACGGCAGTTTCACGTGCGAGTGTGCTGAAGGCTACCA
1321 AGGGGACGGCAGGATGTGCGAGAAGACCGTTGGACCATGTGACTCAAACCCATGCGGGGA
1381 CAAAGCGGATTGCGAAGTGCTTGGCAACAGCTATACTTGACCTGCCACAAAGGCTATGA
1441 GATGGCAGACGGACGATGCGCGGACATTGACGAATGCACTGCGGGAACGCACAACCTGCGA
1501 CGCGCATGCAGTGTGCACAAACACTTCGGGTTTCGTATACCTGCACTTGTGGCAAAGGTTA
1561 TACGGCGTTTGGCGAGTCATGCCAGGACGTCGACGAGTGCGTCGGGAACGCTGCAGGTTG
1621 CGACATACATGCAGTATGTAACCTGCCCCGGCTCTTTCAGTTGTGCTTGCAAGTCGGG
1681 TTTTGAAGGCAACGGCTATGAATGCGTGGAGAAGCCCGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTT
1741 CGAGTCGTGGACTGCTTGGTCGAAGTGTGACGGGACCACCACAGAAAGCAAAGACATTG
1801 TATCGTTCTGTCGACCAAAACGGAGACACGCGAATGCCAGGGAAGGAGAAGACTGACTG
1861 CGGGGAATTTGGAGAATGGTCATCATGCCCGGGCTCGGTCAACAACATGTCTCACCGTCA

```

```
1921 AAGGGAGAGGTTTGGAGAGGCAGGCTGCGAAAATGCAGAATTAGTGCGCGAGTGCCAGA
1981 TGCTGGTGCCTCTCTTCTGCGTTCAAAGAAAATATGTTTTTTCTGGCAATTATATTATT
2041 GCGCTAAAATCAGTCCACTTCTGCAGTATGAGCAAACCAAGTTCACATTCTTGCAGTGCAA
2101 AATCCGCTCTTACTCTGCATAGTGCTTTTGTCTCAGAGATGGAAGGGGAATGTGGGGAT
2161 TTCGGCAACTGGAGCGATTGCGGAGTTCCATCGGCGGGCCTGCGGTCAAGGGCGAGGGAT
2221 CGCTGCCCTGATCAGGTGGAGTTTGAGGAGTGCTCTACCGAAGGCGGGGGTGCGCAGCTT
2281 GGAGGGCCTGGCGTCGAAGGACCTACTGGTGAGTCTGCAAACCAAG
```

Klon: GW_V4r#58 (Teilsequenz, 2800 bp) im pDrive Vektor

Nukleotidsequenz

```
1 AGGAACCTGGTAGTGAAGGTGCACAGCCTCAAGCACCTGGTGCTGAAGAGGCAGGTACAC
61 CTGGTGCTGGGGCTGAGCTACCGAAAGGTCTGGTGAAGCCGAAGCTGAGTCGGAAGAGA
121 AGGAGGAGGGCGCTGGGTTTCCTGTGGCGGCGGTTGCTGGTGCGTGGGTGGTCTCCTTC
181 TCATTGCCGCTATGGGAGGCGGCTATGCTGCGTATTCTCGTGGAGGCGAGGGTGCGACCG
241 ATGAAGCGGAACAAGTCATGTTTGAAGGCGGCGAGGTATCCGGAGCTGGAGCTGAGGCGC
301 AGGAAGGGGACACTGTTATTGACATCACTGAAGAGGATGACTATTGGGCAGATAGTGCG
361 ATATTCAGTAAAATCATTGCATGCCTCAAGGATGTTTTCTCTTGACGGGACGCCGAATT
421 TGGCTGTTCCAGATTGGACCTTGCATTGGGCTTGCTTGTGGAAATACAGCTGTACAA
481 ATACTTCTTGGGCATGGAAGGGCGTTGCAAGGCACAATTAAGCACACTGAAATTCAGGG
541 CAGTTACTTGTCTTGCGGAACCACACTAAACCCTACACCGCTGCACTTTCGCTGCTCGC
601 CGGGGTGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
661 CGAACGCAGCGGGATATCCTGGTTAGGCACGGTAGCTGGTAGTGATGCGCGGGTGAGAAA
721 CTTTTTTTTTTTCGCTTTACTCTTGTGTCTGGCCTTAAGCTTGCAATGCCATAGAAGTTT
781 TTGGCTGTGGAGAATTTGGTTTCAGACAATTTTGGCTTCACTGCGGTCTTATGGCGTCAC
841 TAAACGTGCAAATACGCTGACCCTTCTAACAAAGTGTCTAGCTGCGAATAAACTTTAAT
901 ACTGTAATGGCACCGGGCAGTCGCATGTGACCATTTTAGGTATCACACTGGTTGTAAGGC
961 GAGCGTGGTGGAGGAACTCAGGGAACGTAGAACAGATTGATAGAGGCAGTGTCAGAGAA
1021 GCGGTTGAAATTACTTGTGCGGAACCGTTATTTATAGTTGGTGACAGTGCAATCCATCC
1081 TGCCTCATATTGGGCTATGTGGGCACCTGAAGAGCTCCATTTCTGGCATCTGGCACTGCT
1141 CTTGCGTTGGTTCCCGCATGGCGTCTTTGCCTCTACTATTATATCGACATTTTGCATTTT
1201 GTCAGCTGCCTTAGAATCTACTCAAAGCTTTGCGTTTTAAAGTCAGTTTACGGGTTAGGC
1261 GTATGGTGGGGTACCGTGAGCGAATTCGAGTGCTGTGGAGTAGACTCAGGCCCTGTTCTT
1321 CAGTGGCCGGGCTCGGCTGCCGTAGAAAGATCTATGATGCCAGGGCAATTTAACGTACTA
1381 AAAGACATGCGTACTGCATGCCCTGATTGCGGATTCGCGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG
```

AATAAA – Poly-Adenylierungssignal

Zu 3.1.5 zusammengesetzte DNA-Sequenz von Ebmic4 (gDNA-Sequenzen und cDNA-Sequenzen, 8718 bp)

Nukleotidsequenz

```
1 CGACGGCCCCGGGCTGGTATCCTGGTTAGGCACGGTAGCTGGTAGTGATGCGCGGGTGAGA
61 AACTTTTTTTTTTTCGCTTTACTCTTGTGTCTGGCCTTAAGCTTGCAATGCCATAGAAGTT
121 TTTGGCTGTGGAGAATTTGGTTTCAGACAATTTTGGCTTCACTGCGGTCTTATGGCGTCA
181 CTAAACGTGCAAATACGCTGACCCTTCTAACAAAGGTGTCTAGCTGCGAATAAACTTTA
241 ATACTGTAATGGCACCGGGCAGTCGCATGTGACCATTTTAGGTATCACACTGGTTGTAAG
301 GCGAGCGTGGTGGAGGAACTCAGGGAACGTAGAACAGATTGATAGAGGCAGTGTCAGAG
361 AAGCGTTGAAATTACTTGTGCGGAACCGTTATTTATAGTTGGTGACAGTGCAATCCAT
421 CCTGCGTCATATTGGGCTATGTGGGCACCTGAAGAGCTCCATTTCTGGCATCTGGCACTG
481 CTCTTGCGTTGGTTCCCGCATGGCGTCTTTGCCTCTACTATTATATCGACATTTTGCATT
541 TCGTCAGCTGCCTTAGAATCTACTCAAAGCTTTGCGTTTTAAAGTCAGTTTACGGTTTAG
601 GCGTATGGTGGGTACCGTGAGCGAATTCGAGTGCTGTGAGTAGACTCAGGCCCTGTTCT
661 CTCAGGTGGGCGGGCTCGCCTGCGCGTAGAAAGAATCTATTGGATGCCAGGGCGCAAAT
```

721 TTTTACGTACATAAAAAAGACATGCGTACTTGCATGCCGCTGAATTTTCGGCAGATTTTC
 781 CCGTTGAGCTTAGAAAGAGGAACGCTTCCTGCAAAGCTTTCTTAAGGGTTGCTGGCCGCC
 841 TGGCACGCGTCAAGCATCTTTGCGCTGCACTGTTTCTCCATGACGGCAGGGTGTGTAG
 901 AAGGCATTTCTTTAAAAATGATCTAATGTGCTGGTGAGCACAGGGGGCAGCCGGACCCGAC
 961 CTTGCGTCATCCACAAGCATTTTCCCTTGTGCTAAAAGGCTCAAAGGCAGTGAAGCTTT
 1021 ACCGGACTGGGGTTCGCCGCTGCTTGGCCAAGCGTCGTACTTTTCGGTTGCGTCAATAGCA
 1081 AGTCCATTTTCATCCGCCCTTGCCTACGGCGCCACACATTGCCAACCAGCCAGCGACTTGTTTC
 1141 CGCCTTCTTGATAGACAACCGTCCCTCGTTTTACAAAGCATGTGCTCAGCCTGCATCGGT
 1201 TGCAAGAAGAAGGATACTAGTTTAATTGGCAGCTGCAAGCGGAAATTCGCCGACGTTTTT
 1261 CTTCCCCACCGCCTTACTTCGCCCCCAGGCCACCTAGTTCTGTGGTTGCCAGCTTTTAC
 1321 TTTCAAGCCTTCTGCTTTTGGCCGTATTTTATGCACACATAAAATAGGGCTAAAAGCAAA
 1381 AGGCTTAAAGGTGAAGCTGCATCTTCATCGTCAAGCTTTTTTGGTTTTCCATTTTTGCCA
 1441 CTAGCTTAACCTGACTTACCTGCGTCAAAATCTAACTTTTCGGCTGCATACCTTCGACT
 1501 ATGCGCTCCGCCACTGGGACTGCTTGCCAGCACACAGGCCCTTAAGATTTCCACCGGCAG
 1561 CGTTCTACGGGCGCCATCTTAACTCGCGGGAGAGTTGATATGCGCTGCTACTTCTTCGGC
 1621 AATATACGCTTTGACGTTACAGCCTTTGTGTGTGCTTTGGTTAGGCACTGACGTCTCTTG
 1681 TCACGGCACGTGGACACCGTGGACCGCTGCAGCAACGATACTGGTCTTCAAGAAAGGCA
 1741 CAATACAAAAGTGCGAGACGTGGGTGAAGTGCAAGAGTGCAAGAAAAAATCAGAATGTAA
 1801 GCACACGATACCGGAAGCGCCTTGGCATCTCCAGCACCAACGCGTCTGCGTTTGTGTTT
 1861 GCAGCGTGTAAGAAAATTTGGGGTTGCGTATTAGGTGGAGAGTTTTCGCCGTGGACGC
 1921 CTGGGAAGGCAGCCTGTGTCAACGGCCAGGTCCAGACGCGTGTAGGGATTCTGCCCTG
 1981 AAGTTCAGGAAATAAAAAATTTGCAAGCCACCTCCACCGCAGTGCATGGATGACTGGACGG
 2041 ATTGACAAATTTGTCAGGGTACAAATTTGTCAGGGTACAAAGACTCAAGAAAGGCACAATG
 2101 CGAGTTGCCCTGCAGACAGAAGTCCGCGAGTGCAACCTGACTGCAGAGGAAGTCGAGAAAT
 2161 GTGAGTGATGCGAAGACGACCCAGCAAGAAGGGGCTTGGTGCTGCCTAAACATTTCCCTG
 2221 CACGAACTGTGGTGCGCGGCCATTTTGGCATATTTGTTTTTCAGGCGGCCCTTCACGGAG
 2281 TGGGCTCCGCCACTAACGGAAAATGCATTCAGGGGACGAGCACAGGCGGTGGCGTGTA
 2341 AGCTGTCTTGACAGGAAGGAAGTTTCAATATGCGGAGCGTTTGAGTGTAATCAGTGCTCC
 2401 AGCAATGCAACATGCGATTTCATTGTGGACAATGCACCTGCAAGCCGGGCTTTAGGGGC
 2461 GACGGCAAGACATGCGAGGCATTGATCCCTGTTCCGAGACCCAGCTCCCTGTGATACA
 2521 AACGCCACTGCGCCGCGATGGAAGCACTCCCAAGTGCAAGTGTAAGAGCGGGTGGAAT
 2581 GCAGATGACAAGGCAGGCGCTAACAATATCCTTGCGTGAGCTGGATGAATGTGCTGCC
 2641 AATACTCATAAATGTCCAGCCCACTCAGACTGCCAAAACACCCCGGGATCGTACATGTGC
 2701 AATTGTGCAACGGATGGCAGAAGACAAGTGACAGAAGTTGCGAAGACGTCGATGAGTGC
 2761 GCTCGGGGAGACCACGGGTGTCTGCAAACTCCACATGTGTCAACACTGTGGGAAGCTTT
 2821 GAATGCCAGTGCAACGAAGGGTATCGAGGAGGCGGTACGGACGAAAGTCCTTGATGAAT
 2881 GTGAACGAGTGCGAGAACCCGAACGCGTGTCTGCGCATGCCACTTGCACGGACTCACCC
 2941 GGGTCATACACCTGCAGCTGTCCAGAAGGGTACAGCGGAGAGGGTACTCACAAGTCTCCT
 3001 TGCTCGAAAATGACTACTGCGTAACTCGGCCCTCAACAACCTGCGGAGTACACTCCAAA
 3061 TCGCTCAACACGCTCACGACTTTCAAGTGCGTATGCGATGCTGGATATGCGGGGTTGGGC
 3121 ACGCATGAAAACCTTGTGTGGATATTGACGAGTGCTCTTCTGATAGACCGGCGAATGAC
 3181 TGCCATCGCGACGCGAGAGTGACAAAACACTGATGGGTGCTACACCTGCAAGTGCAAACCT
 3241 GGATTTACTGGGGATGGAGTCGGTGTGGTGGGTGCACTGATGTCGATGAGTGTGCTCAA
 3301 TCCCCATGCCACGCAACGCTACGTGTACCAATACGAAGGGCTCATACACTTGCACATGC
 3361 AACGAGGGGTATGTAGATGCGTCAAATGATGGACGCGAATGTCGCGATGTTGACGAGTGT
 3421 GAGAACGGACTTGCAGTGTGTACGCTTCGGCACAGTGCCCTCAACACCGTGGCAGCTAA
 3481 GAGTGTAAGTGCTTGACGGTTTTCTGGGAGATGGGAAGGTTTGCAACGATGTCAACGAA
 3541 TGCTTTGCGAATGAATCCCCATGCGGGCTGAACGCCGAATGCCATAACACAATCGGCAGT
 3601 TATGAGTGCGCGTGCAAGGACGATATGGAGGCCCTAGACAGCAAGAAAAGCTGCTCTGAC
 3661 GTCAATGAGTGCGCTGACCCCGGTTTTGAAGTTTCTGAAAACGTCAATGCGCGAACACT
 3721 GAGGGTAGCTACAAATGGGAACCTAAATTTAGGCTATGAGCTGGTGGGCAACTCGGAGTGC
 3781 CGCAAGATTGACTACTGCTCACTCGGCCCTTGCAACAGTCTTGACAGCTGTAAAGAGAAC
 3841 CCTGAGGGCACCAAAGCGATATGCACGTGCAAAGTGGGCTATGCTGGAGACGGCTCAGCG
 3901 GGGAGTGTGTGCGCCGACATCAACGAATGTGAAGGGAACAATACTTGTGCAGCACCGGGG
 3961 GACGGCGGTATCTGCGAGAACACAGTGGGATCTTACGTCTGTAAGTGCGCAGCAGGTTAT
 4021 CAGGGAGATGGAAGTGCTTGCAGTGACATCGATGAGTGCGCGACTAATGCACACAACCTGC
 4081 CATCTTCGGCCACGTGCACGAACACAGCTGGAAGCTACCGCTGTACTTGCAATAATGGC
 4141 TTTTCTGGCGACGGCGTTGAGTGTGTGGACATTGACGAGTGCTCCACAAATGCTGACGAC
 4201 TGCGGAAACAACACTGAATGCTCAAACACAATTGGCAGCTTTGAGTGCGTTTGCCGAACCT
 4261 GGGTATTCAAGACAGGATGCAAAGAACTGCGTCGATATTGACGAGTGCTCTGACGGTACC
 4321 CACACCTGTTCTTCTTCGCCGCTGCAGCAACACCGACGGATCTTACAGGTGCCAGTGT
 4381 AAAGCTGGTTACGAAGGCGACGGCCATAAATGTGAAGACATCGATTTCTGCGGTGACGGG

4441 AGACACGACTGCAACGTCAAAGCCGAGTGCGCTGAGAGCGCTGACAACTCAACGTTCAAA
 4501 TGCACCTGTGCTCCAGGCTACACTGGCAATGGGCACGGCCCCGAGGGGTGCAAGGACATT
 4561 GATGAGTGTGCGGGGGGTAATGTATGCGGAGAGAACACAACCTGCTACTAACACTGCTGGA
 4621 AGCTTTGAGTGTGCGTGCAAAGACGGCTTTGAGGGTCTAAAGAAGGGGACGAGCTGACA
 4681 TGTGTGGATGTTGACGAGTGCGGTGACACTTCTCGAAATACCTGTGCATCCGCAGCGGAC
 4741 GGCGGTTCTTGCGAGAATACAGTCGGAAGCTATAAGTGTTCTGTCCTTCCAGGCTATGAG
 4801 GGAGACGGCCATAACTGCACGGATATCGACGAGTGCGCCGCTAAATCGCCGTGTGGCGAC
 4861 AACACTCGCTGTGAAAATACACCAGGGTCATTCTGTGTCTTTCATGGATGGATATGAA
 4921 CGTGACGTGAAACCGAGCTTTCATGACAGAGACATCGATGAGTGCGAGAACAACACCTGTA
 4981 TGGTGCCCGCACACGGCATTTCGAGAACTACTGATGGGAGCTGCACTTTCCACTGTGCCC
 5041 CTGGCTATCGCCACGTGCAAGGCAGCCGCGTGAAGATTGACCACTGCAAGGAGACGAAGT
 5101 GTAGCGTTCATGCGACGTGCCACGAGAACGACGCCGGAACCTGAGGCCATCTGCACCTGTG
 5161 GAAGCGGATACGAAGGCAACGGCAAGGGCAGGATGGGTGTAAGAACATCGACGAATGCG
 5221 TTGCTGGCAATCCATGTGAATCGTTTGGCGCTGGCGGCTATTGCGAGGATACCGAAGGGT
 5281 CTTTTGTTTGTGAGTGCAAAACCGGGTTTGTCAAACCTGCATTGACATGCAGTGATTTGA
 5341 ATGAGTGCCCTAGACGCAAACTGAACAAATGCTCCGGTGTTGGAGGGCTATGTACAAACA
 5401 CAGTGGGGTCTGACACTTTCGGCTGCTCGGAAGGGTACTCTGGAGACGGTTACGAATGTA
 5461 CGGACGTTGACGAATGCCGTGACGGGGAAGCACAACCTGCGGTCTCTATTCCACTTTCGTGA
 5521 ACACCGACGGCAGCTTTAAGTGCTCGTGCAACGAAGGGTTTTCTGGTGATGGAATCACGT
 5581 GCGAGGATGTTGACGAGTGCGCGGACGACAGCCTCATACGTGCGACACTCACAAGGGCGT
 5641 GTGCAGAACACGCGGCTCTTACTCTGCGGTGCAAGCCGGCTTGACTGTCTTCAGACGGGT
 5701 TCATGTGCAAAAGTAAGACGCAAAAGTCCGACGCTGAGAAGTGGCTTTAAAAAATTACAT
 5761 TTCCAAAGGGAAATCTAAGTTTTTAAAGCCATTTCTAACATTGCATGTCTTGGGGTTAT
 5821 TTTTGTGCTACAAAAAATAAGGCTTGATGGTGTTTTGTTGCGGTGATTTGGTTCGAGAC
 5881 GTCGACGAGTGTCGCCGCGGTACTGCAAGTGCGATGAAAAGAGTTTCTGTGTTGACAGC
 5941 CAGGGATCGTACACGTGCGAGTGCAAAATGGGTACAGGCAGTCGGGCGATGGCTGCGTT
 6001 GACGTGGACGAATGTGACAGTGGGGTGGATGATTGTCACGAACACGCTGTCTGCAAGAAC
 6061 ACTGACGGCAGTTTACGTGCGAGTGCTGAAGGCTACCAAGGGGACGGCAGGATGTGC
 6121 GAGAAGACCGTTGGACCATGTGACTCAAACCATGCGGGGACAAAGCGGATTGCGAAGTG
 6181 CTTGGCAACAGCTATACTTGACCTGCCACAAGGCTATGAGATGGCAGACGGAGTGC
 6241 GCGGACATTGACGAATGCACTGCGGGAACGCACAACCTGCGACGCGCATGCAGTGTCACA
 6301 AACACTTCGGGTTCGTATACCTGCACCTTGTTGGCAAAGGTTATACGGCGTTTGGCGAGTCA
 6361 TGCCAGGACGTGACGAGTGCGTCCGGAACGCTGCAGGTTGCGACATACATGCAGTATGT
 6421 ACTAACCTGCCCCGGCTCTTTCAGTTGTGCTTGCAAGTCGGGTTTTGAAGGCAACGGCTAT
 6481 GAATGCGTGGAGAAGCCCGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTTGCAGTCTGGACTGCTTGG
 6541 TCGAAGTGTGACGGGACCACACAGAAAGCAAAAGACATTGTATCGTTCTGTGACCAAAA
 6601 ACGGAGACACGCAATGCCAGGGAAGGAGAAGACTGACTGCGGGGAATTTGGAGAATGG
 6661 TCATCATGCCCGGGCTCGGTCAACAACATGTCTCACCGTCAAAGGGAGAGGTTTGGAGAG
 6721 GCAGGCTGCGAAAATGCAGAATTAGTGCGCGAGTGCCAGATGCTGGTGCGTCTCTTCTG
 6781 CGTTCAAAGAAAATATGTTTTTTTCTGGCAATTATATTATGCGCTAAAATCAGTCCACT
 6841 TCTGCAGTATGAGCAAACAGTTCACATTCTTGCAAGTGCAAAATCCGCTCTTACTCTGCA
 6901 TAGTGCTTTTGTCTCAGAGATGGAAGGGGAATGTGGGGATTTCCGGCAACTGGAGCGATT
 6961 GCGGAGTTCCATCGGCGGGCTGCGGTCAAGGGCGAGGGATCGCTGCCCTGATCAGGTGG
 7021 AGTTTGAGGAGTGCTTACCGAAGGCGGGGTGCGCAGCTTGAGGGGCTGGCGTCGAAG
 7081 GACCTACTGGTGAGTCTGCAAAACAGGAGCGCTGGGGTTGGGGGTGAGCAAGCAGAAG
 7141 CACCAGGTGTGGAAGGTGAGGAGCCAGGGGACCTGAGAAACAGCTGAGCACCCTCGAAG
 7201 GACCTGGTGGTGACGTGAAGTCCAGAGGACCGGGGCCACGCCGGAGCACCCTCGAAG
 7261 GACCTGGGGTGAGACTGAGGAGCCCGAGGAACCTGGTAGTGAAGGTGCACAGCCTCAAG
 7321 CACCTGGTGCTGAAGAGGCAGGTACACCTGGTGCTGGGGCTGAGCTACCGAAAGGTCCTG
 7381 GTGAAGCCGAAGCCGAGTCGGGTGAGAAGGAGGAGGGCGCTGGGTTTCTGTGGCGGCGG
 7441 TTGCTGGTGGCGTGGGTGGTCTCCTTCTCATTGCCGCTATGGGAGGCGGCTATGCTGCGT
 7501 ATTCTCGTGGAGGCGAGGGTGCGACCGATGAAGCGGAACAAGTCATGTTTGAAGGCGGCG
 7561 AGGTATCCGGAGCTGGAGCTGAGGCGCAGGAAGGGGACACTGTTATTGACATCACTGAAG
 7621 AGGATGACTATTGGGCAGATAGTGGCGATATTAGTAAACTCATTGCATGCCTCAAGGA
 7681 TGTTTTCTCTTGACGGGACGCCGAATTTGGCTGTTTCCAGATTGGACCCTTGCATTGGGC
 7741 TTGCCTTGTTGGAATACAGCTGTACAAATACTTCTTGGGCATGGAAGGGCGTTGCAAGGC
 7801 ACAATTAAGCACACTGAAATTCAGGGGAGTTACTTGTTCTTGCAGAACCACTAAACC
 7861 CTACACCGCTGCACCTTTCGCTGCTCGCCGGGGTGGCTGGTGGTGCTCCGGGCACCTGCC
 7921 GCCCCGAAAGCTCATGGCTCTTTTAAACGAACGCAGCGGGATATCCTGGTTAGGCACGGT
 7981 AGCTGGTAGTGATGCGCGGGTGAGAACTTTTTTTTTTTCGCTTTACTCTTGTGTCTGGC
 8041 CTTAAGCTTGCAATGCCATAGAAGTTTTTGGCTGTGGAGAATTTGGTTTCAGACAATTTT
 8101 GGCTTCACTGCGGTCTTATGGCGTCACTAAACGTGCAATACGCTGACCTTCTAACAAA

```

8161 GTGTCTAGCTGCGAATAAACTTTAATACTGTAATGGCACCAGGCGAGTCGCATGTGACCA
8221 TTTTAGGTATCACACTGGTTGTAAGGCGAGCGTGGTGGAGGAACTCAGGGAACGTAGAA
8281 CAGATTGATAGAGGCAGTGTGAGAGAAGCGTTGAAATTACTTGTTCGGAACCGTTATT
8341 TATAGTTGGTGACAGTGCAATCCATCCTGCGTCATATTGGGCTATGTGGGCACTTGAAGA
8401 GCTCCATTTCTGGCATCTGGCACTGCTCTTGCCTTGGTTCCCGCATGGCGTCTTTCCTC
8461 TACTATTATATCGACATTTTGCATTTTCGTGAGCTGCCTTAGAATCTACTCAAAGCTTTGC
8521 GTTTTAAAGTCAGTTTACGGGTTAGGCGTATGGTGGGGTACCGTGAGCGAATTCGAGTGC
8581 TGTGGAGTAGACTCAGGCCCTGTTCCCTCAGTGGCCGGGCTCGGCTGCCGTAGAAGATCTA
8641 TGATGCCCAGGGCAATTTAACGTACTAAAAGACATGCGTACTGCATGCCCTGATTGCGGA
8701 TTCCCGTGAAGTAGAGAG

```

Zu 3.1.6 Verifizierung der EbMIC4-Sequenz (RT-PCR)

1. Sequenzen der Einzelklone

EbMIC4-RT-PCR 3-11-17 (1196 bp)

Nukleotidsequenz

```

GGTTCGTATACCTGCACTTGTGGCAAAGGTTATACGGGGTTTGGCGAGTCATGCCAGGACGTCGACGAGTGCCTC
GGGAACGCTGCAGGTTGCGACATACATGCAGTATGTACCAACCTGCCCGGCTCTTTCAGTTGTGCTTGCAAGTCG
GGTTTTGAAGGCAACGGCTATGAATGCGTGGAGAAGCCCGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTTGCAGGTCTGGACT
GCTTGGTCGAAGTGTGACGGGACCACCACAGAAAGCAAAAGACATTGTATCGTTCTGTGACCAAAACGGAGACA
CGCGAATGCCCAGGGAAGGAGAAGACTGACTGCGGGGAATTTGGAGAATGGTCATCATGCCCGGGCTCGGTCAAC
AACATGTCTCACCGTCAGAGGGAGAGGTTTGGAGAGGCAGGCTGCGAAAATGCAGAATTAGTGCGCGAGTGCCCA
GATGCTGAGATGGAGGAGGAATGTGGGGATTTCGGCAACTGGAGCGATTGCGGAGTTCCATCGGCGGGCCTGCGG
TCAAGGGCGAGGGATCGCTGCCCTGATCAGGTGGAGTTTGAGGAGTGCTCTACCGAAGGCGGGGGTGCGCAGCTT
GGAGGGCCTGGCGTCGAAGGACCTACTGGTGAGTCTGCAAAACCAGGAGCGCCTGGGGTTGGGGGTGAGCAAGCA
GAAGCACCAGGTGTGGAAGGTGAGGAGCCAGCGGGACCTGAGAAACAGCCTGAGCACCCCGAAGGACCTGGTGGT
GCAGCTGAACTGCCAGAGGCACCGGGGCCACGCCGAGCACCCCGAGGGACCTGGGGTGGAGACTGAGGAGCCC
GAGGAACCTGGTAGTGAAGGTGCACAGCCTCAAGCACCTGGTGCTGAAGAGGCAGGTACACCTGGTGCTGGGGCT
GAGCTACCGAAAGGTCTGGTGAAGCCGAAGCTGAGTCGGAAGAGAAGGAGGAGGGCGCTGGGTTTCTGTGGCG
GCGGTTGCTGGTGGCGTGGGTGGTCTCCTTCTCATTGCCGCTATGGGAGGCGGCTATGCTGCGTATTCTCGTGGA
GGCGAGGGTGCGACCGATGAAGCGGAACAAGTCATGTTTGAAGGCGGCGAGGTATCCGGAGCTGGAGCTGAGGCG
CAGGAAGGGGACACTGTTATTGACATCACTGAAGAGGATGACTATTGGGCAGATAGTCTAAAACTCATTGCA

```

EbMIC4_RT-PCR 3-1 (1311 bp)

Nukleotidsequenz

```

GATTGACCACTGCAAGGAGACGAAGTGTATCGTTCATGCGACGTGCCACGAGAACGACGCCGGAAGTGAAGCCAT
CTGCACTTGTGGAAGCGGATACGAAGGCAACGGCAAGGGCGAGGATGGGTGTAAGAACATCGACGAATGCGTTGC
TGGCAATCCATGTGAATCGTTTGGCGCTGGCGGCTATTGCGAGGATACCGAAGGGTCTTTTGTGTTGTGAGTGCAA
AACCGGTTTTGTCAAACATGCATTCGACATGCAGTGATTTGAATGAGTGCTTACACGCAAACTGAACAAATGCTC
CGGTGTTGGAGGGCTATGTACAAACACAGTGGGGTCTGACACTTGGCGCTGCTCGGAAGGGTACTCTGGAGACGG
TTACGAATGTACGGACGTTGACGAATGCCTGACGGGGAAGCACAACCTGCGGTCTCATTCCACTTGGTGTAACAC
CGACGGCAGCTTTAAGTGCTCGTGCAACGAAGGGTTTTCTGGTGATGGAATCACGTGCGAGGATATTGACGAGTG
CGCGGACGACAGCCTCAACACGTGCGACACTCACAAGGGCGTGTGCAAGAACACCGCCGGCTCTTACTCTTGCGG
GTGCAAGCCCGGCTTTGACCTGTCTTCAGACGGGTTACGTGCGAAAACGTCGACGAGTGTGCCGCCGGTACTGC
AAAGTGCGATGAAAAGAGTTTCTGTGTTGACAGCCAGGGATCGTACACGTGCGAGTGCAAAAATGGGTACAGGCA

```

GTCGGGCGATGGCTGCGTTGACGTGGACGAATGTGACAGTGGGGTGGATGATTGTCACGAACACGCTGTCTGCAA
GAACACTGACGGCAGTTTCACGTGCGAGTGTGCTGAAGGCTACCAAGGGGACGGCAGGATGTGCGAGAAGACCGT
TGGACCATGTGACTCAAACCCATGCGGGGACAAAGCGGATTGCGAAGTGCTTGGCAACAGCTATACTTGACCCG
CCACAAAGGCTATGAGATGGCAGACGGACGATGCGCGGACATTGACGAATGCACTGCGGGAACGCACAACCTGCGA
CGCGCATGCAGTGTGCACAAACACTTCGGGTTTCGTATACCTGCACTTGTGGCAAAGGTTATACGGGGTTTGCGA
GTCATGCCAGGACGTGACGAGTGCCTCGGGAACGCTGCAGGTTGCGACATACATGCAGTATGTACTAACCTGCC
CGGCTCTTTCAGTTGTGCTTGCAAGTCGGGTTTTGAAGGCAACGGCTATGAATGCGTGGAGAAGCCCGTTGTGCC
AGGTCAGATCTTTTGCAGTCTGTGGACTGCTTGTC

EbMIC4_RT-PCR 4-1 (2380 bp)

Nukleotidsequenz

GTCTGTAAGTGCGCAGCAGGTTATCAGGGAGATGGAAGTGCTTGCAGTGACATCGATGAGTGCGCGACTAATGCA
CACAAC TGCCATCCTTCGGCCACGTGCACGAACACAGCTGGAAGCTACCGCTGTACTTGCAATAATGGCTTTTCT
GGCGACGGCGTTGAGTGTGTGGACATTGACGAGTGTCCACAAATGCTGACGACTGCGGAAACAACACTGAATGC
TCAAACACAATTGGCAGCTTTGAGTGCGTTTGCCGAAC TGGGTATTCAAGACAGGATGCAAAGAACTGCGTCGAT
ATTGACAAGTGCTCTGACGGTACCCACACCTGTTCTTCCTTCGCCGCCTGCAGCAACACCGACGGATCTTACAGG
TGCCAGTGTAAGCTGGTTACGAAGGCGACGGCCATAAATGTGAAGACATCGATTTCTGCGGTGACGGGAGACAC
GACTGCAACGTCAAAGCCGAGTGCCTGAGAGCGCTGACAAC TCAACGTTCAAATGCACTTGTGCTCCAGGCTAC
ACTGGCAATGGGCACGGCCCCGAGGGGTGCAAGGACATTGATGAGTGTGCGGGGGGTAAATGTATGCGGAGAGAAC
ACAAC TTGCACTAACACTGCTGGAAGCTTTGAGTGTGCGTGCAAAGACGGCTTTGCAGGGTCTAAAGAAGGGGAC
GAGCTGACATGTGTGGATGTTGACGAGTGCGGTGACACTTCTCGAAATACCTGTGCATCCGACGCGACGGCGGT
TCTTGCGAGAATACAGTCAGAAGCTATAAGTGTTCTGTCCTTCTAGGTTATGAGGGAGACGGTCATAACTGCACG
GATATCGACGAGTGCGCCACTAAATCGCCGTGTGGCGACAACACTCGCTGTGAAAATACACCAGGGTCATTCTGTG
TGCTCTTG CATGGATGGATATGAACGTGAAACCGAGCTTT CATGCAGAGACATCGATGAGTGCAGACAACACC
TGTATGGTGCCCGCACACGGCATTGCGAGAATACTGATGGGAGCTGCACTTTCCACTGTGCCCTGGCTATCGC
CACGTGCAAGGCAGCTGCGTGAAGATTGACCACTGCAAGGAGACGAAGTGTAGCGTT CATGCGACGTGCCACGAG
AACGACGCCGGAAC TGAAGCCATCTGCACTTGTGGAAGCGGATACGAAGGCAACGGCAAGGGCGAGGATGGGTGT
AAGAACATCGACGAATGCGTTGCTGGCAATCCATGTGAATCGTTTGGCGCTGGCGGCTATTGCGAGGATACCGAA
GGGTCTTTTGTGTGTGAGTGCAAAACCGGGTTTGTCAAAC TGCATTGACATGCAGTGATTTGAATGAGTGCCTA
GACGCAAAACTGAACAAATGCTCCGGTGTTGGAGGGCTATGTACAAACACAGTGGGGTTCGTACACTTGCGGCTGC
TCGGAAGGGTACTCTGGAGACGGTTACGAATGTACGGACGTTGACGAATGCCTGACGGGGAAGCACAAC TCGGT
CCTCATTCCACTTGC GTGAACACCGACGGCAGCTTTAAGTGCTCGTGCAACGAAGGGTTTTCTGGTGATGGAATC
ACGTGCGAGGATATTGACGAGTGC GCGGACGACAGCCTCAACACGTGCGACACTCACAAGGGCGTGTGCAAGAAC
ACCGCCGGCTCTTACTCTTGCGGGTGCAAGCCCGGCTTTGACCTGTCTTCAGACGGGTT CATGTGCAAAACGTG
ACGAGTGTGCCCGCGTACTGCAAAGTGCGATGAAAAGAGTTTCTGTGTTGACAGCCAGGGATCGTACACGTGCG
AGTGCAAAAAATGGGTACAGGCAGTCGGGCGATGGCTGCGTTGACGTGGACGAATGTGACAGTGGGTGGATGATT
GTCACGAACACGCTGTCTGCAAGAACACTGACGGCAGTTTCAACGTGCGAGTGTGCTGAAGGCTACCAAGGGGACG
GCGAGGATGTGCGAGAAGACCGTTGGACCATGTGACTCAAACCCATGCGGGGACAAAGCGGATTGCAAGTGCTTG
GCAACAGCTATACTTGACCTGCCACAAAGGCTATGAGATGGCAGACGGACGATGCGCGGACATTGACGAATGCA
CTGCGGGAACGCACAAC TGCAGCGCATGCAGTGTGCACAAACACTTCGGGTTTCGTATACCTGCACTTGTGGCA
AAGGTTATACGGGGTTTGGCGAGTCATGCCAGGACGTCGACGAGTGCCTCGGGAACGTTGCAGGTTGCGACATAC
ATGCAGTATGTACTAACCTGCCCGGCTCTTTCAGTTGTGCTTGCAAGTCGGGTTTTGAAGGCAACGGCTATGAAT
GCGTGGAGAAGCCCGTTGTGCCAGGTCAGATCTTTTGCAGTCTGTGGACTGCTTGTC

EbMIC4_RT-PCR 5-1 (1100 bp)

Nukleotidsequenz

GTCTGTAAGTGCGCAGCAGGTTATCAGGGAGATGGAAGTGCTTGCAGTGACATCGATGAGTGCGCGACTAATGCA
CACAAC TGCCATCCTTCGGCCACGTGCACGAACACAGCTGGAAGCTACCGCTGTACTTGCAATAATGGCTTTTCT
GGCGACGGCGTTGAGTGTGTGGACATTGACGAGTGTCCACAAATGCTGACGACTGCGGAAACAACACTGAATGC
TCAAACACAATTGGCAGCTTTGAGTGCGTTTGCCGAAC TGGGTATTCAAGACAGGATGCAAAGAACTGCGTCGAT
ATTGACGAGTGTCTGACGGTACCCACACCTGTTCTTCCTTCGCCACCTGCAGCAACACCGACGGATCTTACAGG
TGCCAGTGTAAGCTGGTTACGAAGGCGACGGCCATAAATGTGAAGACATCGATTTCTGCGGTGACGGGAGACAC

GACTGCAACGTCAAAGCCGAGTGCGCTGAGAGCGCTGACAACTCGACGTTCAAATGCACTTGTGCTCCAGGCTAC
 ACTGGCGATGGGCACGGCCCCGAGGGGTGCAAGGACATTGATGAGTGTGCGGGGGTAATGTATGCGGAGAGAAC
 ACAATTTGACTAACACTTCTGGAAGCTTTGAGTGTGCGTGCAAAGACGGCTTTGCAGGGTCTAAAGAAGGGGAC
 GAGCTGACATGTGTGGATGTTGACGAGTGCGGTGACACTTCTCGAAATACCTGTGCATCCGCAGCGGACGGCGGT
 TCTTGCGAGAATACAGTCGGAAGCTATAAGTGTTCTGTCCTTCTAGGTTATGAGGGAGACGGTCATAACTGCACG
 GATATCGACGAGTGCGCCACTAAATCGCCGTGTGGCGACAACACTCGCTGTGAAAATACACCAGGGTCATTTCGTG
 TGCTCTTGATGGATGGATATGAACGTGAAACCGAGCTTTCATGACAGAGACATCGATGAGTGCAGAGCAACACC
 TGTATGGTGCCCGCACACGGCATTGCGAGAATACTGATGGGAGCTGCACCTTCCACTGTGCCCTGGCTATCGC
 CACGTCGAAGGCAGCTGCGTGAAGATTGACCACTGCAAGGAGACGAAGTG

EbMIC4_RT-PCR 6-3 (1886 bp)

Nukleotidsequenz

TGCAGCAACGATACTGGTCTTCAAGAAAGGCACAATACAAAGTGCAGAGACGTGGGTTGAAGTCAAGAGTGCAAG
 AAAAAATCAGAATGTGGAGAGTTTTCGCCGTGGACGCCTGGGAAGGCAGCCTGTGTCAACGGCCAGGTCCAGACG
 CGTGTTAGGGATTCTGCCCTGAAGTTCAGGAAATAAAAAATTTGCAAGCCACCTCCACCGCAGTGCATGGATGAC
 TGGACGGATTGGACAAAATTGTCAGGGTACAAAGACTCAAGAAAGGCACAATGCGAGTTGCCTGCAGACAGAAGTC
 CGCGAGTGCAACCTGACTGCAGAGGAAGTCGAGAAATGCGGCCCTTCACGGAGTGGGCTCCGCCACTAACGGAA
 AACTGCATTCCAGGGGACGAGCACAGGCGGTGGCGTGTAAGCTGTCTGACAGGAAGGAAGTTTCAATATGCGGA
 GCGTTTGAGTGTAATCAGTGCTCCAGCAATGCAACATGCGATTTTCATTGCTGGACAATGCACCTGCAAGCCGGGC
 TTTAGGGGCGACGGCAAGACATGCGAGGCATTTCGATCCCTGTTCCGAGACCCAGCTCCCTGTGATACAAACGCC
 ACCTGCGCCCGCGATGGAAGCTTTCCCAAGTGCAAGTGTAAGAGCGGGTGAACGCAGATGACAAGGCAGGCGCT
 AGCAACTATCCTTGCGTGAGCTGGATGAATGTGCTGCCAATACTCATAAATGTCCAGCCATTTCAGACTGCCAA
 AACACCCCGGGATCGTACATGTGCAATTGTGCAACGGATGGCAGAAGACAAGTGACAGAAGTTGCGAAGACGTC
 GATGAGTGCGCTCGGGGAGACCAGGGGTGCTGCAAACCTCACATGTGTCAACACTGTGGGAAGCTTTGAATGC
 CAGTGCAACGAAGGGTATCGAGGAGGCGGTACGGACGAAAGTCCTTGATGAATGTGAACGAGTGCGAGAACCCG
 AACGCGTGTTCTGCGCATGCCACTTGACGGACTCACCCGGGTCATACACCTGCAGCTGTCCAGAAGGGTACAGC
 GGAGAGGGTACTCACAGTCTCCTTGCTCGAAAATTGACTACTGCGCTAACTCGGCCCTCAACAACTGCGGAGTA
 CACTCCAAATGCGTCAACACGCTCACGACTTTCAAGTGCGTATGCGATGCTGGATATGCGGGGTTGGGCACGCAT
 GAAAAACCTTGTTGTGGATATTGACGAGTGCTCTTCTGATAGACCGGCGAATGACTGCCATCGCGACGCAGAGTGC
 ACAAACTGATGGGTCGTACACCTGCAAGTGCAAACCTGGATTTACTGGGGATGGAGTGGTGCTGGTGGGTGC
 ACTGATGTGATGAGTGTGCTCAATCCCCATGCCACGCAAAGGCTACGTGTACCAATACGAAGGGCTCATACACT
 TGCACATGCATCGAGGGGTATGTAGATGCGTCAAATGATGGACGCGAATGTGCGGATGTTGACGAGTGTGAGAAC
 GGACTTGCAGTATGTCACGCTTCGGCACAGTGCCTCAACACCGTGGGCAGCTACGAGTGTAAAGTGTGGACGGT
 TTCGTGGGAGATGGGAAGGTTTGCAACGATGTGACGAATGCTCTGCGAATGAATCCCCGTGCGGGCTGAACGCC
 GAATGCCATAACACAATCGGCAGTTATGAGTGCCTGCAAGGACGGATATGGAGGCCTAGACAGCAATAAAAGC
 TGCTCTGACGTCAATGAGTGCCTGACCCCGGTTTGAAGGTTCTGAAAACCTGTCAATGCGCGAACACTGAGGGT
 AGCTACAAATGGGAACCTAAATTAGGCTATGAGCTGGTGGGCAACTCGGAGTGCCGCAAGATTGACCACTGCAAG
 GAGACGAAGTG

EbMIC4_RT-PCR 8-3 (2135 bp)

Nukleotidsequenz

GACGTCTCTTGTCACGGCACGTGGACACCGTGGACCGCCTGCAGCAACGATACTGGTCTTCAAGAAAGGCACAAT
 ACAAAGTGCAGAGACGTGGGTTGAAGTGCAAGAGTGCAAGAAAAAATCAGAATGTGGAGAGTTTTCGCCGTGGACG
 CCTGGGAAGGCAGCCTGTGTCAACGGCCAGGTCCAGACGCGTGTTAGGGATTCTGCCCTGAAGTTCAGGAAATA
 AAAATTTGCAAGCCACCTCCACCGCAGTGCATGGATGACTGGACGGATTGGACAAATTGTGAGGGTACAAAGACT
 CAAGAAAGGCACAATGCGAGTTGCCTGCAGACAGAAGTCCGCGAGTGCAACCTGACTGCAGAGGAAGTCGAGAAA
 TGCGGCCCTTCACGGAGTGGGTCCGCCACTAACGGAAAACCTGCATTCCAGGGGACGAGCACAGGCGGTGGCGT
 GTAAGCTGTCTGACAGGAAGGAAGTTCAATATGCGGAGCGTTTGAGTGTAAATCAGTGCTCCAGCAATGCAACA
 TGCGATTTTCATTGCTGGACAATGCACCTGCAAGCCGGGCTTTAGGGGCGACGGCAAGACATGCGAGGCATTTCAT

CCCTGTTCCGAGACCCCAGCTCCCTGTGATACAAACGCCACCTGCGCCGCCGATGGAAGCACTCCCAAGTGCAAG
TGTAAGAGCGGGTGGAAACGCAGATGACAAGGCAGGCGCTAGCAACTATCCTTGCCTGGAGCTGGATGAATGTGCT
GCCAACTACTATAAATGTCCAGCCCACTCAGACTGCCAAAACACCCCGGGATCGTACATGTGCAATTGTGCAAC
GGATGGCAGAAGACAAGTGACAGAAGTTGCGAAGACGTGATGAGTGCCTCGGGGAGACCACGGGTGTCCTGCA
AACTCCACATGTGTCAACACTGTGGGAAGCTTTGAATGCCAGTGCAACGAAGGGTATCGAGGAGGCGGTACGGAC
GAAAGTCCTTGTATGAATGTGAACGAGTGCGAGAACCCGAACGCGTGTCTGCGCATGCCACTTGCACGGACTCA
CCCGGGTCATACACCTGCAGCTGTCCAGAAGGTACAGCGGAGAGGGTACTCACAAGTCTCCTTGCTCGAAAATT
GACTACTGCGCTAACTCGGCCCTCAACAACCTGCGGAGTACACTCCAAATGCGTCAACACGCTCACGACTTTCAAG
TGCGTATGCGATGCTGGATATGCGGGGTTGGGCACGCATGAAAACCTTGTGTGGATATTGACGAGTGCTCTTCT
GATAGACCGGCGAATGACTGCCATCGCGACGCAGAGTGACAAAACACTGATGGGTCTGACACCTGCAAGTGCAAA
CCTGGATTTACTGGGGATGGAGTCGGTGCTGGTGGGTGCACTGATGTCGATGAGTGTGCTCAATCCCCATGCCAC
GCAAAGGCTACGTGTACCAATACGAAGGGCTCATACACTTGCACATGCATCGAGGGGTATGTAGATGCGTCAAAT
GATGGACGCGAATGTCGCGATGTTGACGAGTGTGAGAACGGACTTGCAAGTATGTCACGCTTCGGCACAGTGCCTC
AACACCGTGGGCAGCTACGAGTGTAAAGTGCTTGGACGATTTCTGTTGGAGATGGGAAGGTTTGAACGATGTCGAC
GAATGCTCTGCGAATGAATCCCCGTGCGGGCTGAACGCCGAATGCCATAACACAATCGGCAGTTATGAGTGCAGC
TGCAAGGACGGATATGGAGGCCTAGACAGCAATAAAAGCTGCTCTGACGTCAATGAGTGCCTGACCCCGGTTTG
AAGGTTCTGAAAACGTCAATGCGCGAACACTGAGGGTAGCTACAAATGGGAACCTAAATTAGGCTATGAGCTG
GTGGGCAACTCGGAGTGCCGCAAGATTGACTACTGCTCACTCGGCCCTTGCAACAGTCTTGACAGCTGTAAAGAG
AACCTTGAGGGCACCAAAGCGATATGCACGTGCAAAGTGGGCTATGCTGGAGACGGCTCAGCGGGGAGTGTGTGC
GCCGACATCAACGAATGTGAAGGGAACAATACTTGTGCAGCACCGGGGACGGCGGTATCTGCGAGAACACAGTG
GGATCTTACGTCTGTAAGTGCGCAGCAGGTTATCAG

2. Zusammengesetzte kodierende Sequenz (5484 bp)

Nukleotidsequenz

GACGTCTCTTGTACGGCACGTGGACACCGTGGACCGCTGCAGCAACGATACTGGTCTTCAAGAAAGGCACAAT
ACAAAGTGCAGACGTGGGTTGAAGTGCAAGAGTGCAAGAAAAATCAGAATGTGGAGAGTTTTGCGCGTGGACG
CCTGGGAAGGCAGCCTGTGTCAACGGCCAGGTCCAGACGCGTGTAGGGATTCTGCCCTGAAGTTCAGGAAATA
AAAAATTTGCAAGCCACCTCCACCGCAGTGATGGATGACTGGACGGATTGGACAAATTGTCAGGGTACAAAGACT
CAAGAAAGGCACAATGCGAGTTGCCGTGCAGACAGAAGTCCGCGAGTGCAACCTGACTGCAGAGGAAGTCGAGAAA
TGCGGCCCTTACGGAGTGGGCTCCGCCACTAACGGAAAACCTGCATTCCAGGGGACGAGCACAGGCGGTGGCGT
GTAAGCTGTCTGACAGGAAGGAAGTTCGAATATGCGGAGCGTTTGAGTGTAAATCAGTGTCTCCAGCAATGCAACA
TGCGATTTTATTGCTGGACAATGCACCTGCAAGCCGGGCTTTAGGGGCGACGGCAAGACATGCGAGGCATTGAT
CCCTGTTCCGAGACCCAGCTCCCTGTGATACAAACGCCACCTGCGCCGCCGATGGAAGCACTCCCAAGTGCAAG
TGTAAGAGCGGGTGGAAACGCAGATGACAAGGCAGGCGCTAGCAACTATCCTTGCCTGGAGCTGGATGAATGTGCT
GCCAACTACTATAAATGTCCAGCCCACTCAGACTGCCAAAACACCCCGGGATCGTACATGTGCAATTGTGCAAC
GGATGGCAGAAGACAAGTGACAGAAGTTGCGAAGACGTGATGAGTGCCTCGGGGAGACCACGGGTGTCCTGCA
AACTCCACATGTGTCAACACTGTGGGAAGCTTTGAATGCCAGTGCAACGAAGGGTATCGAGGAGGCGGTACGGAC
GAAAGTCCTTGTATGAATGTGAACGAGTGCGAGAACCCGAACGCGTGTCTGCGCATGCCACTTGCACGGACTCA
CCCGGGTCATACACCTGCAGCTGTCCAGAAGGTACAGCGGAGAGGGTACTCACAAGTCTCCTTGCTCGAAAATT
GACTACTGCGCTAACTCGGCCCTCAACAACCTGCGGAGTACACTCCAAATGCGTCAACACGCTCACGACTTTCAAG
TGCGTATGCGATGCTGGATATGCGGGGTTGGGCACGCATGAAAACCTTGTGTGGATATTGACGAGTGCTCTTCT
GATAGACCGGCGAATGACTGCCATCGCGACGCAGAGTGACAAAACACTGATGGGTCTGACACCTGCAAGTGCAAA
CCTGGATTTACTGGGGATGGAGTCGGTGCTGGTGGGTGCACTGATGTCGATGAGTGTGCTCAATCCCCATGCCAC
GCAAAGGCTACGTGTACCAATACGAAGGGCTCATACACTTGCACATGCATCGAGGGGTATGTAGATGCGTCAAAT
GATGGACGCGAATGTCGCGATGTTGACGAGTGTGAGAACGGACTTGCAAGTATGTCACGCTTCGGCACAGTGCCTC
AACACCGTGGGCAGCTACGAGTGTAAAGTGCTTGGACGATTTCTGTTGGAGATGGGAAGGTTTGAACGATGTCGAC
GAATGCTCTGCGAATGAATCCCCGTGCGGGCTGAACGCCGAATGCCATAACACAATCGGCAGTTATGAGTGCAGC
TGCAAGGACGGATATGGAGGCCTAGACAGCAATAAAAGCTGCTCTGACGTCAATGAGTGCCTGACCCCGGTTTG
AAGGTTCTGAAAACGTCAATGCGCGAACACTGAGGGTAGCTACAAATGGGAACCTAAATTAGGCTATGAGCTG
GTGGGCAACTCGGAGTGCCGCAAGATTGACTACTGCTCACTCGGCCCTTGCAACAGTCTTGACAGCTGTAAAGAG
AACCTTGAGGGCACCAAAGCGATATGCACGTGCAAAGTGGGCTATGCTGGAGACGGCTCAGCGGGGAGTGTGTGC
GCCGACATCAACGAATGTGAAGGGAACAATACTTGTGCAGCACCGGGGACGGCGGTATCTGCGAGAACACAGTG
GGATCTTACGTCTGTAAGTGCGCAGCAGGTTATCAGGGAGATGGAAGTGCTTGCAGTGACATCGATGAGTGCAGC
ACTAATGCACACAACCTGCCATCCTTCGGCCACGTGCACGAACACAGCTGGAAGCTACCGCTGTACTTGCAATAAT
GGCTTTTCTGGCGACGGCGTTGAGTGTGTGGACATTGACGAGTGCTCCACAAATGCTGACGACTGCGGAAACAAC

ACTGAATGCTCAAACACAATTGGCAGCTTTGAGTGCCTTTGCCGAAGTGGGTATTCAAGACAGGATGCAAAGAAC
 TGCCTCGATATTGACGAGTGTCTGACGGTACCCACACCTGTTCTTCCTTCGCCACCTGCAGCAACACCGACGGA
 TCTTACAGGTGCCAGTGTAAGCTGGTTACGAAGGCGACGGCCATAAATGTGAAGACATCGATTTCTGCGGTGAC
 GGGAGACACGACTGCAACGTCAAAGCCGAGTGCCTGAGAGCGCTGACAACTCGACGTTCAAATGCACTTGTGCT
 CCAGGCTACACTGGCGATGGGCACGGCCCCGAGGGGTGCAAGGACATTGATGAGTGTGCGGGGGTAATGTATGC
 GGAGAGAACACAATTTGCACTAACACTTCTGGAAGCTTTGAGTGTGCGTGCAAAGACGGCTTTGCAGGGTCTAAA
 GAAGGGGACGAGCTGACATGTGTGGATGTTGACGAGTGCCTGACACTTCTCGAAATACCTGTGCATCCGCAGCG
 GACGGCGGTTCTTGCGAGAATACAGTCGGAAGCTATAAGTGTTCTGTCCTTAGGTTATGAGGGAGACGGTCAT
 AACTGCACGGATATCGACGAGTGCGCCACTAAATCGCCGTGTGGCGACAACACTCGCTGTGAAAATACACCAGGG
 TCATTCGTGTGCTCTTGATGGATGGATATGAACGTGAAACCGAGCTTTCATGCAGAGACATCGATGAGTGCAG
 AACACACCTGTATGGTGCCCGCACACGGCATTTCGAGAATACTGATGGGAGCTGCACTTTCCTACTGTGCCCT
 GGCTATCGCCACGTGCAAGGCGAGTGCCTGAAGATTGACCACTGCAAGGAGACGAAGTGGATTGACCACTGCAAG
 GAGACGAAGTGTATCGTTCATGCGACGTGCCACGAGAACGACCCGGAAGTGGAGGCTGCACTTGTGGAAGC
 GGATACGAAGGCAACGGCAAGGGCGAGGATGGGTGTAAGAACATCGACGAATGCGTTGCTGGCAATCCATGTGAA
 TCGTTTGGCGCTGGCGGCTATTGCGAGGATACCGAAGGGTCTTTTGTGAGTGCAAACCGGTTTTGTCAA
 CTGCATTCGACATGCAGTGATTTGAATGAGTGCCTACACGCAAACTGAACAAATGCTCCGGTGTGGAGGGCTA
 TGTACAAACACAGTGGGGTGTACACTTGGCGCTGCTCGGAAGGGTACTCTGGAGACGGTTACGAATGTACGGAC
 GTTGACGAATGCCTGACGGGGAAGCACAACCTGCGGTCTCATTCCACTTGCCTGAACACCGACGGCAGCTTTAAG
 TGCTCGTGCAACGAAGGGTTTTCTGGTGATGGAATCACGTGCGAGGATATTGACGAGTGCCTGGACGACAGCCTC
 AACACGTGCGACACTCACAAGGGCGTGTGCAAGAACCCGCGGCTCTTACTCTTGGGGTGCAAGCCCGGCTTT
 GACCTGTCTTCAGACGGGTTACGTGCGAAAACGTGACGAGTGTGCCGCCGGTACTGCAAAGTGCATGAAAAG
 AGTTTCTGTGTTGACAGCCAGGGATCGTACACGTGCGAGTGCAAAAATGGGTACAGGCAGTGGGGCGATGGCTGC
 GTTGACGTGGACGAATGTGACAGTGGGGTGGATGATTGTCACGAACACGCTGTCTGCAAGAACACTGACGGCAGT
 TTCACGTGCGAGTGTGCTGAAGGCTACCAAGGGGACGGCAGGATGTGCGAGAAGACCGTTGGACCATGTGACTCA
 AACCCATGCGGGGACAAAGCGGATTGCGAAGTGCTTGGCAACAGCTATACTTGCACCGGCCACAAAGGCTATGAG
 ATGGCAGACGGACGATGCGCGGACATTGACGAATGCACTGCGGGAACGCACAACCTGCGACGCGCATGCAGTGTGC
 ACAAACTTTCGGGTTCTGATACCTGCACTTGTGGCAAAGTTATACGGGGTTTGGCGAGTATGCCAGGACGTC
 GACGAGTGCCTCGGGAACGCTGCAGTTGCGACATACATGCAGTATGTACTAACCTGCCCGGCTCTTTCAGTTGT
 GCTTGCAAGTGGGTTTTGAAGGCAACGGCTATGAATGCGTGGAGAAGCCGTTGTGCCAGGTGAGATCTTTTGC
 GAGTGTGACTGCTTGGTGAAGTGTGACGGGACCAACAGAAAGCAAAAGACATTGTATCGTTCTGTGCGACC
 AAAACGGAGACACGCGAATGCCAGGGGAAGGAGAAGACTGACTGCGGGGAATTTGGAGAATGGTCATATGCCCG
 GGCTCGGTCAACAACATGTCTCACCGTCAAGGGGAGAGGTTTGGAGAGGACGGCTGCGAAAATGCAGAATTAGTG
 CGCGAGTGGCCAGATGCTGAGATGGAGGAGGAATGTGGGATTTCCGGCAACTGGAGCGATTGCGGAGTTCCATCG
 GCGGGCTGCGGTCAAGGGCGAGGGATCGCTGCCCTGATCAGGTGGAGTTTGGAGAGTGTCTACCGAAGGCGGG
 GGTGCGCAGCTTGGAGGGCTGGCGTCAAGGACCTACTGGTGAGTCTGCAAAACCAGGAGCGCTGGGGTTGGG
 GGTGAGCAAGCAGAAGCACCAGGTGTGAAGGTGAGGAGCCAGCGGGACCTGAGAAACAGCCTGAGCACCCCGAA
 GGACCTGGTGGTGCAGTGAACGCCAGAGGACCGGGGCCACGCCGAGCACCCGAGGGACCTGGGGTGGAG
 ACTGAGGAGCCCGAGGAACCTGGTAGTGAAGGTGCACAGCCTCAAGCACCTGGTGCTGAAGAGGCAGGTACACCT
 GGTGCTGGGGCTGAGCTACCGAAAGGTCTGGTGAAGCCGAAGCTGAGTGGGAAGAGAAGGAGGAGGGCGCTGGG
 TTTCTGTGGCGGGGTTGCTGGTGGCGTGGGTGGTCTCTTCTCATTGCCGCTATGGGAGGCGGCTATGCTGCG
 TATTCTCGTGGAGGCGAGGGTGGACCGATGAAGCGGAACAAGTCATGTTGAAGGCGGCGAGGTATCCGGAGCT
 GGAGCTGAGGCGCAGGAAGGGGACACTGTTATTGACATCACTGAAGAGGATGACTATTGGGCAGATAGTCTAAAA
 CTCATTGCA

Aminosäuresequenz (Forward Frame 1)

1 DVSCHGTWTPWTACSNDTGLQERHNTKCETWVEVQECKKKSECGEFSPWTPGKAACVNGQ
 61 VQTRVRDSCPEVQEIKICKPPPPQCMDWDWTNQCQGTQKQERHNASCLQTEVRECNLTA
 121 EEVEKCGPFTEWAPLTENCIPGDEHRRWRVSCPDRKEVRICGAFECNQCSSNATCDFIA
 181 GQCTCKPGFRGDGKTCEAFDPCSETPAPCDTNATCAADGSTPKCKCKSGWNADDKAGASN
 241 YPCVELDECAANTHKCPAHSDCQNTPGSYMNCNRNGWQKTSRSCEDVDECARGDHGCPA
 301 NSTCVNTVGSFECQCNENYRGGTDESPCMNVNECENPNACSAHATCTDSPGSYTCSCPE
 361 GYSGEGTHKSPCSKIDYCANSALNCGVHSCVNTLTTFKCVCDAGYAGLGTHENPCVDI
 421 DECSSDRPANDCHRAECTNTDGSYTCCKPGFTGDGVGAGGCTDVDECAQSPCHAKATC
 481 TNTKGSYTCCTIEGYVDASNDGRECRDVDECENGLAVCHASAQCLNTVGSYECKCLDDFV
 541 GDGKVCNDVDECSANESPCGLNAECHNTIGSYEACKDGYGGGLDSNKSCSDVNECADPGL
 601 KVPENCQCANTEGSYKWEPLGYELVGNSECRKIDYCSLGPCNSLADCKENPEGTKAICT
 661 CKVGYAGDGSAGSVCADINECEGNNTCAAPGDGGICENTVGSYVCKCAAGYQGDGSACSD
 721 IDECATNAHNCHPSATCTNTAGSYRCTNNGFSGDGVECDIDECSNADDGNNTECSN
 781 TIGSFECVCRGTGYSRQDAKNCVDIDECSDGHTCSSFATCSNTDGSYRCQCKAGYEGDGH

```

841 KCEDIDFCGDRHDCNVKAESAESADNSTFKCTCAPGYTGDGHGPEGCKDIDECAGGNVC
901 GENTICTNTSGSFECACKDGFAGSKEGDELTCVDVDECGDTSRNTCASAADGGSCENTVG
961 SYKCSCLLGYEGDGHNCTDIDECATKSPCGDNTRCENTPGSFVCSMDGYERETELSCRD
1021 IDECENNTCMVPAHGICENTDGSCTFHCAPGYRHVEGSCVKIDHCKETKWIDHCKETKCI
1081 VHATCHENDAGTEAICTCGSGYEGNGKGEDGCKNIDECVAGNPCESEFGAGGYCEDTEGSF
1141 VCECKTGFKLHSTCSDLNECLHAKLNKCSGVGGLCTNTVGSYTCGCSEGYSGDGYECTD
1201 VDECLTGKHNCGPHSTCVNTDGSFKCSCNEGFSGDGITCEDIDECADDSLNTCDTHKGVC
1261 KNTAGSYSCGCKPGFDLSSDGTFCENVDECAAGTAKCDEKSFCVDSQGSYTCECKNGYRQ
1321 SGDGCVDVDECDSGVDDCHEHAVCKNTDGSFTCECAEGYQGDGRMCEKTVGPCDSNPCGD
1381 KADCEVLGNSYTCTGHKGYEMADGRCADIDECTAGTHNCDAHAVCTNTSGSYTCTCGKGY
1441 TGFGESQDVDECVGNAAGCDIHAVCTNLPGSFSCACKSGFEGNGYECVEKPVVPGQIFC
1501 ESWTAWSKCDGTTTESKRHCIVLSTKTETRECPGKEKTDCEGFEWSSCPGSVNMSHRQ
1561 RERFGEAGCENALVRECPDAEMEEECGDFGNWSDCGVPSAGLRSRARDRCPDQVEFEEC
1621 STEGGGAQLGGPGVEGPTGESAKPGAPGVGGEQAEAPGVEGEEPAGPEKQPEHPEGPGGA
1681 AELPEAPGPTPEHPEGPGVETEEPEEPGSEGAQPQAPGAEAGTPGAGAEALPKGPGEAEA
1741 ESEEKEEGAGFPVAAVAGGVGGLLLIAAMGGGYAAYSRRGEGATDEAEQVMFEGGEVSGA
1801 GAEAQEGDVIDITEEDDYWADSGDIQ

```

Zu 3.4 Teilsequenz von Ebhsp70

Identifizierte Teilsequenz von Ebhsp70 (1219 bp, Klon 22 ebhsp70 vom 22.08.05)

```

1 GTGTGTGTGGCGCGTTTCGATGTGTCTTTGTTGACTATTGAAGACGGTATTTTTGAGGTGA
61 AGGCTACGGCTGGTGACACCCACTTGGGAGGGGAGGACTTTGACAACCGCTTGGTAGATT
121 TCTGCGTGCAAGACTTCAAGAGGAAGAACCGCAGCAAAGACCCAGCAGCAACAGCAGGG
181 CTTTGCGTCTGCTGCGTACTCAGTGCGAGCGCGCAAACGGACGCTTTCCAGCAGCACTC
241 AAGCGACCATTGAGATTGACTCGCTTTTCGAGGGTATCGATTACTCAGTTTCTCTGTCTC
301 GTGCTAGGTTTCAAGAGCTTTGCATGGATTATTTCCGCAACTCTCTGGTGCCTGTGGAGA
361 AGGTGCTTAAGGATTCTGGAATTGACAAGCGCAGCGTGCATGAGGTGGTTCTTGTCGGTG
421 GTTCAACTCGTATTCCCAAAATTCAACAGCTTATCCAAGAGTTTTTAAACGGAAAAGAGC
481 CTTGCCGCTCTATCAATCCCGATGAGGCTGCGGCGTATGGCGCCGCTGTACAGGCTGCTA
541 TTTTGAAGGGTGTGAACAGTTCTCAGGTACAGGACCTACTGCTGTTGGACGTTGCGCCTC
601 TCTCTCTTGGTCTGGAAACTGCGGGCGGTGTCATGACAAAGCTCATTGAACGCAACACCA
661 CTATCCCCACGAAGAAATCTCAAATCTTTACTACCTACGCAGACAATCAGCCCGGTGTAT
721 TGATTCAAGTGTTTGAGGGGGAGCGTGCCATGACGAAAGACAACAACCTTGTGGGTAAAGT
781 TCCACCTTGACGGCATTCCACCAGCGCTCGGGGGTCCCGCAGATTGAAGTAACATTTG
841 ACATCGACGCAAATGGTATCATGAACGTACCGCCACAGAGAAGAACACCGGAAAGTCTA
901 ACCAAATCACCATTACAAACGATAAGGGAGCTCTCAGCCAAAATGAAATTGACCGATGG
961 TTGCTGAAGCGGAGAAGTACAAGGCTGAGGATGAGGCTAACAAGCAGCGCTCGAGGCTA
1021 GAAACGCTTTGGAGAATTACTGCTACTCTATGCGCAGCACGATGGAAGACGAGAAGATCAA
1081 GGATAAAATTTCCGCAGAGGACAGGGAGGCTGCCACGTCAGCAATCCAGAAGGCTCTTGA
1141 CTGGTTGGATAAGAATCAGCTAGCCGAGAAGGAGGAATTCGAAGCGAAGCAGAAGGAGGT
1201 CGAAAGCACCACACACACA

```

Zu 3.8.2 Teilsequenz von Ebdolase

Ebdolase-Teilsequenz 1: (pDrive, 1046 bp)

Amplifikation mit degenerierten Primern

```

TTCGAGGAGACTTTTTCCAGAAGTCTCTGAGGGCGTTCCTATGGTTGAGTTATTGAGGAAAGAGAACATTATT
CCTGGTATTAAAGTGGACAAGGGGCTAGAGCATATCCCGGCACAGACGGAGAACAGGCCACCATGGGGTTGGAT
GGTTTGGGCGAGCGCTGCCGCAAGTATTATGAAGCCGGCGCGCTTCGCTAAGTGGCGGGCCGTGTTGCAATA
GACGAAGCGAAGGGAAAGCCCTCGAATCAGTCCATTGCCGAAATTTCTTACGGATTAGCGCGCTACGCTGCGATC

```

TGCCAACAAAATAAACTCGTGCCCATTGTAGAGCCCCGAAATCCTTACCGACGGCCACCATGATATTCGGTACTGCGCACAAAGTTACTGAGCGCGTGCTGGCTGCTGTCTTCAAAGAGCTTAACAATCAAAAAGTGCTTCTCGAGGGCGCGTTGCTGAAACCCAACATGGTAACTCCTGGCGCGCAGGGCCCTAAAGCAAGCCCCAGGAAATTGCCTTCTTCACAGTAAGGGCTCTGTCTCGCACCCGTGCCACCCGCTCTCCCCGGCGTGATGTTCCCTTCGGGTGGTCAGACCGAGGAGGATGCAATCACGAATTCTGGATCCGATACGTAAACGCGTCTGCAGCATGCGTGGTACCGAGCTTTCCTATAGTGAGTCGTATTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT GCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCACGCGCGGGAGAG GCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTCGCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGTCGCTGCGCGAGCGTATCAG CTCACTCAAGCGTATACGTTATCCAAAGAATCAGGGATACGCAGAAAGAAACATGTGGGCCAAGCCAGCCAG

Ebdolase-Teilsequenz 2: (pDrive, 1046 bp) verlängerte Teilsequenz 1

Amplifikation mit degenerierten Primern und „GenomeWalking“

GCTGCTGCAATCAATTNTTWTCTGTCTAATTGTTtGCTGAAGATAAGCAAAAAGCCATTCTTTATACCTTCTT TATCCGCAACATTAGAATGGACTGAGGCACGTTGCTCTGGCAACCGGAATTTGCAACGCGTGCTTCTGATGTAG GACCTCTTTGAACAATAAACCGTTAAATATGAAAAAGTTGAAATGGCCTTACGGCGTATCGCTCGATCATGGTA AGCAAGGAAGGTGCGTCAATCTAATCATAATCTAAAATAAACTGCGCGTGCTTTTTTCTTGTGTCATCAAGTTTC TTCTCCGTTACACAGTAACAAGAAAAATAATGTATACCCGTCGTCGGCCTATTGGCGGCAAGAAACAAAAATATGC ATTTTCTTTGTTGTGGCCAGTCAGCACCAACAAGCCGTCAGGGCGACTGGTACATTTTAGGCATAAATTTAATT AATGAGGGGCAACACAGGCCCTTTATTATATATACTTCTCCCTTTTTTCCATCCTTTTTTAAATAAATGTATTTT TTTTCAAAAAGAGAAGCCGCTGCGCTCGGCGCCTCCTGCTCCGCCCTCATACCTGCCAGCTGCGCCTGGCTGTTA GCCCTCGCTCTCTCCAGCAGCGTGGCCTGCGCCTTTGCTTTGTTTTCCGCTTTCCCCGCCAGTGCTTAAGACAG GAGGCTTGCAGCGCCCTGCCATAAGAGAAGGAAAGCCTCCAGGGATGAGGACCCACTCTATTCATGGCGTCTAGG TTCAAACCTCGCCTCCTCTTCAGACTGACCACCCGAAAGGAACATCACGCCGGGAGAGCGGGTGGCACGGTGCGA GACAGAGCCCTTACTGTGAAGAAGGCAATTTCTGGGGGCTTGCTTTAGGGCCCTGCGCGCCAGGAGTTACCATG TTGGGTTTCAGCAACGCGCCCTCGAGAAGCACTTTTTGATTGTTAAGCTCTTTGAAGACAGCAGCCAGCACGCGC TCAGTAACCTTGTGCGCAGTACCGAATATCATGGTGCCGTCGGTAAGGATTTTCGGGCTCTACAATGGGCACGAGT TTATTTTGTGGCAGATCGCAGCGTAGCGCGCTAATCCGTAAGAAATTTTCGGCAATGGACTGATTCGAGGGCTTT CCCTTCGCTTCGCTATTTTGCAACACGCGCCGCCACTTAGCGAAACGCGCGCCGGCTTCATAATACTTGCGGCAG CGCTCGCCCAACCATCCAACCCCATGGTGCCCTGTTCTCCGTCGTGCGGGGATATGCTCTAGCCCCTTGTC ACTTTAATAACAGGAATAATGTTCTCTTTCTCAATAACTCAACCATAGGAACGCCCTCAGGAGACTTCTGGTAC AAAGTCTCTTCAAACAACATCGCGCCGCTGCAATACTCGCCCAACCCCTTTGTGCTAAACAACAGCCCGCGGTAA AACGCCCGGTTTGCTCCGTATTCTCCACGCTGATGGAGGAGAAACGCTTTGCGATTGTTCTACAGGCGAAGTC ACGCATCAAATACAGCCGAGTACAAAAATAAAGAATAAATGAAAACGAAATTTGGAAAAATAAGACGAAAAGGT CGCGTAGACATGCACAATACAGAAATCATTCTCTCAAGCCTAAAAGGCGCACTTTGCACAAACGCATCGCAAAC CTGATAAACTCCTTTTTTTTCTTTTTCTCAAAAAGCTTTATTTCATAGCATAAAGAATTCGACTCACCGGTAGAT TCGTCAGCCGCAAGAAGACCTTCCCTGGCGCTGCTAAAGCTTTAGCGGTGGCCGCCAACTCCTTGCGCACTTCC TGCGGTAACCTCTGCTGCAAAACAAATTGAAGGAAAACGAGAAGCAATTAATAAACTCTTCTGGCCATGCGCATGC CACCGTCTGATAAAAAAGCCAGCGAGACAGAGTGAAAAGTCGCATACTCCACAAAAAAGAAAAAATTCAGGCATT GGAACAACCCATAAATATTTGAAAATTGATTTCGTAAAGTTTGAAAGCTTTCCTTCTGCGCATCTGTGGCACTT AAACCTTCGGGTGTGTGCGCAGGACGACACTTACCATTTCCCTGCGTGTTGAAAACAAATTGCTTGCATGTC CTAATAAATCAAACCGTACGATTGAATCGATTCTAAAGCAATTTTACCAGCCCGGGCGTCGACCACGCGTGCCC TATAG

Aminosäuresequenz: (Reverse Frame 1, gelb: kodierender Bereich, rot: Stoppcodon)

1	L	-	G	T	R	G	R	R	P	G	L	V	K	L	L	-	N	R	F	N
1	CTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTAAAATTGCTTTAGATCGATTCAAT																			
21	R	T	V	-	F	I	R	T	S	Q	A	I	C	F	Q	H	A	G	K	W
61	CGTACGGTTTGATTATTAGGACATCGCAAGCAATTTGTTTTCAACACGCAGGGAAATGG																			
41	-	V	S	L	P	A	H	T	P	E	G	L	S	A	T	D	A	Q	K	G
121	TAAGTGTCGCTGCCTGCGCACACCCGAAGGTTTAAGTGCCACAGATGCGCAGAAGGGA																			
61	R	A	F	K	L	Y	E	Y	N	F	Q	I	F	R	V	V	P	M	P	E
181	AGAGCTTTCAAACCTTACGAATACAATTTTCAAATATTTAGGGTTGTTCCAATGCCTGAA																			
81	F	F	L	F	C	G	V	C	D	F	S	L	C	L	A	G	F	F	I	R
241	TTTTTCTTTTTTGTGGAGTATGCGACTTTTCACTCTGTCTCGCTGGCTTTTTTATCAGA																			

101 R W H A H G Q K S F - L L L R F P S I V
 301 CGGTGGCATGCGCATGGCCAGAAGAGTTTTTAATTGCTTCTGCGTTTTCTTCAATTGTT
 121 L Q A E L P Q E V A K E L A A T A K A L
 361 TTGCAGGCAGAGTTACCGCAGGAAGTCGCCAAGGAGTTGGCGGCCACCGCTAAAGCTTTA
 141 A A P G K G L L A A D E S T G E S N S L
 421 GCAGCGCCAGGGAAGGGTCTTCTTGC GGCTGACGAATCTACCGGTGAGTCGAATTCCTTA
 161 C Y E - S F L R K M K K K E F I R F A M
 481 TGCTATGAATAAAGCTTTTTGAGAAAAATGAAAAAAGGAGTTTATCAGGTTTGCATG
 181 R L C K V R L L G L R E - F R V L C M S
 541 CGTTTGTGCAAAGTGC GCCTTTTAGGCTTGAGAGAATGATTTCTGTATTGTGCATGTCT
 201 T R P F R L I F P N F R F H L F F I F V
 601 ACGCGACCTTTTCGTCTTATTTTCCAAATTTTCGTTTTCATTTATTCTTTATTTTGT
 221 L G C I - C V T S P V G T I A K R F S S
 661 CTCGGCTGTATTTGATGCGTGACTTCGCCTGTAGGAACAATCGCAAAGCGTTTCTCTCC
 241 I S V E N T E P N R A F Y R G L L F S T
 721 ATCAGCGTGGAGAATACGGAGCCAAACCGGGCGTTTACCGCGGGCTGTTGTTTAGCACA
 261 K G L G E Y C S G A M L F E E T L Y Q K
 781 AAGGGTTTGGGCGAGTATTGCAGCGGCGCGATGTTGTTTGAAGAGACTTTGTACCAGAAG
 281 S P E G V P M V E L L R K E N I I P G I
 841 TCTCTGAGGGCGTTCCTATGGTTGAGTTATTGAGGAAAGAGAACATTATTCCTGGTATT
 301 K V D K G L E H I P G T D G E Q A T M G
 901 AAAGTGGACAAGGGGCTAGAGCATATCCCCGGCACAGACGGAGAACAGGCCACCATGGGG
 321 L D G L G E R C R K Y Y E A G A R F A K
 961 TTGGATGGTTTGGGCGAGCGCTGCCGCAAGTATTATGAAGCCGGCGCGCTTCGCTAAG
 341 W R A V L Q I D E A K G K P S N Q S I A
 1021 TGGCGGGCGGTGTTGCAAATAGACGAAGCGAAGGGAAAGCCCTCGAATCAGTCCATTGCC
 361 E I S Y G L A R Y A A I C Q Q N K L V P
 1081 GAAATTTCTTACGATTAGCGCGCTACGCTGCGATCTGCCAACAAAATAAACTCGTGCCC
 381 I V E P C E I L T D G H D I R Y C A Q V
 1141 ATTGTAGAGCCGAAATCCTTACCGACGGCCACCATGATATTGGTACTGCGCACAAGTT
 401 T E R V L A A V F K E L N N Q K V L L E
 1201 ACTGAGCGCGTGCTGGCTGCTGTCTTCAAAGAGCTTAACAATCAAAAAGTGCTTCTCGAG
 421 G A L L K P N M V T P G A Q G P K A S P
 1261 GGCGCGTTGCTGAAACCCAACATGGTAACCTTGGCGCGCAGGGCCCTAAAGCAAGCCCC
 441 Q E I A F F T V R A L S R T V P P A L P
 1321 CAGGAAATTGCCTTCTTCACAGTAAGGGCTCTGTCTCGCACCGTGCCACCCGCTCTCCCC
 461 G V M F L S G G Q S E E E A S L N L D A
 1381 GGCGTGATGTTCTTTTCGGGTGGTCAGTCTGAAGAGGAGGCGAGTTTGAACCTAGACGCC
 481 M N R V G P H P W R L S F S Y G R A L Q
 1441 ATGAATAGAGTGGGTCCTCATCCCTGGAGGCTTTCCTTCTTATGGCAGGGCGCTGCAA
 501 A S C L K H W A G K A E N K A K A Q A T
 1501 GCCTCCTGTCTTAAGCACTGGGCGGGGAAAGCGGAAACAAAGCAAAGGCGCAGGCCACG
 521 L L E R A R A N S Q A Q L G K Y E G G A
 1561 CTGCTGGAGAGAGCGAGGGCTAACAGCCAGGCGCAGCTGGGCAAGTATGAGGGCGGAGCA
 541 G G A E A A A S L F E K K Y I Y - K K D
 1621 GGAGGCGCCGAGGCGGCTTCTTCTTTTGAAGAAGAAATACATTTATTAAGGAT
 561 G K R E K Y I - - R G L C C P S L I K F
 1681 GGAAAAAGGAGAAGTATATATAATAAAGGGGCCTGTGTTGCCCTCATTAATTAATTT
 581 M P K M Y Q S P - R L V G A D W P Q R K
 1741 ATGCCTAAAATGTACCAAGTCGCCCTGACGGCTTGTGTTGGTGTGACTGGCCACAACGAAAG
 601 K M H I F V S C R Q - A D D G Y T L F S
 1801 AAAATGCATATTTTGTCTTGGCCGCAATAGGCCGACGACGGGTATACATTATTTTCT
 621 C Y C V T E K K L D R Q G K K H A Q F I
 1861 TGTTACTGTGTAACGGAGAAGAACTTGATCGACAAGGAAAAAGCACGCGCAGTTTATT
 641 L D Y D - I D A P S L L T M I E R Y A V
 1921 TTAGATTATGATTAGATTGACGCACCTTCCTTGCTTACCATGATCGAGCGATACGCCGTA
 661 R P F Q L F H I L T V Y C S K R S Y I R
 1981 AGGCCATTTCACTTTTTTCATATTTAACGGTTTATTGTTCAAAGAGGTCCTACATCAGA
 681 S T R C K F P V A R A T C L S P F - C C
 2041 AGCACGCGTTGCAAATCCCGGTTGCCAGAGCAACGTGCCTCAGTCCATTCTAATGTTGC
 701 G - R R Y K E W L F A Y L Q Q T I R Q X
 2101 GGATAAAGAAGGTATAAAGAATGGCTTTTTGCTTATCTTCAGCAACAATTAGACAGGAN

721 K X L I A A A
2161 AAANAATTGATTGCAGCAGC

Aminosäuresequenz:

AELPQEVAKELAATAKALAAPGKGLLADESTGTIAKRFSSISVENTEPNRAFYRGLLFSTKGLGEYCSGAMLFE
ETLYQKSPEGVPMVELLRKENIIPGIKVDKGLEHIPGTDGEQATMGLDGLGERCRKYEAGARFAKWRAVLQIDE
AKGKPSNQSIAEISYGLARYAAICQQNKLVPIVEPEILTDGHHDIRYCAQVTERVLAAVFKELNNQKVLLEGALL
KPNMVTPGAQGPKASPQEIAFFTVRALSRTPPALPGVMFLSGGQSEEEASLNLDAMNRVGPWPRLSFSYGRAL
QASCLKHWAGKAENKAKAQATLLERARANSQAQLGKYEGGAGGAEEAAASLFEKKYIY

B: Proteomik

1. Referenzprotein bovines Vimentin (BtVIM)

(Informationen aus der SwissProt-Datenbank entnommen, auszugsweise)

Allgemeine Daten

Entry name VIME_BOVIN
Zugangsnummer P48616 (primary), Q17QM7 (secondary)

Name and Ursprung des Proteins

Proteinname Vimentin von *Bos taurus* (Bovine) [TaxID: 9913]
Genname VIM
Taxonomy Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora;
Bovidae; Bovinae; Bos.

Referenzen

NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA]. DOI=10.1016/0378-1119(94)90554-1;
PubMed=8144034 Hess J.F., Casselman J.T., FitzGerald P.G.; "Nucleotide sequence of the bovine vimentin-encoding cDNA."; Gene 140:257-259(1994).

Modifikationen

Acetylierungsstellen: N-Acetylserin (Pos. 2)
Phosphorylierungsstellen: Phosphoserin (Pos. 5, 7-10, 25-26, 34, 39, 42, 55-56, 66, 72, 83, 214, 412, 420, 459); Phosphotyrosin (Pos. 53, 61, 117); Phosphothreonin (Pos. 446, 458)

Sequenzinformationen

Länge 466 aa [unprozessierten Vorstufe], MW: 53728 Da [unprozessierten Vorstufe]

10	20	30	40	50	60
MSTRSVSSSS	YRRMFGGPGT	ASRPSSTRSY	VTTSTRYSL	GSALRPTTSR	TLYTSSPGGV
70	80	90	100	110	120
YATRSSAVRL	RSGVPGVRL	QDSVDFSLAD	AINTEFKNTR	TNEKVELQEL	NDRFANYIDK
130	140	150	160	170	180
VRFLEQQNKI	LLAELEQLKG	QGKSRLGDL	EEEMRELRRQ	VDQLTNDKAR	VEVERDNLA
190	200	210	220	230	240
DIMRLREKLQ	EEMLQREEAE	STLQSFRQDV	DNASLARLDL	ERKVESLQEE	IAFLKKLHDE
250	260	270	280	290	300
EIQELQAQIQ	EQHVQIDMDV	SKPDLTAALR	DVRQQYESVA	AKNLQEAEEW	YKSKFADLSE
310	320	330	340	350	360
AANRNNDALR	QAKQESNEYR	RQVQTLTCEV	DALKGTNESL	ERQMREMEEN	FSVEAANYQD
370	380	390	400	410	420
TIGRLQDEIQ	NMKEEMARHL	REYQDLLNVK	MALDIEIATY	RKLLEGEESR	ISLPLPNFSS
430	440	450	460		
LNLRETNLDS	LPLVDTHSKR	TLLIKTVETR	DGQVINETSQ	HHDDLE	

2. Auswertung der zweidimensional aufgetrennten Proteinproben mit dem Programm Proteomweaver

Tabelle I: Proteinspots, die in den infizierten Proben nach Abgleich mit bovinen Vimentin mit geringerer Intensität vorhanden waren (runterregulierte und nicht mehr nachweisbare Proteine).

Nr.	ID	pI	MW (Da)	n.inf.	n.inf.	n.inf.	n.inf.	n.inf.	n.inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	
				65_3	65_4	66_3	66_4	Avg.1	CV.1	65_1	65_2	66_1	66_2	Avg.2	CV.2	T.2	Fac.2
1	8414	4,46	132283	0,343	0,460	0,285	0,194	0,306	43,38%	N.A.	0,109	0,049	0,042	0,061	66,58%	0,0134	0,20
2	8423	4,66	129459	0,749	0,644	0,365	N.A.	0,560	46,08%	0,324	0,110	0,287	0,219	0,218	61,83%	0,0341	0,39
3	8477	4,90	120893	0,394	N.A.	0,234	0,210	0,269	40,07%	0,077	0,051	0,070	0,101	0,073	32,53%	0,0058	0,27
4	8501	4,37	119064	0,183	0,223	0,265	0,153	0,202	27,09%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
5	8509	5,67	118631	0,417	0,393	0,206	N.A.	0,323	47,97%	0,100	0,127	0,087	0,047	0,085	52,62%	0,0089	0,26
6	8688	5,22	103810	0,995	0,735	0,941	0,507	0,769	35,94%	0,272	0,494	0,286	0,338	0,337	31,03%	0,0071	0,44
7	8693	5,13	103566	1,585	0,802	1,627	N.A.	1,274	49,35%	0,206	0,296	N.A.	0,392	0,288	38,32%	0,0084	0,23
8	8707	7,21	102789	0,225	0,205	0,203	0,175	0,201	10,92%	0,110	0,083	0,105	0,072	0,091	22,10%	0,0013	0,45
9	8710	5,08	102708	0,464	0,377	1,037	1,005	0,653	68,63%	0,244	N.A.	0,298	0,324	0,287	15,73%	0,0457	0,44
10	8725	7,53	102287	0,210	0,135	0,188	0,231	0,188	26,28%	0,055	0,091	0,095	0,066	0,075	30,03%	0,0021	0,40
11	8788	5,65	96155	0,261	0,231	0,259	0,186	0,232	16,96%	0,063	0,050	0,072	0,087	0,067	26,56%	0,0002	0,29
12	8790	4,42	96038	0,500	0,571	1,329	0,769	0,735	54,29%	0,129	0,277	0,289	0,184	0,209	46,11%	0,0049	0,28
13	8840	4,52	93851	0,660	0,690	0,625	0,598	0,642	6,45%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
14	8858	7,90	92876	0,183	0,180	0,214	0,145	0,179	17,46%	0,051	0,044	0,105	0,058	0,061	46,38%	0,0064	0,34
15	8933	7,07	86977	0,261	0,305	0,254	0,205	0,254	17,90%	0,111	0,086	0,109	0,130	0,108	18,50%	0,0004	0,43
16	8952	6,78	85661	0,432	0,478	N.A.	0,554	0,486	13,25%	0,212	0,082	N.A.	0,166	0,142	64,22%	0,0432	0,29
17	8974	4,51	84237	0,544	0,138	0,411	0,138	0,255	105,54%	N.A.	N.A.	0,038	0,074	0,053	60,47%	0,0450	0,21
18	8987	6,34	83497	0,328	0,193	0,328	0,224	0,261	31,11%	0,127	0,069	N.A.	0,117	0,101	38,66%	0,0157	0,39
19	9018	6,83	81294	0,184	0,145	0,183	0,120	0,156	23,14%	0,061	0,052	0,079	0,052	0,060	22,03%	0,0006	0,39

20	9022	6,99	80757	0,382	0,296	0,329	0,273	0,317	15,65%	0,049	0,118	0,067	0,045	0,065	54,23%	0,0031	0,20
21	9025	7,25	80704	0,714	0,456	0,598	0,473	0,551	23,48%	0,122	0,297	0,221	0,159	0,189	47,44%	0,0057	0,34
22	9026	7,38	80512	0,512	0,430	0,413	0,379	0,431	13,45%	0,284	0,227	0,168	0,123	0,191	44,01%	0,0158	0,44
23	9037	7,53	79815	0,901	0,520	1,103	0,756	0,790	37,61%	0,212	0,184	0,337	0,201	0,227	31,13%	0,0011	0,29
24	9095	5,85	75613	0,575	0,603	0,593	0,487	0,562	10,34%	0,122	0,113	0,158	0,227	0,149	36,92%	0,0020	0,27
25	9103	5,95	75245	0,398	0,375	0,373	0,302	0,360	12,80%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
26	9110	5,64	74997	0,384	0,310	0,407	0,284	0,342	18,77%	0,119	0,128	0,121	0,095	0,115	13,86%	0,0001	0,34
27	9121	4,95	73986	1,350	0,485	1,950	0,780	0,999	84,37%	0,131	0,117	0,147	0,155	0,137	13,33%	0,0061	0,14
28	9143	5,21	72750	0,372	0,337	0,426	0,388	0,380	10,21%	0,183	0,100	0,148	0,109	0,131	32,04%	0,0026	0,35
29	9147	8,64	72553	0,486	N.A.	0,722	0,781	0,649	28,99%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
30	9154	5,29	72244	0,337	0,346	0,554	0,292	0,371	32,07%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
31	9165	7,89	71579	0,254	0,279	0,317	0,172	0,249	30,04%	0,081	N.A.	0,128	0,125	0,109	29,04%	0,0107	0,44
32	9179	4,84	70899	0,562	0,621	0,777	0,550	0,621	17,18%	0,309	0,364	0,385	0,271	0,329	17,25%	0,0013	0,53
33	9220	6,57	68467	0,360	0,318	0,311	0,245	0,306	17,47%	0,146	0,110	0,157	0,145	0,138	16,73%	0,0004	0,45
34	9243	6,60	67338	0,258	0,187	0,243	0,188	0,217	18,24%	0,044	N.A.	0,105	0,087	0,073	58,75%	0,0451	0,34
35	9261	5,23	66545	0,306	0,293	0,295	0,229	0,279	14,24%	0,096	0,108	0,105	0,082	0,097	13,22%	0,0000	0,35
36	9262	7,10	66466	0,475	0,372	0,410	0,326	0,392	17,23%	0,192	0,194	0,154	0,247	0,194	21,32%	0,0015	0,50
37	9266	6,98	66316	0,538	0,524	0,459	0,432	0,486	11,09%	0,222	0,213	0,242	0,211	0,222	6,50%	0,0001	0,46
38	9267	6,87	66251	0,869	0,732	0,953	0,488	0,738	34,53%	0,179	0,155	0,197	0,178	0,177	10,20%	0,0012	0,24
39	9269	7,31	66098	1,197	0,879	1,347	0,997	1,090	20,87%	0,512	0,337	0,560	0,350	0,429	29,59%	0,0015	0,39
40	9270	7,18	66029	1,150	0,812	0,882	0,773	0,893	19,39%	0,219	0,231	0,353	0,259	0,261	23,94%	0,0001	0,29
41	9271	7,63	65969	0,759	0,649	0,659	0,461	0,622	23,60%	0,261	0,253	0,259	0,285	0,264	5,22%	0,0029	0,43
42	9279	7,48	65592	2,198	1,624	2,153	1,393	1,809	24,89%	0,262	0,230	0,513	0,273	0,303	43,10%	0,0004	0,17
43	9292	4,70	64866	0,200	0,156	0,285	0,187	0,202	28,74%	0,053	0,069	0,075	0,054	0,062	18,77%	0,0005	0,31
44	9329	5,38	63414	0,239	N.A.	0,280	0,215	0,243	14,33%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
45	9359	7,85	62573	0,246	0,215	0,301	0,204	0,239	18,86%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
46	9363	6,50	62475	0,497	0,414	0,411	0,389	0,426	11,22%	0,216	0,193	0,275	0,217	0,223	15,97%	0,0006	0,52
47	9376	7,56	62278	0,314	0,211	0,329	0,312	0,287	23,00%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00

48	9379	7,51	62137	0,309	0,285	0,289	0,255	0,284	8,24%	0,126	0,142	0,181	0,121	0,141	19,81%	0,0019	0,50
49	9385	6,33	61861	3,073	2,450	3,091	2,955	2,880	11,57%	0,959	0,861	1,636	1,187	1,125	32,70%	0,0038	0,39
50	9402	8,61	61192	0,276	0,175	0,302	0,307	0,259	30,47%	N.A.	N.A.	0,061	0,044	0,052	25,80%	0,0094	0,20
51	9481	6,66	59070	0,345	0,304	0,358	0,252	0,312	17,13%	0,135	0,103	0,126	0,132	0,123	12,99%	0,0001	0,40
52	9498	7,78	58516	0,791	0,611	1,121	0,699	0,784	29,76%	0,437	0,397	0,381	0,439	0,413	7,29%	0,0129	0,53
53	9521	4,54	57899	0,442	0,426	0,487	0,471	0,456	6,26%	0,099	0,111	0,206	0,146	0,135	38,42%	0,0041	0,30
54	9543	4,72	57150	5,505	3,900	7,569	7,868	5,980	38,65%	1,714	2,156	3,930	3,327	2,637	46,61%	0,0180	0,44
55	9567	8,03	56646	0,374	0,298	0,369	0,220	0,308	28,24%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
56	9604	6,81	55703	0,169	0,321	0,160	0,094	0,169	65,63%	0,056	0,048	0,036	0,064	0,050	27,76%	0,0103	0,30
57	9705	6,89	51953	0,994	0,794	0,968	0,512	0,791	35,87%	0,316	0,292	0,345	0,248	0,298	15,03%	0,0038	0,38
58	9711	5,82	51806	0,379	0,302	0,232	0,247	0,284	24,93%	0,125	0,194	0,172	0,130	0,153	23,75%	0,0068	0,54
59	9731	4,70	51332	0,928	0,882	0,776	0,980	0,888	10,50%	0,124	0,182	N.A.	0,284	0,186	51,10%	0,0189	0,21
60	9748	6,85	51008	0,660	0,529	0,715	0,343	0,541	38,94%	0,196	0,161	0,239	0,153	0,185	22,41%	0,0026	0,34
61	9770	6,76	50076	0,367	0,388	0,296	0,220	0,310	29,37%	0,095	0,080	0,123	0,101	0,099	19,64%	0,0006	0,32
62	9824	8,10	48129	0,302	0,214	0,275	0,166	0,233	30,95%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
63	9825	4,61	48099	2,323	2,777	3,327	3,901	3,025	25,12%	0,355	0,404	0,463	0,497	0,426	16,05%	0,0000	0,14
64	9844	5,49	47843	0,338	0,343	0,322	0,357	0,340	4,39%	0,168	0,162	0,173	0,152	0,164	5,55%	0,0000	0,48
65	9849	7,40	47693	0,199	0,169	0,127	0,172	0,164	20,84%	0,100	0,051	0,084	0,059	0,071	37,01%	0,0062	0,43
66	9863	6,26	47275	1,907	1,766	2,337	2,252	2,052	14,29%	0,885	0,758	1,298	0,829	0,922	26,71%	0,0024	0,45
67	9877	4,62	46795	0,247	0,357	0,398	N.A.	0,327	28,26%	0,120	0,068	0,186	0,080	0,105	57,28%	0,0091	0,32
68	9941	7,58	44955	0,162	0,211	0,156	0,185	0,177	14,63%	0,055	0,045	0,084	0,080	0,064	34,55%	0,0028	0,36
69	9948	8,65	44711	0,677	0,405	0,199	0,303	0,358	67,39%	0,131	0,049	N.A.	0,135	0,095	78,66%	0,0335	0,26
70	9956	4,62	44530	0,679	0,361	0,334	0,334	0,407	41,08%	0,120	0,123	0,147	0,144	0,133	10,89%	0,0050	0,33
71	9971	7,78	44040	0,215	0,250	0,259	0,264	0,246	9,58%	0,050	N.A.	0,078	0,038	0,053	43,75%	0,0148	0,22
72	9992	6,87	43429	0,342	0,255	0,324	0,161	0,260	41,19%	0,104	0,054	0,132	0,079	0,088	46,29%	0,0056	0,34
73	10013	7,06	42968	0,239	0,242	0,246	0,242	0,242	1,05%	0,029	N.A.	0,082	0,027	0,040	86,43%	0,0378	0,17
74	10018	6,46	42876	0,131	0,155	0,146	0,186	0,153	15,67%	N.A.	N.A.	0,051	0,040	0,045	17,34%	0,0141	0,29
75	10019	6,74	42806	0,585	0,600	0,575	0,469	0,555	11,95%	0,171	0,152	0,153	0,129	0,151	12,25%	0,0000	0,27

76	10022	7.44	42676	0,399	0,325	0,321	0,210	0,306	31,09%	0,107	0,092	0,167	0,096	0,112	31,61%	0,0020	0,37
77	10025	4.81	42622	0,583	0,550	0,595	0,350	0,509	28,50%	0,105	0,162	0,081	0,117	0,113	33,42%	0,0002	0,22
78	10028	4.27	42543	0,222	0,164	0,118	0,202	0,172	32,41%	0,033	0,041	0,063	0,044	0,044	31,79%	0,0004	0,26
79	10046	8.44	42182	0,127	0,129	0,190	0,205	0,159	28,68%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
80	10055	7.70	41914	0,247	0,315	0,216	0,201	0,241	21,75%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
81	10090	4.79	40915	0,641	0,718	0,534	0,596	0,618	13,29%	0,231	0,219	0,364	0,244	0,259	26,09%	0,0016	0,42
82	10108	6.42	40159	0,762	0,763	0,605	0,735	0,713	11,77%	0,312	0,276	0,332	0,280	0,299	9,37%	0,0000	0,42
83	10124	4.60	39745	3,021	3,660	4,997	5,937	4,256	35,49%	1,590	1,792	2,753	1,680	1,906	28,42%	0,0070	0,45
84	10132	8.11	39430	0,312	N.A.	0,325	0,111	0,224	83,95%	0,029	N.A.	0,075	0,024	0,037	84,53%	0,0228	0,17
85	10145	5.41	39189	0,157	0,164	0,181	0,241	0,183	21,18%	0,042	0,025	0,038	0,033	0,034	25,19%	0,0000	0,18
86	10167	5.57	38468	0,452	0,495	0,393	0,532	0,465	13,91%	0,143	0,167	0,163	0,148	0,155	7,77%	0,0000	0,33
87	10174	7.26	38327	0,413	0,405	0,307	0,576	0,415	29,38%	0,094	0,117	0,146	0,060	0,099	46,35%	0,0013	0,24
88	10179	7.00	38252	0,290	0,274	0,259	0,461	0,312	30,24%	0,082	0,068	0,089	0,062	0,074	18,38%	0,0002	0,24
89	10185	6.45	38096	0,231	0,231	0,190	0,181	0,207	13,60%	0,088	0,089	0,117	0,085	0,094	15,82%	0,0002	0,45
90	10195	6.76	37880	1,051	1,130	1,309	0,912	1,091	16,24%	0,488	0,423	0,551	0,373	0,454	18,43%	0,0003	0,42
91	10197	8.72	37858	N.A.	0,468	0,622	0,621	0,565	17,87%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
92	10198	5.55	37855	0,425	0,509	0,397	0,469	0,448	11,53%	0,193	0,195	0,176	0,123	0,169	24,04%	0,0008	0,38
93	10201	8.32	37757	N.A.	2,672	3,985	2,825	3,110	24,17%	1,105	1,326	1,191	1,329	1,234	9,40%	0,0104	0,40
94	10206	8.78	37692	0,924	0,554	0,484	0,587	0,617	32,39%	0,308	0,308	0,271	0,305	0,298	6,46%	0,0117	0,48
95	10225	5.62	37211	0,182	0,168	0,154	0,166	0,167	7,11%	0,102	0,085	0,105	0,073	0,090	18,65%	0,0027	0,54
96	10242	4.77	36690	0,395	0,320	0,394	0,126	0,282	72,13%	0,065	0,075	0,093	0,089	0,080	17,94%	0,0147	0,28
97	10246	7.54	36594	5,915	6,058	7,205	7,286	6,566	11,71%	2,377	2,044	3,832	2,770	2,680	30,83%	0,0035	0,41
98	10270	6.70	36087	0,246	0,206	0,245	0,199	0,223	11,79%	0,097	0,103	0,152	0,101	0,111	23,45%	0,0029	0,50
99	10277	6.39	36024	0,449	0,720	0,344	0,382	0,454	38,67%	0,211	0,150	0,267	0,198	0,202	26,84%	0,0085	0,45
100	10284	8.40	35837	0,366	0,833	0,695	0,894	0,660	50,19%	0,109	0,048	0,425	0,239	0,152	158,63%	0,0459	0,23
101	10287	6.84	35798	0,765	0,691	N.A.	0,472	0,629	28,99%	0,257	0,270	0,301	0,211	0,257	16,02%	0,0120	0,41
102	10293	8.60	35646	0,765	0,595	0,545	0,603	0,622	15,57%	0,302	0,282	0,245	0,171	0,244	28,96%	0,0017	0,39
103	10300	8.20	35385	N.A.	0,713	1,468	1,204	1,080	45,19%	0,468	0,374	0,607	0,396	0,453	24,24%	0,0364	0,42

104	10303	8,55	35341	0,944	0,807	0,850	0,774	0,842	8,93%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
105	10331	4,68	34671	0,923	0,954	0,699	0,800	0,838	15,34%	0,292	0,288	0,357	0,341	0,318	11,47%	0,0001	0,38		
106	10347	7,67	34135	0,737	0,445	0,648	0,634	0,606	24,10%	0,231	0,190	0,236	0,220	0,218	10,33%	0,0008	0,36		
107	10359	7,34	33662	0,716	0,817	0,486	0,523	0,621	28,22%	0,322	0,326	0,252	0,155	0,253	41,61%	0,0071	0,41		
108	10364	4,71	33578	0,316	0,542	0,503	0,362	0,420	29,48%	0,081	0,134	0,168	0,188	0,136	45,14%	0,0035	0,32		
109	10373	7,86	33417	1,484	1,813	1,622	1,380	1,567	12,49%	0,484	0,421	0,483	0,565	0,486	12,76%	0,0000	0,31		
110	10465	7,86	31123	0,190	0,137	0,230	0,166	0,177	24,46%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00		
111	10468	5,36	31046	0,201	0,206	0,200	0,214	0,205	3,17%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00		
112	10479	8,55	30762	0,203	0,398	0,330	0,378	0,317	36,06%	0,117	0,138	0,159	0,067	0,114	46,35%	0,0065	0,36		
113	10483	8,67	30713	0,452	0,132	0,144	0,260	0,217	77,45%	0,131	0,062	0,107	0,055	0,083	51,49%	0,0387	0,38		
114	10507	5,44	29956	0,563	0,580	0,444	0,564	0,535	13,26%	0,239	0,278	0,281	0,223	0,254	12,22%	0,0001	0,47		
115	10516	5,59	29757	0,320	0,417	0,303	0,362	0,348	15,24%	0,088	0,077	0,102	0,096	0,090	12,97%	0,0000	0,26		
116	10532	8,39	29336	0,176	0,150	0,169	0,171	0,166	7,38%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00		
117	10537	4,59	29224	1,084	0,846	1,332	1,613	1,185	31,95%	0,471	0,544	0,511	0,480	0,501	6,75%	0,0067	0,42		
118	10538	6,50	29220	0,678	0,678	0,582	0,639	0,643	7,48%	0,106	0,188	0,117	0,147	0,136	28,98%	0,0006	0,21		
119	10540	6,74	29183	0,343	0,381	0,364	0,289	0,343	12,98%	0,101	0,190	0,187	0,167	0,156	34,90%	0,0085	0,46		
120	10557	7,42	28786	0,768	0,796	0,457	0,550	0,626	30,78%	0,303	0,286	0,343	0,243	0,291	15,44%	0,0051	0,47		
121	10596	5,61	28063	0,245	0,273	0,198	0,257	0,241	15,03%	0,084	0,116	0,086	0,087	0,092	16,32%	0,0001	0,38		
122	10632	9,19	27502	0,713	0,366	0,258	0,577	0,444	58,00%	N.A.	N.A.	0,061	0,051	0,056	13,10%	0,0015	0,13		
123	10646	7,48	27247	0,499	0,505	0,384	0,324	0,421	23,91%	0,134	0,095	0,129	0,104	0,114	17,75%	0,0001	0,27		
124	10655	7,37	27126	0,204	0,210	0,145	0,167	0,180	18,96%	0,062	N.A.	0,068	0,035	0,053	42,74%	0,0154	0,30		
125	10668	7,69	26774	0,357	0,419	0,450	0,364	0,396	11,80%	0,092	0,077	0,081	0,055	0,075	24,72%	0,0001	0,19		
126	10739	5,02	24813	0,344	0,336	0,304	N.A.	0,328	6,73%	0,151	0,197	0,174	0,099	0,150	35,01%	0,0113	0,46		
127	10767	7,78	24082	0,226	0,197	0,133	0,176	0,180	24,99%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00		
128	10779	4,58	23589	0,144	0,161	0,176	0,213	0,172	17,99%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00		
129	10782	8,72	23529	N.A.	1,316	0,913	1,048	1,080	20,29%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00		
130	10880	8,09	19880	0,813	0,945	0,710	0,685	0,782	15,78%	0,116	0,096	0,111	0,084	0,101	15,40%	0,0000	0,13		
131	10907	6,99	18378	0,290	0,157	0,282	0,223	0,231	32,60%	N.A.	N.A.	0,052	0,041	0,046	19,61%	0,0023	0,20		

132	10921	4,08	18124	3,069	2,805	3,135	1,911	2,680	25,93%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
133	10930	4,36	17550	0,572	0,560	0,562	0,422	0,525	15,74%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
134	10993	8,84	16490	N.A.	1,382	1,476	1,387	1,414	3,77%	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,00
135	11000	4,51	16454	N.A.	0,378	1,150	0,523	0,610	77,13%	N.A.	0,088	0,103	N.A.	0,095	11,64%	0,0251	0,16	
136	11071	9,19	15856	3,591	2,807	1,523	3,019	2,610	45,27%	0,053	0,029	N.A.	0,029	0,035	41,77%	0,0000	0,01	
137	11088	4,42	15656	4,790	4,966	5,354	6,538	5,372	14,91%	1,483	1,553	1,873	1,278	1,532	17,06%	0,0000	0,29	

Legende: Nr – Nummer in der Auswertung, ID – Identifikationsnummer im 2D-Gel, pl – isoelektrischer Punkt, MW (Da) – Molekulargewicht in Dalton

l-1.1-4. – Kennzeichnung der nicht-infizierten 2D-Gele, l-2.1-4. – Kennzeichnung der *E. bovis*-infizierten 2D-Gele

Avg. 1/2 – Mittelwert der jeweils vier zusammengehörenden 2D-Gele

CV. 1/2 – Variationskoeffizient, je höher desto größer die Streuung der zugrundeliegenden Werte

T.2 – student T-Test, Faktor 2

Tabelle II: Proteinspots, die in den infizierten Proben nach Abgleich mit bovines Vimentin mit größerer Intensität vorhanden waren (hochregulierte und neue Proteine).

Nr.	ID	pl	MW	n.inf.	n.inf.	n.inf.	n.inf.	n.inf.	n.inf.	n.inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.	inf.
				65_3	65_4	66_3	66_4	Avg.1	CV.1	65_1	65_2	66_1	66_2	Avg.2	CV.2	T.2	Fac.2	inf.
1	8463	8,32	122589	0,035	0,027	0,020	N.A.	0,027	32,24%	0,490	0,581	0,189	0,105	0,274	124,18%	0,0063	10,33	
2	8544	6,65	116618	0,054	0,027	0,040	0,031	0,037	35,89%	0,211	0,138	0,134	0,188	0,165	25,37%	0,0003	4,51	
3	8564	8,55	114916	0,057	0,029	N.A.	N.A.	0,041	60,72%	0,420	0,731	0,315	N.A.	0,459	53,50%	0,0259	11,32	
4	8613	4,85	110587	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	5,911	5,969	5,918	4,877	5,649	10,30%	N.A.	N.A.	
5	8690	4,62	103708	0,885	0,775	0,871	3,017	1,159	89,78%	2,267	3,364	3,963	3,136	3,120	26,42%	0,0469	2,69	
6	8700	5,41	103359	0,109	0,080	0,083	0,064	0,082	24,65%	0,283	0,432	0,160	0,119	0,220	77,88%	0,0351	2,67	
7	8702	5,78	103237	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,352	N.A.	0,514	0,371	0,406	22,79%	N.A.	N.A.	
8	8709	5,56	102738	0,051	0,060	0,083	0,029	0,052	54,05%	0,439	0,731	0,271	0,217	0,371	71,68%	0,0015	7,12	
9	8722	6,93	102353	0,069	0,058	0,094	0,055	0,067	27,52%	0,178	0,151	0,236	0,165	0,180	21,27%	0,0009	2,67	

10	8836	4,78	94020	0,261	0,385	0,212	0,474	0,317	44,03%	2,362	2,882	3,141	3,032	2,837	13,58%	0,0005	8,95
11	8891	6,78	90032	0,132	N.A.	0,146	0,116	0,131	11,95%	0,315	0,356	0,432	N.A.	0,365	17,23%	0,0013	2,79
12	8899	6,17	89121	0,091	0,108	0,094	0,053	0,084	36,36%	0,169	0,159	0,253	0,177	0,186	23,29%	0,0071	2,22
13	8908	6,30	88712	0,175	0,134	0,183	0,139	0,156	17,32%	0,408	0,411	0,809	0,539	0,520	38,01%	0,0019	3,33
14	8919	6,46	88174	0,388	0,293	0,393	0,343	0,352	14,70%	1,148	1,009	1,857	1,410	1,319	30,50%	0,0005	3,75
15	8923	6,63	87878	0,965	0,716	1,085	0,837	0,890	19,71%	2,414	2,156	3,615	2,771	2,687	24,95%	0,0003	3,02
16	9003	4,79	82306	3,693	3,863	5,253	5,898	4,585	25,81%	10,002	12,514	12,735	9,125	10,982	17,98%	0,0012	2,40
17	9040	5,11	79608	0,037	0,056	N.A.	N.A.	0,046	33,98%	N.A.	0,332	0,125	0,147	0,183	69,00%	0,0324	4,01
18	9067	5,44	77812	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,888	0,732	1,101	0,676	0,834	24,31%	N.A.	N.A.
19	9081	5,39	76414	0,433	0,397	0,591	0,398	0,448	20,76%	1,000	0,971	1,584	1,157	1,155	25,11%	0,0007	2,58
20	9109	4,89	75007	0,460	0,260	0,668	0,705	0,487	58,41%	1,837	1,758	2,127	0,960	1,603	42,04%	0,0072	3,29
21	9207	5,02	68870	0,092	0,163	0,511	0,511	0,250	135,91%	1,136	0,837	1,626	1,567	1,247	36,51%	0,0268	4,99
22	9231	6,91	67784	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,167	0,122	0,215	0,125	0,153	30,50%	N.A.	N.A.
23	9333	5,76	63286	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,318	0,304	0,407	0,309	0,332	14,71%	N.A.	N.A.
24	9334	4,48	63270	0,072	0,101	0,178	0,037	0,083	92,81%	0,256	0,319	0,426	0,274	0,312	25,37%	0,0218	3,76
25	9341	6,67	63158	0,051	N.A.	0,055	0,054	0,053	3,22%	0,261	0,225	0,292	0,218	0,247	14,57%	0,0001	4,65
26	9358	5,38	62577	0,253	N.A.	0,231	0,192	0,224	15,30%	0,716	0,461	0,699	0,604	0,611	22,43%	0,0006	2,73
27	9371	4,36	62317	0,855	0,836	0,871	1,486	0,981	31,98%	1,586	2,468	2,805	2,453	2,278	28,28%	0,0041	2,32
28	9429	6,35	60559	N.A.	N.A.	0,048	0,033	0,040	30,51%	0,152	0,105	0,278	0,193	0,171	50,59%	0,0109	4,33
29	9446	6,59	60060	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,411	0,289	0,354	0,276	0,328	20,31%	N.A.	N.A.
30	9470	7,58	59279	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,284	0,407	0,269	0,314	25,13%	N.A.	N.A.
31	9486	8,17	58776	0,098	0,122	0,078	0,047	0,081	51,25%	0,471	0,383	0,198	0,444	0,355	48,97%	0,0022	4,36
32	9490	8,00	58677	0,145	0,156	0,184	0,196	0,169	15,16%	0,316	0,516	0,255	0,463	0,373	39,02%	0,0111	2,21
33	9505	5,86	58324	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,172	0,199	0,181	0,155	0,176	10,98%	N.A.	N.A.
34	9510	6,02	58258	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,435	0,390	0,424	0,409	0,414	4,91%	N.A.	N.A.
35	9511	5,52	58257	0,070	0,035	0,134	0,041	0,060	84,55%	0,201	0,341	0,196	0,141	0,208	44,11%	0,0185	3,45
36	9551	7,13	57022	0,104	0,047	0,051	0,061	0,062	42,82%	0,240	0,288	0,199	0,155	0,217	31,97%	0,0018	3,48
37	9556	5,49	56904	0,106	0,033	N.A.	0,046	0,054	82,95%	0,388	0,279	0,485	0,428	0,387	26,67%	0,0209	7,11

38	9560	6,58	56836	0,153	0,106	0,176	0,145	0,142	24,04%	0,588	0,458	0,735	0,561	0,577	21,51%	0,0001	4,05
39	9578	7,75	56407	0,066	0,099	0,248	0,144	0,124	76,04%	0,521	0,384	0,280	0,502	0,410	33,25%	0,0160	3,32
40	9618	4,94	55113	0,330	0,416	0,251	0,680	0,392	52,54%	N.A.	0,851	1,402	1,006	1,063	28,95%	0,0121	2,71
41	9641	6,28	54488	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,682	0,503	0,866	0,616	0,654	25,38%	N.A.	N.A.
42	9666	4,38	53455	0,161	0,150	0,192	0,222	0,179	19,41%	0,744	0,950	0,794	0,505	0,730	30,54%	0,0003	4,07
43	9674	7,58	53218	0,081	0,100	0,160	0,109	0,109	32,66%	0,450	N.A.	0,268	0,268	0,318	34,83%	0,0072	2,92
44	9689	5,90	52520	N.A.	0,091	0,166	0,137	0,128	35,72%	0,300	0,307	0,332	0,280	0,304	7,29%	0,0346	2,38
45	9714	6,22	51731	0,267	0,262	0,261	0,298	0,272	6,44%	0,764	0,557	1,009	0,663	0,731	28,51%	0,0030	2,69
46	9724	7,15	51549	0,059	N.A.	0,058	N.A.	0,059	1,73%	0,141	0,118	0,193	0,200	0,159	28,73%	0,0040	2,72
47	9761	4,38	50731	0,260	0,329	0,402	0,331	0,327	19,52%	0,636	0,770	0,881	0,675	0,735	15,59%	0,0005	2,25
48	9899	6,62	46109	0,074	0,077	0,071	0,082	0,076	6,74%	0,281	0,262	0,257	0,228	0,256	9,13%	0,0000	3,37
49	10005	6,18	43131	0,050	0,051	0,045	N.A.	0,049	6,00%	0,267	0,229	0,252	0,206	0,237	12,11%	0,0000	4,89
50	10057	8,32	41783	0,105	0,262	0,631	0,392	0,287	114,05%	1,690	2,483	3,009	2,384	2,342	27,15%	0,0084	8,16
51	10069	7,85	41410	0,668	0,814	0,715	0,651	0,709	10,53%	1,686	1,560	2,463	1,844	1,859	22,07%	0,0006	2,62
52	10070	7,50	41391	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,389	0,348	0,450	0,331	0,377	14,60%	N.A.	N.A.
53	10080	8,09	41082	1,112	1,271	1,653	1,000	1,236	24,24%	3,008	3,112	4,335	4,188	3,611	21,19%	0,0003	2,92
54	10105	7,37	40284	0,043	0,050	0,030	0,039	0,040	24,42%	0,232	0,171	0,317	0,206	0,226	29,67%	0,0001	5,69
55	10113	6,72	39946	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,233	0,206	0,243	0,185	0,216	13,11%	N.A.	N.A.
56	10138	7,79	39318	0,058	0,048	0,150	0,076	0,075	64,40%	0,430	0,329	0,400	N.A.	0,384	14,89%	0,0047	5,12
57	10142	6,06	39227	0,114	0,198	0,087	0,104	0,120	42,46%	0,461	0,423	0,464	0,384	0,432	9,31%	0,0040	3,61
58	10281	8,67	35973	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,516	0,382	0,420	0,264	0,384	32,37%	N.A.	N.A.
59	10301	7,87	35369	N.A.	0,347	0,335	0,331	0,338	2,45%	0,830	0,726	0,867	0,817	0,808	7,92%	0,0000	2,39
60	10328	5,61	34715	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,191	0,191	0,198	0,167	0,187	7,76%	N.A.	N.A.
61	10330	5,00	34672	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,229	0,259	0,263	0,217	0,241	9,83%	N.A.	N.A.
62	10414	6,10	32310	0,040	N.A.	0,032	0,054	0,041	30,67%	0,213	0,135	0,232	0,187	0,188	27,13%	0,0013	4,58
63	10428	6,93	32049	0,077	0,041	0,023	0,031	0,039	67,34%	0,264	0,223	0,275	0,190	0,236	18,35%	0,0037	6,09
64	10460	7,64	31209	0,088	0,074	0,050	0,057	0,066	29,15%	0,180	0,164	0,194	0,161	0,174	9,04%	0,0027	2,66
65	10518	8,01	29712	0,064	0,071	0,069	0,151	0,083	49,21%	0,172	0,206	0,210	0,257	0,209	17,86%	0,0130	2,52

66	10579	5.49	28376	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.223	0.275	0.171	0.205	0.216	21.79%	N.A.	N.A.
67	10602	7.63	28018	0.133	0.134	0.120	0.072	0.112	N.A.	0.327	0.273	0.335	0.269	0.299	12.28%	0.0036	2.68		
68	10642	8.86	27399	N.A.	0.032	0.030	N.A.	0.031	6.54%	0.213	0.117	0.172	0.159	0.162	28.13%	0.0004	5.23		
69	10669	7.26	26764	0.053	N.A.	0.044	N.A.	0.048	14.40%	0.206	0.197	0.262	0.185	0.210	16.56%	0.0034	4.37		
70	10679	6.88	26549	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.276	0.221	0.249	0.191	0.232	17.08%	N.A.	N.A.		
71	10688	8.18	26416	N.A.	0.046	0.040	0.041	0.042	7.60%	0.402	N.A.	0.236	0.183	0.259	49.53%	0.0138	6.12		
72	10695	4.62	26214	N.A.	0.094	0.026	0.062	0.053	92.60%	0.252	0.231	0.354	0.219	0.259	24.06%	0.0436	4.88		
73	10715	5.80	25631	0.088	0.048	0.065	0.063	0.065	28.40%	0.182	0.204	0.244	0.193	0.205	13.40%	0.0008	3.16		
74	10724	4.55	25258	0.140	0.086	0.086	0.172	0.115	42.09%	0.152	0.289	0.459	0.267	0.271	57.50%	0.0269	2.35		
75	10741	6.80	24784	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.240	0.224	0.298	0.206	0.240	17.14%	N.A.	N.A.		
76	10764	7.28	24268	0.090	0.055	0.053	N.A.	0.064	34.31%	0.645	0.592	0.673	0.527	0.607	11.37%	0.0030	9.43		
77	10784	8.10	23479	0.053	0.044	0.024	N.A.	0.038	52.60%	0.516	0.439	0.349	0.335	0.403	22.46%	0.0045	10.54		
78	10813	8.46	22302	0.661	0.463	0.955	0.916	0.719	40.07%	2.918	2.760	3.780	2.050	2.811	28.54%	0.0009	3.91		
79	10816	8.65	22244	1.339	0.497	0.159	0.192	0.377	166.61%	2.333	2.065	1.704	1.503	1.874	21.65%	0.0441	4.97		
80	10853	7.59	21040	0.099	0.100	0.047	0.066	0.074	44.04%	0.196	N.A.	0.182	0.204	0.194	5.84%	0.0119	2.61		
81	10933	5.03	17498	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.158	0.208	0.182	0.130	0.167	22.41%	N.A.	N.A.		
82	10967	7.18	17039	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1.418	1.408	1.553	1.123	1.366	14.81%	N.A.	N.A.		
83	10972	8.53	16880	0.030	0.039	0.024	0.046	0.034	33.42%	0.469	0.650	0.186	0.240	0.342	78.41%	0.0014	10.12		
84	10977	7.08	16798	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	1.510	1.498	1.677	1.247	1.475	13.09%	N.A.	N.A.		

Legende: Nr – Nummer in der Auswertung, ID – Identifikationsnummer im 2D-Gel, pl – isoelektrischer Punkt, MW (Da) – Molekulargewicht in Dalton,

l-1, 1-4. – Kennzeichnung der nicht-infizierten 2D-Gele, l-2, 1.-4. – Kennzeichnung der *E. bovis*-infizierten 2D-Gele, Avg. 1/2 – Mittelwert der jeweils vier

zusammengehörenden 2D-Gele, CV. 1/2 – Variationskoeffizient, je höher desto größer die Streuung der zugrundeliegenden Werte T.2 – student T-Test,

Fak.2

Tabelle III: Datenanalyse der hochregulierten Proteinspots in *E. bovis*-infizierten Wirtszellen und Ermittlung der zugehörigen Proteine (MALDI-TOF)

No.	ID	MW (Da)	pI (pH)	Average (n. inf.)	Average (inf.)	Faktor inf./n. inf.	P	Protein	Species	Accession number (SwissProt/ TrEMBL oder NCBI)	MW (Da) theor.	pI (pH) theor.	Auswertungsparameter: Mascot			
													E-Value	Mowse score	Mass values matched	Seq. cov. (%)
1	8463	122589	8,32	0,027	0,274	10,329		merozoit surface protein 1	<i>P. falciparum</i>	P13819	194683	6,08	0,003	54	15	8
2	8544	116618	6,65	0,037	0,165	4,515		heat shock protein 110	<i>T. parva</i>	gil171030334	96283	5,03	0,032	66	14	19
2								myosin-1	<i>M. musculus</i>	Q5SX40	224116	5,60	0,0022	74	22	13
3	8564	114916	8,55	0,041	0,459	11,323		myosin-A	<i>T. gondii</i>	O00934	93901	8,38	0,0021	55	16	18
4	8613	110587	4,85	N.A.	5,649	N.A.		GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2	<i>H. sapiens</i>	Q8IWJ2	185514	5,08	0,015	65	20	14
5	8690	103708	4,62	1,159	3,120	2,693		endoplasmic (Heat shock protein 90 kDa)	<i>B. taurus</i>	Q95M18	92654	4,76	4E-19	231	44	48
6	8700	103359	5,41	0,082	0,220	2,671		alpha-actinin-1	<i>B. taurus</i>	Q3B7N2	103486	5,25	6,3E-13	169	31	41
7	8702	103237	5,78	N.A.	0,406	N.A.		cathepsin C	<i>P. falciparum</i>	Q8LIJ9	81331	5,82	0,011	48	10	13
8	8709	102738	5,56	0,052	0,371	7,116										
9	8722	102353	6,93	0,067	0,180	2,668		merozoite surface protein 1	<i>P. falciparum</i>	P04933	188643	5,98	0,019	46	18	9
10	8836	94020	4,78	0,317	2,837	8,953		heat shock protein 90	<i>E. tenella</i>	O44001	82646	5,07	8,9E-17	189	36	41
11	8891	90032	6,78	0,131	0,365	2,789		caldesmon 1	<i>B. taurus</i>	gil27806279	62106	6,24	4,40E-11	161	25	48
12	8899	89121	6,17	0,084	0,186	2,224										
13	8908	88712	6,30	0,156	0,520	3,326		caldesmon 1	<i>B. taurus</i>	gil27806279	62106	6,24	5,50E-14	190	29	49
14	8919	88174	6,46	0,352	1,319	3,751		caldesmon 1	<i>B. taurus</i>	gil27806279	62106	6,24	5,50E-18	230	31	52
15	8923	87878	6,63	0,890	2,687	3,019		caldesmon 1	<i>B. taurus</i>	gil27806279	62106	6,24	3,50E-14	192	29	51
16	9003	82306	4,79	4,585	10,982	2,395		immunoglobulin heavy chain binding protein	<i>E. tenella</i>	gil1037176	77516	5,22	1,10E-05	101	20	29
17	9040	79608	5,11	0,046	0,183	4,010		heat shock 70kDa protein 5	<i>Bos taurus</i>	gil115495027	72470	5,07	2,20E-17	224	34	50
18	9067	77812	5,44	N.A.	0,834	N.A.	P	heat shock cognate 71 kDa	<i>B. taurus</i>	P19120	71423	5,49	8,00E-08	118	24	38
19	9081	76414	5,39	0,448	1,155	2,577		heat shock 70kDa protein 9B	<i>B. taurus</i>	gil17735995	73981	5,97	2,20E-08	134	28	42
20	9109	75007	4,89	0,487	1,603	3,289			<i>E. acervulina</i>	gil401829	70814	5,16	1,10E-16	211	34	51
21	9207	68870	5,02	0,250	1,247	4,993		heat shock protein	<i>P. falciparum</i>	gil133414603	357998	8,30	0,038	66	15	6
22	9231	67784	6,91	N.A.	0,153	N.A.		normocyte-binding protein 1	<i>T. thermophila</i>	gil118349033	43841	6,22	0,017	69	14	36
								hypothetical protein THERM_00312110								
								Keratin, type I cytoskeletal 10	<i>B. taurus</i>	P06394	54986	5,05	0,025	63	12	16
23	9333	63286	5,76	N.A.	0,332	N.A.		hypothetical protein THERM_00194530	<i>T. thermophila</i>	gil118367993	86490	9,63	0,00023	88	19	24
23	9333	63286	5,76	N.A.	0,332	N.A.		microtubule-associated protein tau	<i>P. pygmaeus</i>	Q5S6V2	79085	6,02	0,017	65	15	20
24	9334	63270	4,48	0,083	0,312	3,760		tubulin-tyrosine ligase family protein	<i>T. thermophila</i>	gil118374028	96909	5,53	0,00039	86	17	20
25	9341	63158	6,67	0,053	0,247	4,648										
26	9358	62577	5,38	0,224	0,611	2,729										
27	9371	62317	4,36	0,981	2,278	2,323		calreticulin	<i>B. taurus</i>	P52193	48180	4,31	1,60E-06	105	14	26
28	9429	60559	6,35	0,040	0,171	4,331		protein disulfide-isomerase A3	<i>B. taurus</i>	P38657	57293	6,23	0,00071	78	18	31
29	9446	60060	6,59	N.A.	0,328	N.A.		pyruvate kinase	<i>E. tenella</i>	O44006	58238	5,95	0,0054	51	13	27
30	9470	59279	7,58	N.A.	0,314	N.A.		glutamate dehydrogenase 1	<i>B. taurus</i>	P00366	61815	7,25	0,0002	84	17	36
31	9486	58776	8,17	0,081	0,355	4,359										

32	9490	58677	8,00	0,169	0,373	2,207		progesterone-induced-blocking factor phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase	<i>H. sapiens</i>	Q8WXW3	90035	5,77	0,0041	71	17	21
33	9505	58324	5,86	N.A.	0,176	N.A.			<i>H. sapiens</i>	gil109511192	121038	8,77	0,0018	85	18	14
34	9510	58258	6,02	N.A.	0,414	N.A.	P	enolase	<i>P. yoelii yoelii</i>	Q7RA60	49227	6,09	0,024	45	9	28
35	9511	58257	5,52	0,060	0,208	3,446		dysferlin	<i>M. musculus</i>	gil6572442	187913	5,40	0,014	76	14	10
36	9551	57022	7,13	0,062	0,217	3,476		vacuolar ATP synthase subunit B	<i>B. taurus</i>	P31408	56882	5,66	1,30E-11	156	23	49
37	9556	56904	5,49	0,054	0,387	7,109		D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<i>B. taurus</i>	Q5EAD2	57327	6,47	3,20E-15	192	26	49
38	9560	56836	6,58	0,142	0,577	4,051		desmin	<i>B. taurus</i>	O62654	53556	5,21	8,20E-19	235	31	64
39	9578	56407	7,75	0,124	0,410	3,317		aldehyde dehydrogenase	<i>B. taurus</i>	P20000	57129	7,55	1,60E-09	135	22	46
40	9618	55113	4,94	0,392	1,063	2,714		ATP synthase subunit alpha	<i>B. taurus</i>	P19483	59797	9,21	2,00E-14	184	28	53
41	9641	54488	6,28	N.A.	0,654	N.A.	P	tubulin alpha chain	<i>N. caninum</i>	Q71G51	50823	4,97	3,50E-08	103	19	47
42	9666	53455	4,38	0,179	0,730	4,073	P	desmin	<i>B. taurus</i>	O62654	53556	5,21	6,50E-11	156	23	51
43	9674	53218	7,58	0,109	0,318	2,919		cyclic nucleotide-binding domain containing protein	<i>T. thermophila</i>	gil118362470	92486	9,45	0,0016	79	16	22
44	9689	52520	5,90	0,128	0,304	2,382	P	calumenin	<i>H. sapiens</i>	O43852	37198	4,47	0,00017	85	14	49
45	9714	51731	6,22	0,272	0,731	2,691		elongation factor 1-alpha	<i>E. bovis</i>	Q07051	37709	9,12	0,00011	68	15	42
46	9724	51549	7,15	0,059	0,159	2,722		rab GDP dissociation inhibitor beta	<i>B. taurus</i>	P50397	50969	5,94	8,00E-08	118	23	50
47	9761	50731	4,38	0,327	0,735	2,250		elongation factor 1-alpha	<i>E. bovis</i>	Q07051	37709	9,12	8,90E-09	109	19	55
48	9899	46109	6,62	0,076	0,266	3,372		calumenin	<i>B. taurus</i>	Q310K1	37173	4,41	8,00E-08	118	17	61
49	10005	43131	6,18	0,049	0,237	4,887		isocitrate dehydrogenase	<i>B. taurus</i>	Q9XSG3	47098	6,13	1,60E-08	125	20	48
50	10057	41783	8,32	0,287	2,342	8,160										
51	10069	41410	7,85	0,709	1,859	2,621										
52	10070	41391	7,50	N.A.	0,377	N.A.		mezoctite surface protein 1	<i>P. falciparum</i>	P19598	193484	6,36	0,0036	53	11	8
53	10080	41082	8,09	1,236	3,611	2,921										
54	10105	40284	7,37	0,040	0,226	5,694										
55	10113	39946	6,72	N.A.	0,216	N.A.	P									
56	10138	39318	7,79	0,075	0,384	5,120										
57	10142	39227	6,06	0,120	0,432	3,610	P	ADP/ATP translocase 1	<i>M. musculus</i>	P48962	33111	9,73	0,013	66	11	35
58	10281	35973	8,67	N.A.	0,384	N.A.		malate dehydrogenase	<i>B. taurus</i>	Q32LG3	36102	8,82	2,50E-12	163	21	67
59	10301	35369	7,87	0,338	0,808	2,393	P	Mixture calponin-2 voltage-dependent anion-selective channel protein 2	<i>B. taurus</i>	Q3SYU6	33815	7,55	6,3E-15	189	26	49
60	10328	34715	5,61	N.A.	0,187	N.A.		mezoctite surface protein 3 a	<i>B. taurus</i>	P68002	32113	7,48	0,00047	80	16	46
61	10330	34672	5,00	N.A.	0,241	N.A.	P	sulfolipase 1G2	<i>P. vivax</i>	Q9D939	35159	7,67	0,018	64	13	31
62	10414	32310	6,10	0,041	0,188	4,580	P	Cysteine proteinase	<i>P. vivax</i>	P42666	66421	7,79	0,0034	53	11	16
63	10428	32049	6,93	0,039	0,236	6,090		alpha-soluble NSF attachment protein	<i>B. taurus</i>	P81125	33659	5,39	8,00E-07	108	14	60
64	10460	31209	7,64	0,066	0,174	2,658		hyphothetical protein Chno.70256	<i>C. hominis</i>	gil67614925	62563	9,17	0,032	66	10	19
65	10518	29712	8,01	0,083	0,209	2,520	P	hyphothetical protein XP_532413	<i>C. familiaris</i>	gil73975430	46970	6,34	0,0091	78	11	31

66	10579	28376	5.49	N.A.	0.216	N.A.		thioredoxin reductase putative ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	<i>P. falciparum</i>	Q25861	60390	7.81	0.013	47	9	15
67	10602	28018	7.63	0.112	0.299	2.684		enoyl-CoA hydratase	<i>B. taurus</i>	Q2KHU4	29914	8.33	0.0074	68	11	35
68	10642	27399	8.86	0.031	0.162	5.230	P	GTP-AMP phosphotransferase	<i>B. taurus</i>	Q56DM8	31565	8.82	1.40E-05	96	16	51
69	10669	26764	7.26	0.048	0.210	4.370	P	unnamed protein product nuclear distribution protein nucle homolog 1	<i>P. tetraurelia</i>	gil124403961	97428	9.16	0.01	71	9	11
70	10679	26549	6.88	N.A.	0.232	N.A.	P		<i>M. musculus</i>	Q9CZA6	38556	5.27	0.016	65	9	28
71	10688	26416	8.18	0.042	0.259	6.117		actin, cytoplasmic	<i>E. crassus</i>	P20360	43166	5.18	0.0073	50	8	22
72	10695	26214	4.62	0.053	0.259	4.881										
73	10715	25631	5.80	0.065	0.205	3.160		hypothetical protein TTHERM_00585380	<i>T. thermophila</i>	gil118400642	206983	8.91	0.0019	78	9	6
74	10724	25258	4.55	0.115	0.271	2.346		unnamed protein product mKIAA1990 protein (pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit)	<i>P. tetraurelia</i>	gil124394505	60664	6.01	0.00079	82	13	17
75	10741	24784	6.80	N.A.	0.240	N.A.			<i>M. musculus</i>	gil37360608	100990	6.06	0.0039	82	11	9
76	10764	24268	7.28	0.064	0.607	9.425	P									
77	10784	23479	8.10	0.038	0.403	10.537	P									
78	10813	22302	8.46	0.719	2.811	3.908		transgelin-2	<i>B. taurus</i>	Q5E9F5	22583	8.39	2.00E-11	154	23	88
79	10816	22244	8.65	0.377	1.874	4.965	P	transgelin-2	<i>B. taurus</i>	Q5E9F5	22583	8.39	8.00E-09	128	19	85
80	10853	21040	7.59	0.074	0.194	2.615	P									
81	10933	17498	5.03	N.A.	0.167	N.A.		FHA domain protein	<i>P. berghei</i>	gil68076471	103207	5.63	0.027	67	7	10
82	10967	17039	7.18	N.A.	1.366	N.A.		homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	<i>C. familiaris</i>	gil73949814	18864	7.03	0.19	65	7	44
83	10972	16880	8.53	0.034	0.342	10.117		merozoite surface protein 1	<i>P. falciparum</i>	P13827	26319	8.15	0.00031	63	8	42
84	10977	16798	7.08	N.A.	1.475	N.A.	P	14-3-3 protein homolog	<i>N. caninum</i>	Q25538	30802	4.77	0.047	42	7	27

Tabelle IV: Datenanalyse der runterregulierten Proteinspots in *E. bovis*-infizierten Wirtszellen und Ermittlung der zugehörigen Proteine (MALDI-TOF)

Nr.	ID	MW (Da)	pI (pH)	Average (n. int.)	Average (int.)	Faktor Int/n. Int.	P	Protein	Species	Accession number (SwissProt/ TrEMBL)	MW (Da) theor.	pI (pH) theor.	Auswertungsparameter: Mascot			
													E-Value	Mowse score	Mass values matched	Seq. cov. (%)
1	8414	132283	4.46	0.306	0.061	0.199	P	Integrin alpha-V	B. taurus	P80746	117142	5.55	7.30E-05	88	23	23
2	8423	129459	4.66	0.560	0.218	0.389		Integrin alpha-V	B. taurus	P80746	117142	5.55	4.00E-09	131	26	30
3	8477	120893	4.90	0.269	0.073	0.271		myosin-10	B. taurus	Q27991	229927	5.44	2.00E-20	244	39	25
4	8501	119064	4.37	0.202	N.A.	0.000		Mixture Integrin alpha-V Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	B. taurus H. sapiens	P80746 Q1KMD3	117142 85622	5.55 4.85	8e-11 0.00023 0.0033	148 83 72	37 20 19	21 26
5	8509	118631	5.67	0.323	0.085	0.263		matrin-3	B. taurus	gi 119895555	100538	5.71	1.80E-14	195	34	35
6	8688	103810	5.22	0.769	0.337	0.439		alpha-actinin-1	B. taurus	Q3B7N2	103486	5.25	1.034E-34	380	50	63
7	8693	103566	5.13	1.274	0.288	0.226	P	alpha-actinin-1	B. taurus	Q3B7N2	103486	5.25	8.00E-22	258	37	54
8	8707	102789	7.21	0.201	0.091	0.452		procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dio	B. taurus	gi 119885261	88438	6.42	1.10E-15	207	32	40
9	8710	102708	5.08	0.653	0.287	0.439		actinin, alpha 4	B. taurus	gi 119910351	105319	5.27	5.70E-28	330	45	54
10	8725	102287	7.53	0.188	0.075	0.400	P	elongation factor 2	B. taurus	Q3SYU2	96276	6.41	2.00E-18	224	38	44
11	8788	96155	5.65	0.232	0.067	0.287	P	gelosolin	B. taurus	gi 74356373	80966	5.54	1.80E-13	185	25	41
12	8790	96038	4.42	0.735	0.209	0.284	P	heat shock protein HSP 90-alpha	B. taurus	Q76LV2	85077	4.93	1.30E-15	196	33	46
13	8840	93851	4.52	0.642	N.A.	0.000	P	heat shock protein HSP 90-beta	B. taurus	Q76LV1	83543	4.97	3.20E-23	272	40	52
14	8858	92876	7.90	0.179	0.061	0.342	P	aconitate hydratase	B. taurus	P20004	86047	7.87	6.40E-21	249	33	48
15	8933	86977	7.07	0.254	0.108	0.426		Mixture caldesmon 1 transferrin	B. taurus B. taurus	gi 27806279 gi 114326282	62106 79856	6.24 6.75	1.8E-38 4.5e-18 5.7e-14	435 231 190	56 30 28	53 44
16	8952	85661	6.78	0.486	0.142	0.292		Mixture villin 2 caldesmon 1	B. taurus B. taurus	gi 27806351 gi 27806279	68832 62106	6.06 6.24	3.6e-14 2.3e-06	335 192 114	54 33 23	49 43
17	8974	84237	4.51	0.255	0.053	0.209	P	heat shock 70kDa protein 5	B. taurus	gi 115495027	72470	5.07	9.10E-28	328	38	55
18	8987	83497	6.34	0.261	0.101	0.387	P	moesin	B. taurus	Q2HJ49	68047	5.90	8.00E-18	218	36	52
19	9018	81294	6.83	0.156	0.060	0.388	P	lamin A/C	B. taurus	gi 77404182	65140	6.54	2.30E-18	234	35	57
20	9022	80757	6.99	0.317	0.065	0.204	P	lamin A/C	B. taurus	gi 77404182	65140	6.54	3.60E-26	312	39	59
21	9025	80704	7.25	0.551	0.189	0.343	P	lamin A/C	B. taurus	gi 77404182	65140	6.54	1.80E-28	335	43	60
22	9026	80512	7.38	0.431	0.191	0.443	P	lamin A/C	B. taurus	gi 77404182	65140	6.54	2.90E-29	343	44	63
23	9037	79815	7.53	0.790	0.227	0.287	P	lamin A/C	B. taurus	gi 77404182	65140	6.54	2.90E-37	423	49	64
24	9095	75613	5.85	0.562	0.149	0.265		Mixture annexin VI albumin	B. taurus B. taurus	gi 76623595 gi 30794280	84544 71274	5.86 5.82	2.9E-44 9.1e-18 5.7e-17	493 228 220	62 34 31	47 50
25	9103	75245	5.95	0.360	N.A.	0.000		serum albumin	B. taurus	P02769	71244	5.82	1.30E-16	206	29	48
26	9110	74997	5.64	0.342	0.115	0.336	P	serum albumin	B. taurus	P02769	71244	5.82	3.20E-07	112	19	35
27	9121	73986	4.95	0.999	0.137	0.137		Mixture lamin B1 lymphocyte cytosolic protein 1 (L- plastin)	P. troglodytes B. taurus	gi 114601440 gi 77736385	63281 70694	4.98 5.21	1.1E-46 4.5e-26 7.2e-14	517 311 189	71 44 32	55 50

28	9143	72750	5.21	0.360	0.131	0.345		Mixture vacuolar ATP synthase catalytic subunit A heat shock cognate 71 kDa protein lamin B2	<i>S. scrofa</i> <i>B. taurus</i>	Q29048 P19120	68617 71423	5.42 5.49	2e-09 0.0037 0.0052	134 71 70	30 16 15	23 26
29	9147	72553	8.64	0.649	N.A.	0.000	P	Mixture heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M serpin H1	<i>H. sapiens</i> <i>B. taurus</i>	P52272 Q2KJH6	77749 46591	8.84 9.01	4e-11 0.00023 0.028	151 83 62	29 19 10	30 32
30	9154	72244	5.29	0.371	N.A.	0.000		Mixture lamin B2 vacuolar H ⁺ -ATPase A	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	g l119895049 g l162705	68215 68803	5.35 5.41	2.9E-37 7.2E-20 7.2E-09	423 249 139	63 41 26	54 44
31	9165	71579	7.89	0.249	0.109	0.438	P	transketolase	<i>B. taurus</i>	Q6B855	68547	7.56	8.00E-10	138	19	36
32	9179	70899	4.84	0.621	0.329	0.530		lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plasin)	<i>B. taurus</i>	g l77736385	70694	5.21	2.30E-11	164	26	44
33	9220	68467	6.57	0.306	0.138	0.452	P	Mixture coatomer subunit delta stress-induced-phosphoprotein 1	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	P53619 g l78369310	57694 63070	5.89 6.08	1.8E-15 6.4E-08 0.00038	205 119 92	35 20 18	37 35
34	9243	67338	6.60	0.217	0.073	0.339	P	lamin A/C	<i>B. taurus</i>	g l77404182	65140	6.54	1.10E-18	237	33	50
35	9261	66545	5.23	0.279	0.097	0.348		heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	<i>B. taurus</i>	Q310D0	51272	5.14	1.30E-09	136	17	48
36	9262	66466	7.10	0.392	0.194	0.495	P	Mixture bifunctional purine biosynthesis protein very-long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase lamin A/C	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	Q0VCK0 P48818 g l77404182	65012 70987 65140	6.38 8.62 6.54	2.3E-31 4E-09 1.2E-05 9.1E-06	364 131 96 108	58 19 18 25	44 38 42
37	9266	66316	6.98	0.486	0.222	0.456	P	lamin A/C	<i>B. taurus</i>	g l77404182	65140	6.54	2.30E-32	374	47	64
38	9267	66251	6.87	0.738	0.177	0.240		lamin A/C	<i>B. taurus</i>	g l77404182	65140	6.54	3.60E-16	212	28	51
39	9269	66098	7.31	1.080	0.429	0.393	P	lamin A/C	<i>B. taurus</i>	g l77404182	65140	6.54	1.10E-24	297	36	53
40	9270	66029	7.18	0.893	0.261	0.292	P	lamin A/C	<i>B. taurus</i>	g l77404182	65140	6.54	1.10E-28	337	43	66
41	9271	65969	7.63	0.622	0.264	0.425	P	lamin A/C	<i>B. taurus</i>	g l77404182	65140	6.54	1.40E-22	276	41	61
42	9279	65592	7.48	1.809	0.303	0.168	P	lamin A/C	<i>B. taurus</i>	g l77404182	65140	6.54	1.40E-17	226	36	51
43	9292	64866	4.70	0.202	0.062	0.308		Rab GDP dissociation inhibitor alpha	<i>B. taurus</i>	P21856	51103	5.00	5.70E-06	100	17	44
44	9329	63414	5.38	0.243	N.A.	0.000	P	Caspase 8	<i>B. taurus</i>	g l114051073	57398	5.51	0.017	75	18	36
45	9359	62573	7.85	0.239	N.A.	0.000		Mixture LOC512571 (Pyruvate kinase) U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	g l73587283 Q3MHE2	62016 59047	8.62 7.06	7.2E-36 1.4E-25 8.4E-06	409 306 98	51 37 15	64 41
46	9363	62475	6.50	0.426	0.223	0.525		Mixture protein disulfide-isomerase A3 LOC525335 (K-glutaminase)	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	P38657 g l18151024	57293 67025	6.23 8.23	3.6E-43 3.2E-25 1.1E-08	482 292 137	57 35 22	64 46
47	9376	62278	7.56	0.287	N.A.	0.000		Catalase	<i>B. taurus</i>	P00432	60106	6.78	0.003	72	14	32
48	9379	62137	7.51	0.284	0.141	0.497		Mixture catalase tyrosyl-tRNA synthetase	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	P00432 Q28465	60106 59397	6.78 7.56	1.3E-33 2E-23 2.3E-05	376 274 93	47 30 18	59 36
49	9385	61861	6.33	2.880	1.125	0.391		Protein disulfide-isomerase A3	<i>B. taurus</i>	P38657	57293	6.23	5.00E-27	310	38	65

50	9402	61192	8,61	0,259	0,052	0,202	Mixture non-POU domain-containing octamer-binding protein	<i>Homo sapiens Bos taurus</i>	Q15233 Q2KJH6	54311 46591	9,01 9,01	8E-21 1,3e-07 8e-07	248 116 108	42 23 19	46 47
51	9481	59070	6,66	0,312	0,123	0,395	P LOC513868 (Nuclear matrix protein 200 serpin H1)	<i>B. taurus</i>	g 115497226 Q3SYV4	55617 51583	6,14 7,16	9,10E-10 1,00E-14	148 187	21 26	55
52	9498	58516	7,78	0,784	0,413	0,526	P Mixture adenylyl cyclase-associated protein 1	<i>C. griseus B. taurus</i>	P68983 Q3MHL3	50095 47911	4,78 4,74	1,3E-26 1,6e-16 5,8e-05	306 205 89	37 25 13	57 31
53	9521	57899	4,54	0,456	0,135	0,296	Mixture tubulin beta-5 chain histone-binding protein RBBP4	<i>M. musculus B. taurus</i>	g 174204140 g 114052148	50072 50324	4,75 4,76	9,1E-30 5,7e-21 1,8e-12	348 260 175	53 36 29	71 61
54	9543	57150	4,72	5,980	2,637	0,441	Mixture tubulin beta 5 LOC534206 (Tubulin beta 6)	<i>B. taurus</i>	P19483 Q07130	59797 57039	9,21 7,68	5E-34 8e-15 2,5e-14	380 188 183	52 26 28	54 50
55	9567	56646	8,03	0,308	N.A.	0,000	Mixture ATP synthase subunit alpha UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 2	<i>B. taurus</i>	g 119914925 g 78369494	50464 49086	6,02 6,35	1,1e-22 9,1e-15 9,3e-05	277 198 98	43 29 16	61 44
56	9604	55703	6,81	0,169	0,050	0,297	Mixture TIP49 sepin 11	<i>B. taurus</i>	Q9XSJ4 Q9Y2J8	47639 76257	6,37 5,40	8,00E-10 0,032	138 62	22 13	53
57	9705	51953	6,89	0,791	0,298	0,377	P alpha-enolase	<i>B. taurus</i>	g 110347570 g 95769122	53752 50598	5,06 6,33	5,70E-25 1,80E-21	300 265	41 31	65 68
58	9711	51806	5,82	0,284	0,153	0,537	P protein-arginine deiminase type-2	<i>H. sapiens</i>	Q2NL22 g 77735667	47096 50163	6,30 8,87	2,00E-22 2,90E-13	264 183	27 27	78 53
59	9731	51332	4,70	0,888	0,186	0,210	vimentin	<i>B. taurus</i>	g 110347570 g 76620242	53752 32999	5,06 8,23	1,10E-23 0,0026	287 83	42 15	61 33
60	9748	51008	6,85	0,541	0,185	0,341	eukaryotic translation elongation factor	<i>B. taurus</i>	P60712	42052	5,29	0,25	53	10	32
61	9770	50076	6,76	0,310	0,099	0,318	probable ATP-dependent RNA helicase	<i>B. taurus</i>	g 110347570 g 77735631	53752 48444	5,06 6,10	1,10E-23 0,011	287 77	42 13	61 35
62	9824	48129	8,10	0,233	N.A.	0,000	acyl-CoA thioesterase 9	<i>B. taurus</i>	g 110347570 g 122692301	53752 41921	5,06 7,36	9,1E-33 5,70E-08	378 130	55 15	64 40
63	9825	48099	4,61	3,025	0,426	0,141	vimentin	<i>B. taurus</i>	Q3T0P6 Q04467	52587 44908	5,21 8,48	3,6e-23 5,1e-24 2e-09	282 280 134	40 36 25	64 73 46
64	9844	47843	5,49	0,340	0,164	0,481	beta-actin	<i>B. taurus</i>	P26452 P48616	53701 32977	5,20 4,80	1,3e-06 1,8E-19	106 245	18 33	58 62
65	9849	47693	7,40	0,164	0,071	0,432	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	<i>B. taurus</i>	Q2K1W6	44331	6,74	3,20E-10	142	26	58
66	9863	47275	6,26	2,052	0,922	0,449	LOC505323 (Ornithine aminotransferase)	<i>B. taurus</i>	P61160 Q5E9A3	45017 37987	6,30 6,66	2,5e-16 4e-07 0,00034	203 111 82	34 23 11	42 50
67	9877	46795	4,62	0,327	0,105	0,320	Mixture vimentin	<i>B. taurus</i>	Q5E9A3 Q98729	37987 36704	6,66 9,04	1,6e-06 0,0031	105 72	16 13	59 34
68	9941	44955	7,58	0,177	0,064	0,360	LOC504957(alpha-2-macroglobulin rec)	<i>B. taurus</i>							
69	9948	44711	8,65	0,358	0,095	0,265	Mixture phosphoglycerate kinase 1 isocitrate dehydrogenase	<i>B. taurus</i>							
70	9956	44530	4,62	0,407	0,133	0,327	Mixture 40S ribosomal protein SA	<i>B. taurus</i>							
71	9971	44040	7,78	0,246	0,053	0,216	26S protease regulatory subunit S10B	<i>B. taurus</i>							
72	9992	43429	6,87	0,260	0,088	0,337	Mixture actin-like protein 2	<i>H. sapiens B. taurus</i>							
73	10013	42968	7,06	0,242	0,040	0,166	Mixture poly(IG)-binding protein 1	<i>B. taurus</i>							
74	10018	42876	6,46	0,153	0,045	0,295	P Mixture poly(IG)-binding protein 1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	<i>B. taurus H. sapiens</i>							

75	10019	42806	6,74	0,555	0,151	0,272	P	gelisolin-like capping protein	<i>B. taurus</i>	gi130466254	39137	6,17	2,90E-09	143	17	58
76	10022	42676	7,44	0,306	0,112	0,367	P	poly(C)-binding protein 1	<i>B. taurus</i>	Q5E9A3	37987	6,66	1,30E-09	136	21	74
77	10025	42622	4,81	0,509	0,113	0,222	P	tropomodulin 3	<i>B. taurus</i>	gi115496236	38267	4,92	7,20E-11	159	20	55
78	10028	42543	4,27	0,172	0,044	0,285	P	SET	<i>B. taurus</i>	gi13953617	24348	4,97	0,00095	88	11	49
79	10046	42182	8,44	0,159	N.A.	0,000	P	fructose-1,6-bisphosphate aldolase A	<i>B. taurus</i>	gi119916947	52018	9,08	7,20E-06	109	16	44
80	10055	41914	7,70	0,241	N.A.	0,000	P	growth hormone-like protein 1	<i>Alouatta seniculi</i>	gi158339172	25240	5,33	0,031	73	9	56
81	10090	40915	4,79	0,618	0,259	0,419	P	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C serine/threonine kinase receptor associated protein	<i>C. familiaris</i> <i>B. taurus</i>	gi173977325 gi162751962	27820 38746	4,55 4,99	5,7e-17 1,8e-06 0,00012	220 115 97	32 18 14	58 50
82	10108	40159	6,42	0,713	0,299	0,420	P	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	<i>B. taurus</i>	gi109939980	40128	6,76	1,40E-12	176	25	56
83	10124	39745	4,60	4,256	1,906	0,448	P	beta-tropomyosin	<i>S. scrofa</i>	gi183778524	33383	4,62	0,005	81	14	42
84	10132	39430	8,11	0,224	0,037	0,166	P	Mixture								
85	10145	39189	5,41	0,183	0,034	0,184	P	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2 beta-actin	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	Q5E966 P60712	36849 42052	5,38 5,29	4e-10 1,5e-05	248 141 95	36 20 16	66 42
86	10167	38468	5,57	0,465	0,155	0,333	P	Mixture 60S acidic ribosomal protein P0 F-actin capping protein subunit alpha-1	<i>B. taurus</i> <i>H. sapiens</i>	Q95140 P52907	34520 33073	5,71 5,45	8,1e-11 0,00014 0,031	148 86 62	20 12 8	49 43
87	10174	38327	7,26	0,415	0,099	0,239	P	PDZ and LIM domain protein 1	<i>B. taurus</i>	Q5E9E1	36314	6,76	0,00053	80	11	44
88	10179	38252	7,00	0,312	0,074	0,238	P	Mixture heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 LOC512571 (pyruvate kinase)	<i>H. sapiens</i> <i>B. taurus</i>	gi14141157 gi119902010	36960 58994	6,37 7,96	5,7e-17 9,1e-08 0,00023	220 128 94	34 19 16	64 34
89	10185	38096	6,45	0,207	0,094	0,454	P	Mixture annexin I phosphopantetheinyl transferase	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	gi173853762 gi176662301	39212 35892	6,37 6,27	2,3E-24 7,2e-16 0,037	294 209 72	37 25 12	67 38
90	10195	37880	6,76	1,091	0,454	0,416	P	Annexin A1	<i>B. taurus</i>	P46193	39212	6,37	3,20E-17	212	26	64
91	10197	37858	8,72	0,565	N.A.	0,000	P	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	<i>B. taurus</i>	Q2HJ60	36041	8,67	2,50E-14	183	26	58
92	10198	37855	5,55	0,448	0,169	0,377	P	Mixture capping protein alpha subunit ribosomal protein, large, P0	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	gi161821551 gi160592767	33082 34520	5,53 5,71	2,3E-21 9,1e-08 5,7e-07	264 128 120	30 16 14	69 51
93	10201	37757	8,32	3,110	1,234	0,397	P	glyceraldehyde-3-phosphate dehydroge	<i>B. taurus</i>	P10096	36073	8,50	6,40E-12	159	27	63
94	10206	37692	8,78	0,617	0,298	0,482	P	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	<i>H. sapiens</i>	P22626	37464	8,97	4,00E-08	121	18	45
95	10225	37211	5,62	0,167	0,090	0,541	P	F-actin capping protein subunit alpha-2	<i>B. taurus</i>	Q5E997	33073	5,57	2,00E-08	124	14	65
96	10242	36690	4,77	0,282	0,080	0,283	P	Mixture eukaryotic translation elongation factor 1 delta (fragment) tropomyosin 1 alpha chain	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	gi119906216 gi161888866	70725 32732	6,30 4,69	2,3e-13 0,0036 0,0053	184 82 80	27 17 13	27 40
97	10246	36594	7,54	6,586	2,680	0,407	P	annexin A2	<i>B. taurus</i>	P04272	38873	6,92	1,30E-18	226	31	72
98	10270	36087	6,70	0,223	0,111	0,500	P	glypican 4	<i>B. taurus</i>	gi119919671	63460	5,85	9,30E-05	98	15	30

99	10277	36024	6.39	0.454	0.202	0.445	P	Mixture L-lactate dehydrogenase B chain 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 malate dehydrogenase	<i>B. taurus</i> <i>H. sapiens</i> <i>B. taurus</i>	Q5E9B1 O00487 Q3T145	36985 34726 36700	6.02 6.06 6.16	1.6E-23 2.5E-08 0.0049 0.011	275 123 70 66	45 19 14 13	54 62 41
100	10284	35637	8.40	0.660	0.152	0.230		Mixture heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 malate dehydrogenase	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	Q2HJ60 Q32LG3	36041 36102	8.67 8.82	8.1E-29 2.5E-12 3.2E-12	328 163 162	36 20 18	51 56
101	10287	35798	6.84	0.629	0.257	0.409		Mixture heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 malate dehydrogenase protein SIX6O51	<i>M. musculus</i>	Q9GCTN5	67339	5.45	0.0027	73	14	24
102	10293	35646	8.60	0.622	0.244	0.393		Mixture heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 malate dehydrogenase	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	Q2HJ60 Q32LG3	36041 36102	8.67 8.82	2.5E-18 1.6E-09 6.4E-05	223 135 89	26 15 12	44 41
103	10300	35385	8.20	1.080	0.453	0.420	P	L-lactate dehydrogenase A chain	<i>B. taurus</i>		36916	8.12	4.00E-13	171	26	57
104	10303	35341	8.55	0.842	N.A.	0.000		Mixture heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 malate dehydrogenase	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	Q2HJ60 Q32LG3	36041 36102	8.67 8.82	8.1E-25 8.1E-15 6.4E-07	288 188 109	36 22 16	60 54
105	10331	34671	4.68	0.838	0.318	0.380	P	Mixture annexin A5 tropomyosin-1 alpha chain	<i>B. taurus</i> <i>M. musculus</i>	P81287	36124 32718	4.86 4.69	8.1E-21 1.3E-09 5.3E-06	248 136 100	35 18 17	52 40
106	10347	34135	7.67	0.606	0.218	0.360		L-xylose reductase	<i>Mus musculus</i>	Q91X52	25958	6.82	0.017	65	7	27
107	10359	33662	7.34	0.621	0.253	0.407		voltage-dependent anion-selective chan	<i>B. taurus</i>	P68002	32113	7.48	1.30E-09	136	16	68
108	10364	33578	4.71	0.420	0.136	0.324		annexin A5	<i>B. taurus</i>	P81287	36124	4.86	6.40E-15	189	26	62
109	10373	33417	7.86	1.567	0.486	0.310		voltage-dependent anion-selective chan	<i>B. taurus</i>	P68002	32113	7.48	1.60E-10	145	17	76
110	10465	31123	7.86	0.177	N.A.	0.000		Hsp90 co-chaperone Cdc37	<i>M. musculus</i>	Q61081	45078	5.24	0.0075	68	12	33
111	10468	31046	5.36	0.205	N.A.	0.000		progesterone-induced blocking factor 1	<i>P. troglodytes</i>	gl114650046	89934	5.75	0.011	77	13	17
112	10479	30762	8.55	0.317	0.114	0.361	P	vimentin (fragment) voltage-dependent anion-selective chan	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	Q9MZ13 gl119902680	53752 43552	5.06 8.95	2.90E-13 0.00034	183 82	26 11	39 51
113	10483	30713	8.67	0.217	0.083	0.383		galactose-specific lectin (fragment) voltage-dependent anion-selective chan	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	Q9MZ13 Q9MZ13	31062	8.95	0.00052 0.00015	90 85	14 12	27 52
114	10507	29956	5.44	0.535	0.254	0.475	P	Mixture prohibitin beta-actin	<i>B. taurus</i> <i>B. taurus</i>	Q3T165 P60712	29843 42052	5.57 5.29	3.2E-22 1.6E-14 0.00034	262 185 82	29 18 11	75 36
115	10516	29757	5.59	0.348	0.090	0.259	P	chloride intracellular channel protein 4	<i>B. taurus</i>	Q9XSA7	28937	5.60	2.50E-16	203	26	78
116	10532	29336	8.39	0.166	N.A.	0.000	P	ras suppressor protein 1	<i>B. taurus</i>	Q5E9C0	31518	8.56	7.00E-05	89	11	52
117	10537	29224	4.59	1.185	0.501	0.423	P	14-3-3 protein theta	<i>B. taurus</i>	Q3SZL4	28032	4.68	8.10E-09	128	18	65
118	10538	29220	6.50	0.643	0.136	0.212		high mobility group protein B1	<i>B. taurus</i>	P10103	25063	5.62	0.00017	85	14	46
119	10540	29183	6.74	0.343	0.156	0.456	P	high mobility group protein B1	<i>B. taurus</i>	P10103	25063	5.62	0.081	58	9	31
120	10557	28786	7.42	0.626	0.291	0.463		phosphoglycerate mutase 1	<i>B. taurus</i>	Q3S262	29948	6.67	3.20E-17	212	26	83
121	10596	28063	5.61	0.241	0.092	0.383	P	peroxiredoxin-4	<i>B. taurus</i>	Q9BG12	30950	6.01	2.00E-06	104	12	57
122	10632	27502	9.19	0.444	0.056	0.126	P	cysteine-rich protein 2	<i>B. taurus</i>	Q0VF18	23417	9.01	0.00015	85	11	62
123	10646	27247	7.48	0.421	0.114	0.271		triosephosphate isomerase	<i>B. taurus</i>	Q5E956	28901	6.45	2.50E-13	173	19	77
124	10655	27126	7.37	0.180	0.053	0.295										
125	10668	26774	7.69	0.396	0.075	0.190		GTP-binding nuclear protein Ran	<i>B. taurus</i>	Q3T054	24579	7.01	1.00E-07	117	15	55

126	10739	24813	5.02	0.328	0.150	0.459	P	Mixture peroxiredoxin-2 apolipoprotein A-I 60S ribosomal protein L9	B. taurus B. taurus B. taurus	Q9BG13 P15497 Q3SYR7	22217 30258 21977	5.37 5.71 9.96	1.6E-21 5.1e-07 0.00064 0.0012	255 110 79 76	31 11 12 9	57 40 57
127	10767	24082	7.78	0.180	N.A.	0.000	P									
128	10779	23589	4.58	0.172	N.A.	0.000	P	vimentin (fragment)	C. aethiops	P84198	53733	5.06	6.40E-07	109	15	25
129	10782	23529	8.72	1.080	N.A.	0.000	P	transgelin	B. taurus	Q9TS87	22641	8.87	1.30E-15	196	27	84
130	10880	19880	8.09	0.782	0.101	0.129		10 kDa heat shock protein	B. taurus	P61603	10925	8.89	0.015	65	7	66
131	10907	18378	6.99	0.231	0.046	0.200	P									
132	10921	18124	4.08	2.680	N.A.	0.000	P	myosin regulatory light chain 2	B. taurus	Q5E9E2	19910	4.67	0.00047	80	15	80
133	10930	17550	4.36	0.525	N.A.	0.000	P	nonhistone chromosomal protein HMG-	B. taurus	P02316	10825	9.49	0.035	62	6	46
134	10993	16490	8.84	1.414	N.A.	0.000	P	histone H2B type 1	B. taurus	P62808	13898	10.31	0.29	52	10	48
135	11000	16454	4.51	0.610	0.095	0.155	P	40S ribosomal protein S17	C. familiaris	P63273	15571	9.85	0.0013	76	10	70
136	11071	15856	9.19	2.610	0.035	0.014	P	UHRF1-binding protein 1 (fragment)	H. sapiens	Q6BDS2	160582	5.75	3.80E-05	91	11	5
137	11088	15656	4.42	5.372	1.532	0.285	P	histone H2B type 1-D	H. sapiens	P58676	13928	10.31	0.0056	70	12	63

P - Phosphorylierung

Literaturverzeichnis

- Adams, J. C. (1997): Thrombospondin-1. *Int.J Biochem. Cell Biol.*; 29, 6: 861-865.
- Adams, J. C. and Lawler J. (2004): The thrombospondins. *Int.J Biochem. Cell Biol.*; 36, 6: 961-968.
- Adams, J. C. and Tucker R. P. (2000): The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev.Dyn.*; 218, 2: 280-299.
- Adjogble, K. D., Mercier C., Dubremetz J. F., Hucke C., Mackenzie C. R., Cesbron-Delauw M. F., and Daubener W. (2004): GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int.J Parasitol.*; 34, 11: 1255-1264.
- Adolph, K. W. (2001): A thrombospondin homologue in *Drosophila melanogaster*. cDNA and protein structure. *Gene*; 269, 1-2: 177-184.
- Aga, E., Katschinski D. M., van Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Muller K., Solbach W., and Laskay T. (2002): Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.*; 169, 2: 898-905.
- Alexander, D. L., Mital J., Ward G. E., Bradley P., and Boothroyd J. C. (2005): Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS.Pathog.*; 1, 2: e17-
- Altschul, S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*; 25, 17: 3389-3402.
- Asai, T., Miura S., Sibley L. D., Okabayashi H., and Takeuchi T. (1995): Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol.Chem.*; 270, 19: 11391-11397.
- Asai, T., O'Sullivan W. J., and Tatibana M. (1983): A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Purification, some properties, and activation by thiol compounds. *J Biol.Chem.*; 258, 11: 6816-6822.
- Barta, J. R. (1989): Phylogenetic analysis of the class Sporozoa (phylum Apicomplexa Levine, 1970): evidence for the independent evolution of heteroxenous life cycles. *J Parasitol.*; 75, 2: 195-206.
- Beere, H. M. (2005): Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin.Invest*, 115, 10: 2633-2639.

- Beere, H. M., Wolf B. B., Cain K., Mosser D. D., Mahboubi A., Kuwana T., Tailor P., Morimoto R. I., Cohen G. M., and Green D. R. (2000): Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat.Cell Biol.*; 2, 8: 469-475.
- Behrendt, J. H., Clauss W., Zahner H., and Hermosilla C. (2004): Alternative mechanism of *Eimeria bovis* sporozoites to invade cells *in vitro* by breaching the plasma membrane. *J.Parasitol.*; 90, 5: 1163-1165.
- Behrendt, J. H., Taubert A., Zahner H., and Hermosilla C. (2008): Studies on synchronous egress of coccidian parasites (*Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria bovis*) from bovine endothelial host cells mediated by calcium ionophore A23187. *Vet.Res.Comm.*; 32, 4: 325-332.
- Bement, W. M. and Mooseker M. S. (1995): TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell Motil.Cytoskeleton*; 31, 2: 87-92.
- Bergman, L. W., Kaiser K., Fujioka H., Coppens I., Daly T. M., Fox S., Matuschewski K., Nussenzweig V., and Kappe S. H. (2003): Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. *J Cell Sci.*; 116, Pt 1: 39-49.
- Blom, N., Gammeltoft S., and Brunak S. (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol.Biol.*; 294, 5: 1351-1362.
- Bohn, W., Wiegers W., Beuttenmuller M., and Traub P. (1992): Species-specific recognition patterns of monoclonal antibodies directed against vimentin. *Exp.Cell Res.*; 201, 1: 1-7.
- Boothroyd, J. C. and Dubremetz J. F. (2008): Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat.Rev.Microbiol.*; 6, 1: 79-88.
- Bowman (1999): Georgis' Parasitology for Veterinarians. 7th,
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*; 72, 248-254.
- Brecht, S., Carruthers V. B., Ferguson D. J., Giddings O. K., Wang G., Jakle U., Harper J. M., Sibley L. D., and Soldati D. (2001): The *Toxoplasma* micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J Biol.Chem.*; 276, 6: 4119-4127.
- Brenner, S. L. and Korn E. D. (1980): The effects of cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization. *J Biol.Chem.*; 255, 3: 841-844.
- Brossier, F., Jewett T. J., Sibley L. D., and Urban S. (2005): A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 102, 11: 4146-4151.

- Brown, P. J., Gill A. C., Nugent P. G., McVey J. H., and Tomley F. M. (2001): Domains of invasion organelle proteins from apicomplexan parasites are homologous with the Apple domains of blood coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein and are members of the PAN module superfamily. *FEBS Lett.*; 497, 1: 31-38.
- Brown, P. J., Mulvey D., Potts J. R., Tomley F. M., and Campbell I. D. (2003): Solution structure of a PAN module from the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *J Struct.Funct.Genomics*; 4, 4: 227-234.
- Bumstead, J. and Tomley F. (2000): Induction of secretion and surface capping of microneme proteins in *Eimeria tenella*. *Mol.Biochem.Parasitol.*; 110, 2: 311-321.
- Bürger, H.-J. (1983): *Eimeria*-Infektionen beim Rind. *Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.*; 96, 350-357.
- Cain, S. A., Baldock C., Gallagher J., Morgan A., Bax D. V., Weiss A. S., Shuttleworth C. A., and Kielty C. M. (2005): Fibrillin-1 interactions with heparin. Implications for microfibril and elastic fiber assembly. *J Biol.Chem.*; 280, 34: 30526-30537.
- Carruthers, V. B., Moreno S. N., and Sibley L. D. (1999): Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca²⁺] and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Biochem.J.*; 342 (Pt 2), 379-386.
- Carruthers, V. B., Sherman G. D., and Sibley L. D. (2000): The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J Biol.Chem.*; 275, 19: 14346-14353.
- Carruthers, V. B. and Sibley L. D. (1997): Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur.J Cell Biol.*; 73, 2: 114-123.
- Carruthers, V. B. and Sibley L. D. (1999): Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol.Microbiol.*; 31, 2: 421-428.
- Carruthers, V. B. and Tomley F. M. (2008): Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell.Biochem.*; 47, 33-45.
- Cesbron-Delauw, M. F., Guy B., Torpier G., Pierce R. J., Lenzen G., Cesbron J. Y., Charif H., Lepage P., Darcy F., Lecocq J. P., and . (1989): Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 86, 19: 7537-7541.
- Chaturvedi, S., Qi H., Coleman D., Rodriguez A., Hanson P. I., Striepen B., Roos D. S., and Joiner K. A. (1999): Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J Biol.Chem.*; 274, 4: 2424-2431.

- Chen, H., Herndon M. E., and Lawler J. (2000): The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol.*; 19, 7: 597-614.
- Chen, X. M., Levine S. A., Splinter P. L., Tietz P. S., Ganong A. L., Jobin C., Gores G. J., Paya C. V., and LaRusso N. F. (2001): *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology*, 120, 7: 1774-1783.
- Cheng, S. C., Tarn W. Y., Tsao T. Y., and Abelson J. (1993): PRP19: a novel spliceosomal component. *Mol. Cell Biol.*; 13, 3: 1876-1882.
- Chien, C. T., Bartel P. L., Sternglanz R., and Fields S. (1991): The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 88, 21: 9578-9582.
- Chobotar, B. and Scholtyseck E. (1982): Ultrastructure. University Park Press, Baltimore, 101-155.
- Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*; 16, 22: 10881-10890.
- Crompton, M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem.J*, 341 (Pt 2), 233-249.
- Danforth, H. D., Augustine P. C., Ruff M. D., McCandliss R., Strausberg R. L., and Likel M. (1989): Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites. *Poult. Sci.*; 68, 12: 1643-1652.
- del Cacho, E., Gallego M., Lopez-Bernad F., Quilez J., and Sanchez-Acedo C. (2004): Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. *Vet.Parasitol*, 125, 3-4: 287-300.
- Dessaige, F., Hilaly S., Baumgartner M., Blumen B., Werling D., and Langsley G. (2005): c-Myc activation by *Theileria* parasites promotes survival of infected B-lymphocytes. *Oncogene*; 24, 6: 1075-1083.
- Dessens, J. T., Beetsma A. L., Dimopoulos G., Wengelnik K., Crisanti A., Kafatos F. C., and Sinden R. E. (1999): CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *EMBO J*, 18, 22: 6221-6227.
- Di Cristina, M., Spaccapelo R., Soldati D., Bistoni F., and Crisanti A. (2000): Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol.Cell Biol.*; 20, 19: 7332-7341.
- Dobbelaere, D. and Heussler V. (1999): Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *T. annulata*. *Annu.Rev.Microbiol.*; 53, 1-42.

- Dobbelaere, D. A. and Kuenzi P.** (2004): The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host-pathogen interactions. *Curr.Opin.Immunol.*; 16, 4: 524-530.
- Dowse, T. and Soldati D.** (2004): Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr.Opin.Microbiol.*; 7, 4: 388-396.
- Dreyfuss, G., Matunis M. J., Pinol-Roma S., and Burd C. G.** (1993): hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu.Rev.Biochem.*; 62, 289-321.
- Dubremetz, J. F.** (2007): Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell Microbiol.*; 9, 4: 841-848.
- Dubremetz, J. F., Garcia-Reguet N., Conseil V., and Fourmaux M. N.** (1998): Apical organelles and host-cell invasion by apicomplexa. *Int.J.Parasitol.*; 28, 1007-1013.
- Dubremetz, J. F. and Schwartzman J. D.** (1993): Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res.Immunol.*; 144, 1: 31-33.
- Dyachenko, V.** (2006): Identifizierung einer Poteinkinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne bei *Eimeria bovis* und Studien zu ihrer Lokalisation im Parasiten. *Dissertation der Justus-Liebig-Universität, Giessen.*
- El Hallous, E., Sasaki T., Hubmacher D., Getie M., Tiedemann K., Brinckmann J., Batge B., Davis E. C., and Reinhardt D. P.** (2007): Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *J Biol.Chem.*; 282, 12: 8935-8946.
- Ellis, R. J.** (1990): The molecular chaperone concept. *Semin.Cell Biol.*; 1, 1: 1-9.
- Ernst, J. V. and Benz G. W.** (1986): Intestinal coccidiosis in cattle. *Vet.Clin.North Am.Food Anim.Pract.*; 2, 2: 283-291.
- Ferguson, D. J., Birch-Andersen A., Hutchinson W. M., and Siim J. C.** (1978): Light and electron microscopy on the sporulation of the oocysts of *Eimeria brunetti*. II. Development into the sporocyst and formation of the sporozoite. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.[B]*; 86, 1: 13-24.
- Fiege, N., Klatte D., Kollmann D., Zahner H., and Burger H. J.** (1992): *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitol Res.*; 78, 1: 32-38.
- Fields, S. and Song O.** (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*; 340, 6230: 245-246.
- Fitzgerald, P. R.** (1980): The economic impact of coccidiosis in domestic animals. *Adv.Vet.Sci.Comp Med.*; 24, 121-143.

- Flanagan, M. D. and Lin S. (1980): Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J Biol.Chem.*; 255, 3: 835-838.
- Fourmaux, M. N., Achbarou A., Mercereau-Puijalon O., Biderre C., Briche I., Loyens A., Odberg-Ferragut C., Camus D., and Dubremetz J. F. (1996): The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol.Biochem.Parasitol*, 83, 2: 201-210.
- Garcia-Reguet, N., Lebrun M., Fourmaux M. N., Mercereau-Puijalon O., Mann T., Beckers C. J., Samyn B., Van Beeumen J., Bout D., and Dubremetz J. F. (2000): The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol.*; 2, 4: 353-364.
- Gaskins, E., Gilk S., DeVore N., Mann T., Ward G., and Beckers C. (2004): Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol.*; 165, 3: 383-393.
- Georgopoulos, C. and Welch W. J. (1993): Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu.Rev.Cell Biol.*; 9, 601-634.
- Gething, M. J. and Sambrook J. (1992): Protein folding in the cell. *Nature*; 355, 6355: 33-45.
- Goddette, D. W. and Frieden C. (1986): Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J Biol.Chem.*; 261, 34: 15974-15980.
- Graat, E. A., Henken A. M., Ploeger H. W., Noorhuizen J. P., and Vertommen M. H. (1994): Rate and course of sporulation of oozyste of *Eimeria acervulina* under different enviromental conditions. *Parasitology*, 108, 5: 497-502.
- Gräfner, G., Graubmann H.-D., Schwar K., Hiepe T. H., and Kron A. (1985): Weitere Untersuchungen zu Vorkommen, Epizootologie und Bekämpfung der *Eimeria*-Kokzidiose des Rindes unter den Bedingungen der intensiven Stallhaltung. *Mh.Vet.Med.*; 40, 41-44.
- Grey, M., Dusterhoft A., Henriques J. A., and Brendel M. (1996): Allelism of PSO4 and PRP19 links pre-mRNA processing with recombination and error-prone DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*; 24, 20: 4009-4014.
- Gruenbaum, Y., Wilson K. L., Harel A., Goldberg M., and Cohen M. (2000): Review: nuclear lamins-- structural proteins with fundamental functions. *J Struct.Biol.*; 129, 2-3: 313-323.
- Gupta, R. (2001): Prediction of glycosylation sites in proteomes: from post-translational modifications to protein function. *Dissertation an der CBS*;
- Gupta, R., Jung E., and Brunak S. (2004): Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.

- Gupta, R. and S.Brunak** (2002): Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 7, 310: 322-
- Gustafson, P. V., Agar H. D., and Cramer D. I.** (1954): An electron microscope study of *Toxoplasma*. *Am.J Trop.Med.Hyg.*; 3, 6: 1008-1022.
- Hakansson, S., Morisaki H., Heuser J., and Sibley L. D.** (1999): Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol.Biol.Cell*, 10, 11: 3539-3547.
- Hamilton, A. J., Suhrbier A., Nicholas J., and Sinden R. E.** (1988): Immunoelectron microscopic localization of circumsporozoite antigen in the differentiating exoerythrocytic trophozoite of *Plasmodium berghei*. *Cell Biol.Int.Rep.*; 12, 2: 123-129.
- Hammond, D. M., Andersen F. L., and Miner M. L.** (1963): The occurrence of a second asexual generation in the life cycle of *Eimeria bovis* in calves. *J.Parasitol.*; 49, 3: 428-434.
- Hammond, D. M., Bowman G. W., Davis L. R., and Simms B. T.** (1946): The endogenous phase of the life cycle of *Eimeria bovis*. *J.Parasitol.*; 32, 409-427.
- Hammond, D. M., Chobotar B., and Ernst J. V.** (1968): Cytological observations on sporozoites of *Eimeria bovis* and *E. auburnensis* and an *Eimeria* species from the ord kangaroo rat. *J.Parasitol.*; 54, 3: 550-558.
- Hammond, D. M., Ernst J. V., and Goldman M.** (1965): Cytological observations on *Eimeria bovis* merozoites. *J.Parasitol.*; 51, 5: 852-858.
- Hammond, D. M., Ernst J. V., and Miner M. L.** (1966): The development of first generation schizonts of *Eimeria bovis*. *J.Protozool.*; 13, 4: 559-564.
- Hammond, D. M. and Fayer R.** (1968): Cultivation of *Eimeria bovis* in three established cell lines and in bovine tracheal cell lines cultures. *J.Parasitol.*; 54, 3: 559-568.
- Hees, H. and Sinowatz F.** (2000): Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Dt. Ärzte-Verlag, 3. überarbeitete Auflage:
- Heid, H. W., Moll I., and Franke W. W.** (1988): Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation*; 37, 2: 137-157.
- Heintzelman, M. B. and Schwartzman J. D.** (1997): A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J Mol.Biol.*; 271, 1: 139-146.

- Hendrick, J. P. and Hartl F. U. (1993): Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu.Rev.Biochem.*; 62, 349-384.
- Henriquez, F. L., Nickdel M. B., McLeod R., Lyons R. E., Lyons K., Dubremetz J. F., Grigg M. E., Samuel B. U., and Roberts C. W. (2005): *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 (GRA3) is a type I transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (KKXX) endoplasmic reticulum (ER) retrieval motif. *Parasitology*, 131, Pt 2: 169-179.
- Herm-Gotz, A., Weiss S., Stratmann R., Fujita-Becker S., Ruff C., Meyhofer E., Soldati T., Manstein D. J., Geeves M. A., and Soldati D. (2002): *Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *EMBO J*, 21, 9: 2149-2158.
- Hermosilla, C., Barbisch B., Heise A., Kowalik S., and Zahner H. (2002): Development of *Eimeria bovis* *in vitro*: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitol.Res.*; 88, 4: 301-307.
- Hermosilla, C., Schröpfer E., Behrendt J. H., Eckstein-Ludwig U., Stowasser M., and Zahner H. (2005): Untersuchungen zum Zytoskelett infizierter boviner Endothelzellen im Verlauf der ersten *Eimeria bovis*-Schizogonie. *Proceedings of the meeting "Diagnostik, Epidemiologie und Bekämpfung von Parasitosen bei Nutz-, Haus- und Heimtieren", Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Potsdam/D*, 22.-24.6.2005
- Hermosilla, C., Schropfer E., Stowasser M., Eckstein-Ludwig U., Behrendt, J. H., and Zahner H. (2008a): Cytoskeletal changes in *Eimeria bovis*-infected host endothelial cells during first merogony. *Vet.Res.Comm.*;
- Hermosilla, C., Stamm I., Taubert A., Lutz K., Zahner H., and Menge C. (2008b): Fluorescent *Eimeria bovis* sporozoites and meront stages *in vitro*: a helpful tool to study parasite-host cell interactions. *Parasitol.Res.*; 102, 4: 777-786.
- Hermosilla, C., Zahner H., and Taubert A. (2006): *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. *Int.J Parasitol.*; 36, 4: 423-431.
- Herrmann, H., Fouquet B., and Franke W. W. (1989): Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. I. cDNA clones encoding different forms of vimentin. *Development*, 105, 2: 279-298.
- Heussler, V. T., Kuenzi P., and Rottenberg S. (2001): Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int.J Parasitol*, 31, 11: 1166-1176.

- Heussler, V. T., Rottenberg S., Schwab R., Kuenzi P., Fernandez P. C., McKellar S., Shiels B., Chen Z. J., Orth K., Wallach D., and Dobbelaere D. A. (2002): Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria*. *Science*, 298, 5595: 1033-1036.
- Higashi, K., Hoshino M., Nomura T., Saso K., Ito M., and Hoek J. B. (1996): Interaction of protein phosphatases and ethanol on phospholipase C-mediated intracellular signal transduction processes in rat hepatocytes: role of protein kinase A. *Alcohol Clin.Exp.Res.*; 20, 9 Suppl: 320A-324A.
- Higashi, K., Tsukada K., Hoshino M., Nomura T., Takeuchi T., and Hoek J. B. (1994): Inhibition of ethanol-induced inositol phosphate formation and Ca(2+) mobilization by okadaic acid in rat hepatocytes: evidence for a role of protein phosphatases in the modulation of phospholipase C by ethanol. *Alcohol Alcohol Suppl*, 29, 1: 53-59.
- Hofmann, K. and Stoffel W. (1993): TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler*, 374, 166:
- Huynh, M. H., Opitz C., Kwok L. Y., Tomley F. M., Carruthers V. B., and Soldati D. (2004): Trans-genera reconstitution and complementation of an adhesion complex in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.*; 6, 8: 771-782.
- Jackson, A. R. (1964): The isolation of viable coccidial sporozoites. *Parasitology*, 54, 87-93.
- Jacobs, L. (1967): *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Adv.Parasitol.*; 5, 1-45.
- Jacobson, G. and Karsnas P. (1990): Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer. *Electrophoresis*, 11, 1: 46-52.
- Jaffe, E. A., Nachman R. L., Becker C. G., and Minick C. R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin.Invest*, 52, 11: 2745-2756.
- Jastrow, H. (2008): Elektronenmikroskopischer Atlas von Zellen, Geweben und Organen im Internet. <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAlles.html>,
- Jewett, T. J. and Sibley L. D. (2003): Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol.Cell*, 11, 4: 885-894.
- Jewett, T. J. and Sibley L. D. (2004): The *Toxoplasma* proteins MIC2 and M2AP form a hexameric complex necessary for intracellular survival. *J Biol.Chem.*; 279, 10: 9362-9369.
- Jones, M. L., Kitson E. L., and Rayner J. C. (2006): *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: a conserved myosin associated complex. *Mol.Biochem.Parasitol*, 147, 1: 74-84.

- Kappe, S., Bruderer T., Gantt S., Fujioka H., Nussenzweig V., and Menard R. (1999): Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol.*; 147, 5: 937-944.
- Kappe, S. H., Buscaglia C. A., Bergman L. W., Coppens I., and Nussenzweig V. (2004): Apicomplexan gliding motility and host cell invasion: overhauling the motor model. *Trends Parasitol.* 20, 1: 13-16.
- Kauffman, R. F., Taylor R. W., and Pfeiffer D. R. (1980): Cation transport and specificity of ionomycin. Comparison with ionophore A23187 in rat liver mitochondria. *J Biol.Chem.*; 255, 7: 2735-2739.
- Kawazoe, U., Tomley F. M., and Frazier J. A. (1992): Fractionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology*, 104 Pt 1, 1-9.
- Keller, P., Schaumburg F., Fischer S. F., Hacker G., Gross U., and Luder C. G. (2006): Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation *in vitro* by *Toxoplasma gondii* reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis. *FEMS Microbiol.Lett.*; 258, 2: 312-319.
- Kielty, C. M. (2006): Elastic fibres in health and disease. *Expert.Rev.Mol.Med.*; 8, 19: 1-23.
- Kielty, C. M., Baldock C., Lee D., Rock M. J., Ashworth J. L., and Shuttleworth C. A. (2002): Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*; 357, 1418: 207-217.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227, 5259: 680-685.
- Laliberte, J. and Carruthers V. B. (2008): Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol.Life Sci.*;
- Lang, M. (2008): Einfluss von *Eimeria bovis* auf die Apoptosefähigkeit der Wirtszelle *in vitro*. *Dissertation der Justus-Liebig-Universität, Giessen*;
- Laskey, R. A., Honda B. M., Mills A. D., and Finch J. T. (1978): Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*; 275, 5679: 416-420.
- Le Borgne, R. and Hoflack B. (1998): Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim.Biophys.Acta*; 1404, 1-2: 195-209.
- Lebrun, M., Michelin A., El Hajj H., Poncet J., Bradley P. J., Vial H., and Dubremetz J. F. (2005): The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol.*; 7, 12: 1823-1833.

- Lee, S. S., Knott V., Jovanovic J., Harlos K., Grimes J. M., Choulier L., Mardon H. J., Stuart D. I., and Handford P. A. (2004): Structure of the integrin binding fragment from fibrillin-1 gives new insights into microfibril organization. *Structure*; 12, 4: 717-729.
- Leiriao, P., Albuquerque S. S., Corso S., van Gemert G. J., Sauerwein R. W., Rodriguez A., Giordano S., and Mota M. M. (2005): HGF/MET signalling protects *Plasmodium*-infected host cells from apoptosis. *Cell Microbiol.*; 7, 4: 603-609.
- Letunic, I., Copley R. R., Pils B., Pinkert S., Schultz J., and Bork P. (2006): SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res.*; 34, Database issue: D257-D260.
- Leung-Hagesteijn, C., Spence A. M., Stern B. D., Zhou Y., Su M. W., Hedgecock E. M., and Culotti J. G. (1992): UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell*; 71, 2: 289-299.
- Levine, N. D. (1970): Taxonomy of the sporozoa. *J.Parasitol.*; 56, 208-
- Levine, N. D. (1973): Introduction, history and taxonomy. In: The Coccidia. University Park Press, Baltimore, 1-23.
- Liu, C. and Hermann T. E. (1978): Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol.Chem.*; 253, 17: 5892-5894.
- Lodish, H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., and Darnell J. (1996): Molekulare Zellbiologie. Walter de Gruyter Verlag, 2. Auflage:
- Long, P. L. (1978): The problem of coccidiosis: general considerations. In: Avian Coccidiosis (Long, P. L., Boorman, K. N., Freeman, B. M.). British poultry Science Ltd., Edinburgh: 3-28.
- Long, P. L. (1982): The biology of the coccidia.
- Lourenco, E. V., Pereira S. R., Faca V. M., Coelho-Castelo A. A., Mineo J. R., Roque-Barreira M. C., Greene L. J., and Panunto-Castelo A. (2001): *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology*, 11, 7: 541-547.
- Lu, X. and Legerski R. J. (2007): The Prp19/Pso4 core complex undergoes ubiquitylation and structural alterations in response to DNA damage. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*; 354, 4: 968-974.
- Ma, J. and Ptashne M. (1988): Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell*; 55, 3: 443-446.
- Martin, A. M., Liu T., Lynn B. C., and Sinai A. P. (2007): The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J Eukaryot.Microbiol.*; 54, 1: 25-28.

- Matter, K., Yamamoto E. M., and Mellman I.** (1994): Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol.*; 126, 4: 991-1004.
- Mazumder, B., Seshadri V., and Fox P. L.** (2003): Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem.Sci.*; 28, 2: 91-98.
- McCormick, C. J., Tuckwell D. S., Crisanti A., Humphries M. J., and Hollingdale M. R.** (1999): Identification of heparin as a ligand for the A-domain of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related adhesion protein. *Mol.Biochem.Parasitol*, 100, 1: 111-124.
- Meissner, M., Reiss M., Viebig N., Carruthers V. B., Torsel C., Tomavo S., Ajioka J. W., and Soldati D.** (2002): A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J Cell Sci.*; 115, Pt 3: 563-574.
- Mellman, I.** (1996): Endocytosis and molecular sorting. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*; 12, 575-625.
- Menard, R.** (2001): Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell Microbiol.*; 3, 2: 63-73.
- Mercier, C., Cesbron-Delauw M. F., and Sibley L. D.** (1998): The amphipathic alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J Cell Sci.*; 111 (Pt 15), 2171-2180.
- Mercier, C., Lecordier L., Darcy F., Deslee D., Murray A., Tourvieille B., Maes P., Capron A., and Cesbron-Delauw M. F.** (1993): Molecular characterization of a dense granule antigen (Gra 2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol*, 58, 1: 71-82.
- Michel, R., Schupp K., Raether W., and Bierther F. W.** (1980): Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro. *Int.J Parasitol*, 10, 4: 309-313.
- Molestina, R. E., Payne T. M., Coppens I., and Sinai A. P.** (2003): Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I-kappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Sci.*; 116, Pt 21: 4359-4371.
- Mooseker, M. S. and Cheney R. E.** (1995): Unconventional myosins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*; 11, 633-675.
- Morcol, T. and Subramanian A.** (1999): A red-dot-blot protein assay technique in the low nanogram range. *Anal.Biochem.*; 270, 1: 75-82.

- Morimoto, R. I., Tissieres A., and Georgopoulos C.** (1994): The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour,
- Morris, M. T., Coppin A., Tomavo S., and Carruthers V. B.** (2002): Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. *J Biol.Chem.*; 277, 47: 45259-45266.
- Morrisette, N. S. and Sibley L. D.** (2002): Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*; 66, 1: 21-38.
- Mullis, K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H.** (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*; 51 Pt 1, 263-273.
- Myers, E. W. and Miller W.** (1988): Optimal alignments in linear space. *Comput.Appl.Biosci.*; 4, 1: 11-17.
- Naitza, S., Spano F., Robson K. J., and Crisanti A.** (1998): The Thrombospondin-related Protein Family of Apicomplexan Parasites: The Gears of the Cell Invasion Machinery. *Parasitol Today*; 14, 12: 479-484.
- Nakajima-Shimada, J., Zou C., Takagi M., Umeda M., Nara T., and Aoki T.** (2000): Inhibition of Fas-mediated apoptosis by Trypanosoma cruzi infection. *Biochim.Biophys.Acta*; 1475, 2: 175-183.
- Nelson, M. M., Jones A. R., Carmen J. C., Sinai A. P., Burchmore R., and Wastling J. M.** (2008): Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect.Immun.*; 76, 2: 828-844.
- Ngo, H. M., Hoppe H. C., and Joiner K. A.** (2000): Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends Cell Biol.*; 10, 2: 67-72.
- Ngo, H. M., Yang M., and Joiner K. A.** (2004): Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? *Mol.Microbiol.*; 52, 6: 1531-1541.
- Nichols, B. A. and Chiappino M. L.** (1987): Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Protozool.*; 34, 2: 217-226.
- Nover, L. and Hightower L.** (1991): Heat shock and development. Introduction. *Results Probl.Cell Differ.*; 17, 1-4.
- Nyberg, P. A. and Hammond D. M.** (1965): Description of the sporulated oocysts and sporozoites of four species of bovine coccidia. *J.Parasitol.*; 51, 669-673.
- Olah, I., Kendall C., and Glick B.** (1992): Anti-vimentin monoclonal antibody recognizes a cell with dendritic appearance in the chicken's bursa of Fabricius. *Anat.Rec.*; 232, 1: 121-125.

- Opitz, C., Di Cristina M., Reiss M., Ruppert T., Crisanti A., and Soldati D. (2002): Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J*, 21, 7: 1577-1585.
- Opitz, C. and Soldati D. (2002): 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol.Microbiol.*; 45, 3: 597-604.
- Ottaviano, Y. and Gerace L. (1985): Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *J Biol.Chem.*; 260, 1: 624-632.
- Palazzolo, M. J., Hamilton B. A., Ding D. L., Martin C. H., Mead D. A., Mierendorf R. C., Raghavan K. V., Meyerowitz E. M., and Lipshitz H. D. (1990): Phage lambda cDNA cloning vectors for subtractive hybridization, fusion-protein synthesis and Cre-loxP automatic plasmid subcloning. *Gene*, 88, 1: 25-36.
- Pandey, P., Saleh A., Nakazawa A., Kumar S., Srinivasula S. M., Kumar V., Weichselbaum R., Nalin C., Alnemri E. S., Kufe D., and Kharbanda S. (2000): Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*, 19, 16: 4310-4322.
- Pereira, L., D'Alessio M., Ramirez F., Lynch J. R., Sykes B., Pangilinan T., and Bonadio J. (1993): Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum.Mol.Genet.*; 2, 10: 1762-
- Periz, J., Gill A. C., Hunt L., Brown P., and Tomley F. M. (2007): The microneme proteins EtMIC4 and EtMIC5 of *Eimeria tenella* form a novel, ultra-high molecular mass protein complex that binds target host cells. *J Biol.Chem.*; 282, 23: 16891-16898.
- Periz, J., Gill A. C., Knott V., Handford P. A., and Tomley F. M. (2005): Calcium binding activity of the epidermal growth factor-like domains of the apicomplexan microneme protein EtMIC4. *Mol.Biochem.Parasitol.*; 143, 2: 192-199.
- Persson, B. and Argos P. (1994): Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J Mol.Biol.*; 237, 2: 182-192.
- Persson, B. and Argos P. (1996): Topology prediction of membrane proteins. *Protein Sci.*; 5, 2: 363-371.
- Pinder, J. C., Fowler R. E., Dluzewski A. R., Bannister L. H., Lavin F. M., Mitchell G. H., Wilson R. J., and Gratzer W. B. (1998): Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *J Cell Sci.*; 111 (Pt 13), 1831-1839.
- Pinol-Roma, S. and Dreyfuss G. (1993): hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell Biol.*; 3, 5: 151-155.

- Ponting, C. P., Schultz J., Milpetz F., and Bork P. (1999): SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res.*; 27, 1: 229-232.
- Porchet, E. and Torpier G. (1977): [Freeze fracture study of *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infective stages (author's transl)]. *Z.Parasitenkd.*; 54, 2: 101-124.
- Pszenny, V., Ledesma B. E., Matrajt M., Duschak V. G., Bontempo E. J., Dubremetz J. F., and Angel S. O. (2002): Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol*, 121, 2: 283-286.
- Rabenau, K. E., Sohrabi A., Tripathy A., Reitter C., Ajioka J. W., Tomley F. M., and Carruthers V. B. (2001): TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with the adhesive protein TgMIC2. *Mol.Microbiol.*; 41, 3: 537-547.
- Ramirez, F., Pereira L., Zhang H., and Lee B. (1993): The fibrillin-Marfan syndrome connection. *Bioessays*; 15, 9: 589-594.
- Ramos-Vara, J. A., Beissenherz M. E., Miller M. A., Johnson G. C., Pace L. W., Fard A., and Kottler S. J. (2000): Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet.Pathol.*; 37, 6: 597-608.
- Rao, Z., Handford P., Mayhew M., Knott V., Brownlee G. G., and Stuart D. (1995): The structure of a Ca(2+)-binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions. *Cell*, 82, 1: 131-141.
- Reiss, M., Viebig N., Brecht S., Fourmaux M. N., Soete M., Di Cristina M., Dubremetz J. F., and Soldati D. (2001): Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol.*; 152, 3: 563-578.
- Roberts, W. L. and Hammond D. M. (1970): Ultrastructural and cytologic studies of the sporozoites of four *Eimeria* species. *J Protozool.*; 17, 1: 76-86.
- Robson, K. J., Hall J. R., Davies L. C., Crisanti A., Hill A. V., and Wellems T. E. (1990): Polymorphism of the TRAP gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc.Biol.Sci.*; 242, 1305: 205-216.
- Rommel, M. (1992): Eimeriosen des Rindes. 4, 119-125.
- Rual, J. F., Venkatesan K., Hao T., Hirozane-Kishikawa T., Dricot A., Li N., Berriz G. F., Gibbons F. D., Dreze M., Ayivi-Guedehoussou N., Klitgord N., Simon C., Boxem M., Milstein S., Rosenberg J., Goldberg D. S., Zhang L. V., Wong S. L., Franklin G., Li S., Albala J. S., Lim J., Fraughton C., Llamas E., Cevik S., Bex C., Lamesch P., Sikorski R. S., Vandenhaute J., Zoghbi H. Y., Smolyar A., Bosak S., Sequerra R., Doucette-Stamm L., Cusick M. E., Hill D. E., Roth F. P., and Vidal M. (2005): Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*; 437, 7062: 1173-1178.

- Rubin, R. and Hoek J. B. (1990): Inhibition of ethanol-induced platelet activation by agents that elevate cAMP. *Thromb.Res.*; 58, 6: 625-632.
- Ryan, R., Shirley M., and Tomley F. (2000): Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella*. *Int.J Parasitol.*; 30, 14: 1493-1499.
- Saffer, L. D., Mercereau-Puijalon O., Dubremetz J. F., and Schwartzman J. D. (1992): Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool.*; 39, 4: 526-530.
- Saiki, R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., and Erlich H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 4839: 487-491.
- Saleh, A., Srinivasula S. M., Balkir L., Robbins P. D., and Alnemri E. S. (2000): Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat.Cell Biol.*; 2, 8: 476-483.
- Sambrook, J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989): Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY:
- Sampson, M. J., Lovell R. S., and Craigen W. J. (1996): Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. *Genomics*, 33, 2: 283-288.
- Sandoval, I. V. and Bakke O. (1994): Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol.*; 4, 8: 292-297.
- Sanger, F., Nicklen S., and Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 74, 12: 5463-5467.
- Schindler, R., Weichselsdorfer E., Wagner O., and Bereiter-Hahn J. (2001): Aldolase-localization in cultured cells: cell-type and substrate-specific regulation of cytoskeletal associations. *Biochem.Cell Biol.*; 79, 6: 719-728.
- Scholtyssek, E. (1973): Die Deutung von Endodyogenie und Schizogonie bei Coccidien und anderen Sporozoen. *Z.Parasitenkd.*; 42, 2: 87-104.
- Scholtyssek, E. (1979): Fine strukture of parasitic protozoa. *Springer Verlag, Berlin*,
- Scholtyssek, E. and Mehlhorn H. (1970): Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of sporozoa and related organisms. *Z.Parasitenkd.*; 34, 2: 97-127.
- Scholtyssek, E., Mehlhorn H., and Senaud J. (1972): Die subpellikulären Mikrotubuli in den Merozoiten von *Eimeria falciformis*. *Z.Parasitenkd.*; 34, 281-294.

- Schultz, J., Milpetz F., Bork P., and Ponting C. P. (1998): SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 95, 11: 5857-5864.
- Schwab, J. C., Beckers C. J., and Joiner K. A. (1994): The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 91, 2: 509-513.
- Sellers, J. R., Goodson H. V., and Wang F. (1996): A myosin family reunion. *J Muscle Res. Cell Motil.*; 17, 1: 7-22.
- Sibley, L. D., Hakansson S., and Carruthers V. B. (1998): Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr.Biol.*; 8, 1: R12-R14.
- Sibley, L. D., Niesman I. R., Asai T., and Takeuchi T. (1994): *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp.Parasitol*, 79, 3: 301-311.
- Siebert, P. D., Chenchik A., Kellogg D. E., Lukyanov K. A., and Lukyanov S. A. (1995): An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.*; 23, 6: 1087-1088.
- Silverman, J. A., Qi H., Riehl A., Beckers C., Nakaar V., and Joiner K. A. (1998): Induced Activation of the *Toxoplasma gondii* Nucleoside Triphosphate Hydrolase Leads to Depletion of Host Cell ATP Levels and Rapid Exit of Intracellular Parasites from Infected Cells. *J.Biol.Chem.*; 273, 20: 12352-12359.
- Sinai, A. P. and Joiner K. A. (2001): The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol.*; 154, 1: 95-108.
- Sinai, A. P., Webster P., and Joiner K. A. (1997): Association of host cell endoplasmatic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J.Cell Science*, 110, 2117-2128.
- Singh, A. P., Buscaglia C. A., Wang Q., Levay A., Nussenzweig D. R., Walker J. R., Winzeler E. A., Fujii H., Fontoura B. M., and Nussenzweig V. (2007): *Plasmodium* circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. *Cell*, 131, 3: 492-504.
- Soldati, D., Dubremetz J. F., and Lebrun M. (2001): Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int.J Parasitol*, 31, 12: 1293-1302.
- Soldati, D., Lassen A., Dubremetz J. F., and Boothroyd J. C. (1998): Processing of *Toxoplasma* ROP1 protein in nascent rhoptries. *Mol.Biochem.Parasitol*, 96, 1-2: 37-48.
- Southern, E. (2006): Southern blotting. *Nat.Protoc.*; 1, 2: 518-525.

Souza, W. (2006): Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An Acad.Bras.Cienc.*; 78, 2: 271-291.

Stathopoulos, E., Naeve G. S., Taylor C. R., and Epstein A. L. (1989): LN-6: a monoclonal antibody to vimentin expressed in non-hematopoietic mesenchymal cells and derived tumors and reactive in B5-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Histochem.Cytochem.*; 37, 9: 1363-1370.

Stommel, E. W., Kenneth H. E., Schwartzmann J. D., and Kasper L. H. (1997): *Toxoplasma gondii*: Dithiol-induced Ca^{2+} flux caused egress of parasites from the parasitophorous vacuole. *Exp.Parasitol.*; 87, 88-97.

Sultan, A. A., Thathy V., Frevert U., Robson K. J. H., Nussenzweig R. S., and Menard R. (1997): TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell*; 90, 511-522.

Tarn, W. Y., Lee K. R., and Cheng S. C. (1993a): The yeast PRP19 protein is not tightly associated with small nuclear RNAs, but appears to associate with the spliceosome after binding of U2 to the pre-mRNA and prior to formation of the functional spliceosome. *Mol.Cell Biol.*; 13, 3: 1883-1891.

Tarn, W. Y., Lee K. R., and Cheng S. C. (1993b): Yeast precursor mRNA processing protein PRP19 associates with the spliceosome concomitant with or just after dissociation of U4 small nuclear RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 90, 22: 10821-10825.

Taubert, A., Hermosilla C., Behrendt J., and Zahner H. (2006a): Responses of bovine endothelial cells *in vitro* to coccidia (*Eimeria bovis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) infections possibly involved in innate immunity. *Berl.Münch.Tierarztl.Wochenschr.*; 119, 7/8: 274-281.

Taubert, A., Krüll M., Zahner H., and Hermosilla C. (2006b): *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. *Vet.Immunol.Immunopathol.*; 112, 3-4: 272-283.

Taubert, A., Zahner H., and Hermosilla C. (2006c): Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Vet.Parasitol.*; 142, 3-4: 214-222.

Taubert, A., Zahner H., and Hermosilla C. (2007): *Eimeria bovis* infection enhances adhesion of peripheral blood mononuclear cells to and their transmigration through an infected bovine endothelial cell monolayer *in vitro*. *Parasitol.Res.*; 101, 3: 591-598.

Tissieres, A., Mitchell H. K., and Tracy U. M. (1974): Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J Mol.Biol.*; 85, 3: 389-398.

Tomley, F. M., Billington K. J., Bumstead J. M., Clark J. D., and Monaghan P. (2001): EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats. *Int.J Parasitol.*; 31, 12: 1303-1310.

- Tomley, F. M., Bumstead J. M., Billington K. J., and Dunn P. P. (1996): Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. *Mol.Biochem.Parasitol.*; 79, 2: 195-206.
- Tomley, F. M., Clarke L. E., Kawazoe U., Dijkema R., and Kok J. J. (1991): Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol.Biochem.Parasitol.*; 49, 2: 277-288.
- Tomley, F. M. and Soldati D. S. (2001): Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.*, 17, 2: 81-88.
- Tucker, R. P. (2004): The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int.J Biochem.Cell Biol.*; 36, 6: 969-974.
- Ukai, H., Ukai-Tadenuma M., Ogiu T., and Tsuji H. (2002): A new technique to prevent self-ligation of DNA. *J Biotechnol.*; 97, 3: 233-242.
- Umemiya, T., Takeichi M., and Nose A. (1997): M-spondin, a novel ECM protein highly homologous to vertebrate F-spondin, is localized at the muscle attachment sites in the *Drosophila* embryo. *Dev.Biol.*; 186, 2: 165-176.
- Vakonakis, I. and Campbell I. D. (2007): Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Curr.Opin.Cell Biol.*; 19, 5: 578-583.
- Valencia, C. A., Ju W., and Liu R. (2007): Matrin 3 is a Ca²⁺/calmodulin-binding protein cleaved by caspases. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*; 361, 2: 281-286.
- van de Sand, C., Horstmann S., Schmidt A., Sturm A., Bolte S., Krueger A., Lutgehetmann M., Pollok J. M., Libert C., and Heussler V. T. (2005): The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Mol.Microbiol.*; 58, 3: 731-742.
- Vutova, P., Wirth M., Hippe D., Gross U., Schulze-Osthoff K., Schmitz I., and Luder C. G. (2007): *Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8. *Cell Microbiol.*; 9, 6: 1556-1570.
- Wan, K. L., Carruthers V. B., Sibley L. D., and Ajioka J. W. (1997): Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 84, 2: 203-214.
- Wang, J., Morris A. J., Tolan D. R., and Pagliaro L. (1996): The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants. *J Biol.Chem.*; 271, 12: 6861-6865.
- Wang, J., Tolan D. R., and Pagliaro L. (1997): Metabolic compartmentation in living cells: structural association of aldolase. *Exp.Cell Res.*; 237, 2: 445-451.

- Wiersma, H. I., Galuska S. E., Tomley F. M., Sibley L. D., Liberator P. A., and Donald R. G. (2004): A role for coccidian cGMP-dependent protein kinase in motility and invasion. *Int.J Parasitol.*; 34, 3: 369-380.
- Wilbur, W. J. and Lipman D. J. (1983): Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 80, 3: 726-730.
- Witcombe, D. M., Belli S. I., Wallach M. G., and Smith N. C. (2003): Molecular characterisation of EmTFP250: a novel member of the TRAP protein family in *Eimeria maxima*. *Int.J Parasitol.*; 33, 7: 691-702.
- Witcombe, D. M., Ferguson D. J., Belli S. I., Wallach M. G., and Smith N. C. (2004): *Eimeria maxima* TRAP family protein EmTFP250: subcellular localisation and induction of immune responses by immunisation with a recombinant C-terminal derivative. *Int.J Parasitol.*; 34, 7: 861-872.
- Yeast Protocols Handbook (2001): . *Clontech Laboratoris Inc.*; www.clontech.com,
- Zhang, H., Apfelroth S. D., Hu W., Davis E. C., Sanguinetti C., Bonadio J., Mecham R. P., and Ramirez F. (1994): Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J Cell Biol.*; 124, 5: 855-863.
- Zhang, N., Kaur R., Lu X., Shen X., Li L., and Legerski R. J. (2005): The Pso4 mRNA splicing and DNA repair complex interacts with WRN for processing of DNA interstrand cross-links. *J Biol.Chem.*; 280, 49: 40559-40567.
- Zon, L. I., Dorfman D. M., and Orkin S. H. (1989): The polymerase chain reaction colony miniprep. *Biotechniques*; 7, 7: 696-698.

Abkürzungsverzeichnis

A	
Abb.	Abbildungen
ACN	Acetonitril
Apaf-1	„apoptosis protease activating factor“
AP	Adapterprimer
Apoptosom	Komplex aus Cytochrom c, Procaspase 9 und Apaf-1
APS	Ammoniumpersulphat
ATP	Adenosintriphosphat

B	
Bad	„Bcl-xL/Bcl2 assoziated death promoter“, Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
Bax	„Bcl2 assoziated x protein“, Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bcl-2	„B-cell-lymphoma-2“
Bcl-xl	„long form“ der Bcl-x Isoform, Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
BFGC	bovine fetale gastrointestinale Zellen
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BUVEC	„bovine umbilical vein cells“
BtVIM	bovines Vimentin

C	
Caspase	„Cysteiny aspartic acid protease“
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylalmino]-Propansulfat
CIP	„calf intestinal phosphatase“
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
COX-2	„cyclooxygenase 2“

CTRP	„circumsporozyte“-TRAP-Protein
D	
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
dpi	dies post infectionem (in Abb.)
DTT	Dithiothreitol

E	
<i>E. bovis</i>	<i>Eimeria bovis</i>
EbMIC4	Mikronemenprotein 4 von <i>E. bovis</i>
ECGM	„endothelial cell growth medium“
ECL	"enhanced chemiluminescent"
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
EGF-Ca	„epidermal growth factor“-Ca binding
EGF-like	„epidermal growth factor“-ähnlich
<i>E. maxima</i>	<i>Eimeria maxima</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
<i>E. tenella</i>	<i>Eimeria tenella</i>

F	
F-Aktin	filamentöses Aktin
Fas	=CD 95=APO-1, Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
FKS	fötales Kälberserum
G	
gDNA	genomische DNA

GM-CSF	„granulocyte-macrophage colony stimulating factor“
GRO- α	„growth-related oncogene protein α “
GSP	sequenzspezifischer Primer („genomewalking“)
GST	Glutathion-S-Transferase
H	
H ₂ O _{dd}	doppelt desionisiertes Wasser
HBSS	„Hank`s balanced salt solution“
HGF	„hepatocyte growth factor“
HSP	Hitzeschockprotein
I	
IEF	isoelektrische Fokussierung
IL-8	Interleukin-8
IMC	innerer Membrankomplex der Pellikula des Parasiten
IMDM	„Iscove`s modified dulbecco`s medium“
iNOS	induzierbare Isoform der Stickoxid-Synthasen
IP-10	„10 kDa interferon-inducible protein“
IPTG	Isopropyl-Thio- β -D-Galaktopyranosid
K	
KLH	„Keyhole Limpet“-Hämocyanin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	
LB	Luria Broth Base
M	
MCP-1	„monocyte chemotactic protein“
MET	„receptor tyrosine kinase Met“
MIC	Mikronemenprotein
MJ	„moving junctions“
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA

MTIP	MyoA-IMC Schwanzdomäne-Interaktionsprotein
Myo A	Myosin A
N	
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NBT/BCIP	Substrat der Alkalischen Phosphatase → Farbumschlag
NF κ B	„nuclear factor kappa B“
O	
OD	optische Dichte
OPG	Oozysten pro Gramm Kot
P	
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
p. i.	post infectionem
PM	Plasmamembran
PSA-Puffer	„Puck`s saline A“-Puffer
PV	parasitophore Vakuole
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVM	Membran der parasitophore Vakuole
R	
RANTES	„regulation upon activation normal T cell expressed and secreted“
RNA	Ribonukleonsäure
ROP	Rhoprien-spezifisches Protein
RT	Raumtemperatur
RT ⁺	Reverse Transkriptase
RT ⁺ -PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S	
SDS	Natriumlaurylsulfat
SPF-Haltung	spezifisch-pathogenfrei
T	

Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
<i>T. cruzi</i>	<i>Theileria cruzi</i>
TEM	Transmissions- Elektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF α	„tumor necrosis factor-alpha“
TNFR	„tumor necrosis factor receptor“
Total-RNA	gesamte RNA
<i>T. parva</i>	<i>Theileria parva</i>
TRAP	„thrombospondin related adhesive protein“
TRITC	Tetramethyl-Rhodamine-Iso- Thiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
TSP-1	Thrombospondin-1
U _____	
UE	Untereinheit
V _____	
Vero	etablierte Zelllinie aus epithelialen Nierenzellen der Grünen Meerkatze
Y _____	
YTH	Yeast-Two-Hybrid
Z _____	
ZKF	Zellkulturflaschen

Abbildungsverzeichnis

Abb.: 1.1: Entwicklungszyklus von <i>Eimeria bovis</i> (modifiziert nach Bowman, 1999).-----	3
Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Apikalkomplexes von <i>Eimeria</i> -Sporozoit und – Merozoit (modifiziert nach Scholtyseck, 1979).-----	4
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Aufbaus verschiedener Mikronemenproteine aus unterschiedlichen Apikomplexa, modifiziert nach Tomley and Soldati (2001).-----	8
Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Aufbaus des Glideosoms in den invasiven Stadien der Apikomplexa [modifiziert nach Kappe et. al. (2004), Jones et. al. (2006)].-----	13
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Herstellung einer gDNA-Bank mit dem Universal Genome Walker Kit (modifiziert nach Clontech, BD GenomeWalker Universal Kit).-----	37
Abb. 2.2 Beispielhafte Darstellung der Proteinexpression vom GST-EbMIC4-Cterm-Protein.--	54
Abb. 3.1: DNA- und Proteinsequenz eines circa 330 bp langen Teilstückes von Ebmic4.----	75
Abb. 3.2: Vergleich der Proteinsequenzen von EbMIC4 und EtMIC4.-----	76
Abb.3.3: Synthese und Verifizierung eines weiteren EbMIC4-Teilstücks.-----	77
Abb. 3.4: Position der degenerierten Primer für die PCR.-----	77
Abb. 3.5: Amplifikation von gDNA-Teilstücken aus der mit dem „UniversalWalker™ Kit“ hergestellten <i>E. bovis</i> -gDNA-Bank.-----	80
Abb. 3.6: Position der identifizierten Sequenzen der Ebmic4-Klone.-----	81
Abb. 3.7: Theoretisch berechnete Intron-Exon Struktur der EbMIC4-Sequenz.-----	82
Abb. 3.9: Positionen der in der RT ⁺ -PCR Reaktion verwendeten Primer (schematisch).-----	83
Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Verteilung in der Ebmic4-Sequenz.--	84
Abb. 3.11: Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifikation der prä-mRNA zur reifen mRNA der Ebmic4-Sequenz.-----	84
Abb. 3.12: Hydrophobizitätsblot von EbMIC4 (nach TMPred).-----	85
Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Lokalisation der funktionellen Domänen der bisher identifizierten Sequenz von EbMIC4 (SMART).-----	86
Abb. 3.14: Schematische Darstellung der bisher identifizierten Aminosäuresequenz von EbMIC4 mit Angabe der Positionen der identifizierten Domänen.-----	87

Abb. 3.15: Alignment des C-terminalen Endes (Transmembrandomäne und zytoplasmatische Region) von EbMIC4 im Vergleich mit anderen Proteinen der TRAP-Proteinfamilie der Apikomplexa (letztere modifiziert nach Witcombe et. al., 2003).	89
Abb. 3.16: Vorhergesagte Phosphorylierungsstellen in der zytoplasmatischen Sequenz von EbMIC4.	90
Abb. 3.17: Vorhergesagte O-Glykosylierungsstellen in der EbMIC4-Sequenz.	91
Abb. 3.18: Vorhergesagte N-Glykosylierungsstellen im Extrazellulärbereich der EbMIC4-Sequenz.	92
Abb. 3.19: Homologieanalyse von EbMIC4 (Phylogenetischer Baum).	93
Abb. 3.20: Vergleich der vorhergesagten Domänenstruktur von EbMIC4, EtMIC4 und EmTSP250.	93
Abb. 3.21: Multialignment der Proteinsequenzen von EbMIC4, EtMIC4 und EmTSP250.	94
Abb. 3.22: Restriktionsschnittstellen in der bisher identifizierten gDNA-Sequenz von EbMIC4.	95
Abb. 3.23: Überprüfung der Genhäufigkeit von Ebmic4 im Genom von <i>E. bovis</i> mittels Southern Blot.	96
Abb. 3.24: Nachweis des Transkriptes von Ebmic4 und Ebhsp70 in <i>E. bovis</i> -Sporozoit und -Merozoiten I mittels RT'-PCR	97
Abb. 3.25-1: <i>In vitro</i> -Entwicklung von <i>E. bovis</i> in BUVEC-Wirtszellen (1-12 dpi).	99
Abb. 3.25-2: <i>In vitro</i> -Entwicklung von <i>E. bovis</i> in der BUVEC-Wirtszellen (15-21 dpi).	100
Abb. 3.26: Transkriptionsprofil von Ebmic4 und Ebhsp70 während der ersten Merogonie.	102
Abb. 3.27: Semiquantitative Auswertung der Transkripte von Ebmic4 in Abhängigkeit von Ebhsp70 als Referenzgen.	103
Abb. 3.28: Position und Sequenz des zytoplasmatischen Teilbereichs von EbMIC4 (EbMIC4-Cterm).	104
Abb. 3.29: Heterologe Expression von EbMIC4-Cterm gekoppelt an GST in <i>E. coli</i> Stamm BL 21.	105
Abb. 3.30: Aufreinigung des rekombinanten EbMIC4-Cterm Peptids.	106
Abb. 3.31: Überprüfung der Reaktivität von Antiserum K1 gegen EbMIC4-Cterm.	107

Abb. 3.32: Immundetektion von EbMIC4 in <i>E. bovis</i> -Sporozoiten- (A) und Merozoiten-Antigen (B).-----	108
Abb. 3.33: Reaktion des anti-EbMIC4-Cterm K1 mit Methanol-fixierten Sporozoiten I von <i>E. bovis</i> .-----	110
Abb. 3.34: Reaktion des anti EbMIC4-Cterm K1 mit Methanol-fixierten Merozoiten I von <i>E. bovis</i> .-----	111
Abb. 3.35: Nachweis von EbMIC4 im Verlauf der ersten Merogonie mittels Immunoblot in <i>E. bovis</i> -infizierten Zellen und <i>E. bovis</i> Sporozoiten und -Merozoiten.-----	112
Abb. 3.36: IIFAT mit anti-EbMIC4-Cterm K1 (B) und dem zugehörigen Präserum K1 (A) in Reaktion mit nicht-infizierten Wirtszellen (BUVEC).-----	113
Abb. 3.37: Ergebnis des IIFAT mit dem Antiserum anti-EbMIC4-C-term K1 (B) und dem zugehörigen Präserum K1 (A) in Reaktion mit <i>E. bovis</i> -infizierte Wirtszellen (BUVEC, 21. Tag p. i.).-----	114
Abb. 3.38-1: Nachweis von EbMIC4 in <i>E. bovis</i> -infizierten BUVEC [3-17. Tag p. i (dpi)].--	116
Abb. 3.39-2: Nachweis von EbMIC4 in <i>E. bovis</i> -infizierten BUVEC [21-24. Tag p. i (dpi)].-	117
Abb. 3.39: Nachweis von EbMIC4 in <i>E. bovis</i> -infizierten BUVEC [21. Tag p. i. (21 dpi)] (IIFAT).-----	118
Abb. 3.40: Reaktionen von anti-EtMIC4 mit <i>E. bovis</i> -Sporozoiten (MEOH-fixiert; IIFAT).--	119
Abb. 3.41: IIFAT mit anti EtMIC4 auf <i>E. bovis</i> -Merozoiten (MEOH-fixiert).-----	120
Abb. 3.42: Einfluss unterschiedlicher Behandlungen auf die Lokalisation von EbMIC4 in <i>E. bovis</i> -Sporozoiten nach 5 min Inkubation.-----	123
Abb. 3.43: Einfluss unterschiedlicher Behandlungen auf die Lokalisation von EbMIC4 in <i>E. bovis</i> -Sporozoiten nach 30 min Inkubation.-----	124
Abb. 3.44: Schematische Darstellung der prey- und bait-Konstrukte für TgAldolase und TgMIC2.-----	126
Abb. 3.45: Auswahl degenerierter Primer für die Identifikation der EbAldolase-Sequenz.--	127
Abb. 3.46: Alignment der Proteinsequenzen von TgAldolase und EbAldolase.-----	128
Abb. 3.47: Schematische Darstellung der prey- und bait-Konstrukte für EbAldolase und EbMIC4-Cterm.-----	129
Abb. 3.48: Immunoblotanalysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen bovines Vimentin in <i>E. bovis</i> -infizierten BFGC (A) sowie in <i>E. bovis</i> -Sporozoiten und -Merozoiten (B).-----	133

Abb. 3.49: Transkription des bovVim in <i>E. bovis</i> -infizierten und nicht-infizierten BFGC (17. Tag p. i.).-----	134
Abb. 3.50: <i>In vitro</i> -Kultur von <i>E. bovis</i> -infizierter und nicht-infizierter BFZC-Wirtszellen (14 dpi).-----	135
Abb. 3.51: Immunoblot mit anti-Vimentin auf 2D-getrennten Gesamtprotein von nicht-infizierten BFGC (B) und anschließend mit India Ink gefärbt (A) (Ausschnitt).-----	136
Abb. 3.52: 2D-aufgetrenntes Gesamtprotein von nicht-infizierten (A) und <i>E. bovis</i> -infizierten BFGC (B) mit Coomassie gefärbt (Ausschnitt).-----	136
Abb. 3.53: Gesamtproteinextrakts von nicht-infizierten Wirtszellen (BFGC) nach zweidimensionaler Auftrennung.-----	138
Abb. 3.54: Gesamtproteinextrakts von <i>E. bovis</i> -infizierten Wirtszellen (BFGC) nach zweidimensionaler Auftrennung.-----	139
Abb. 3.55: Gruppierung der ausgewerteten Proteine und ihr prozentualer Anteil an den nach oben bzw. nach unten regulierten Proteinen.-----	141
Abb. 4.1: Durch SMART vorhergesagte Domänenstruktur von Fibrillin-1 von <i>H. sapiens</i> .--	153
Abb. 4.2: Vergleich der Aminosäuresequenz der TM-Domäne verschiedener Mikronemenproteine.-----	157
Abb. 4.3: Morphologie des Wirtszellkerns während der <i>in vitro</i> -Kultivierung von <i>E. bovis</i> .--	176
Abb. 4.4: <i>E. bovis</i> -infizierten BUVEC 21.Tag p. i. (TEM-Aufnahme).-----	177

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Ausgewählte Mikronemenproteine von <i>T. gondii</i> , ihre Funktion, homologe Proteine bei anderen Apikomplexa und die Bildung von Proteinkomplexen (modifiziert nach Dowse and Soldati (2004)).-----	10
Tabelle 2.5: Allgemein verwendete Lösungen und Puffer.-----	19
Tabelle 6.2: Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika.-----	20
Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme mit ihrem Einsatzgebiet.-----	20
Tabelle 2.4: Verwendeter Hefestamm für gezielte Hefe-Doppelhybridexperimente.-----	20
Tabelle 2.5: Verwendete Vektoren und ihre Einsatzgebiete.-----	21
Tabelle 2.6: Verwendete Primer.-----	21
Tabelle 2.7: Pipettierschema und Laufbedingungen der ersten (äußeren) PCR.-----	38
Tabelle 2.8: Pipettierschema und Laufbedingungen der zweiten (nested) PCR.-----	38
Tabelle 2.9: PCR-Temperaturprotokoll.-----	39
Tabelle 2.10: Protokoll zur RT ⁻ -PCR-Reaktion.-----	41
Tabelle 2.11: Zusammensetzung der Trenngele.-----	59
Tabelle 2.12: Protokoll der Immundetektion.-----	62
Tabelle 2.13: Im Western Blot verwendete Antikörper.-----	63
Tabelle 2.14: Protokolle für IIFAT.-----	65
Tabelle 2.15: Im IIFAT verwendete Antikörper.-----	65
Tabelle 2.16: Verwendete Filterkombinationen am Konfokalmikroskop.-----	66
Tab. 2.17: Protokoll der unterschiedlichen Behandlung von <i>E. bovis</i> -Sporozoiten, angegeben sind die Endkonzentrationen der verwendeten Lösungen.-----	67
Tabelle 2.18: IEF-Bedingungen.-----	69
Tabelle 2.19: SDS-PAGE Bedingungen.-----	71
Tabelle 2.20: Protokoll des immunologischen Nachweises.-----	72
Tabelle 3.1: Hergestellte Digoxigenin-markierte Sonden und ihr Ergebnis bei der Überprüfung der cDNA-Phagenbanken.-----	78
Tabelle 3.2: Über „GenomeWalking“ identifizierte Ebmic4-gDNA Klone.-----	81

Tabelle 3.3: Einzelklone nach RT'-PCR, ihre Größe und die für die Amplifikation verwendeten Primer.-----	83
Tabelle 3.4: Vorhergesagte Domänen und „low complexity regions“ von EbMIC4 mit Angabe der Aminosäurepositionen und Wahrscheinlichkeit (E-value).-----	88
Tabelle 3.5: Potentielle Phosphorylierungsstellen im zytoplasmatischen Bereich der EbMIC4-Sequenz.-----	89
Tabelle 3.6: Potentielle O-Glykosylierungsstellen im Extrazellulärbereich der EbMIC4-Sequenz.-----	90
Tabelle 3.7: Potentielle N-Glykosylierungsstellen im Extrazellulärbereich der EbMIC4-Sequenz.-----	91
Tabelle 3.8: Verwendete Primerkombination für die Klonierung von Tgm2 in pACT2-Vektor.-----	127
Tabelle 3.9: Primerkombinationen für die Identifikation der vollständigen DNA-Sequenz von EbAldolase mittels „Genome Walking“.-----	128
Tabelle 3.10: Verwendete Kombinationen für die Kointransformation der bait- und prey-Konstrukte im YTH-Ansatz und der Erfolg durch Selektion auf -Trp/-Leu-Selektionsmedien.---	130
Tabelle 3.11: Ergebnis der MALDI-TOF-Auswertung für bovines Vimentin (Referenzspot).137	
Tabelle 3.9: Hochregulierte Proteine in <i>E. bovis</i> -infizierten Wirtszellen (Nachweis in Einzelspots).-----	143
Tabelle 3.10: Hochregulierte Proteine in <i>E. bovis</i> -infizierten Wirtszellen (Nachweis in Mischspots).-----	144
Tabelle 3.11: Runterregulierte Proteine in <i>E. bovis</i> -infizierten Wirtszellen (Nachweis in Einzelspots).-----	145
Tabelle 3.12: Runterregulierte Proteine in <i>E. bovis</i> -infizierten Wirtszellen (Nachweis in Mischspots).-----	148
Tabelle 3.13: Modifizierte Proteine, die in hoch- und runterregulierter Form vorliegen (gekennzeichnet durch unterschiedliche MW, pI).-----	151

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

- Hermosilla, C., Stamm, I., Taubert, A., **Lutz, K.**, Zahner, H., Menge, C. (2007): „Fluorescent *Eimeria bovis* stages *in vitro*: a helpful tool to study parasite-host cell interactions”. Parasitol Res. 102(4): 777-86
- **Lutz, K.**, Dyachenko, V., Hermosilla, C., Taubert, A., Beckmann, S., Grevelding, C.G., Zahner, H.: „Identification and Characterisation of *Eimeria bovis* microneme protein 4 (EbMIC4)”. Manuskript in Vorbereitung
- **Lutz, K.**, Schmitt, S., Linder, M., Hermosilla, C., Taubert, A., Zahner, H.: „Proteomic approach to characterise *Eimeria bovis* induced host cell modulation“. Manuskript in Vorbereitung

Tagungsbeiträge:

- **Lutz, K.**, Dyachenko, V., Taubert, A., Hermosilla, C., Beckmann, S. Grevelding, C.G., Zahner, H. (2008): “Characterization of the *Eimeria bovis* microneme protein 4 (EbMIC4).” Poster auf der 23. DGP-Tagung in Hamburg, 5.-7.03.2008
- **Lutz, K.**, Schmitt, S., Linder, M.; Taubert, A., Hermosilla, Behrendt, J. H., C., Zahner, H. (2008): “Proteomic approach to characterize *Eimeria bovis*-induced host cell modulation”. Poster auf der 23. DGP-Tagung in Hamburg, 5.-7.03.2008
- **Lutz, K.**, Dyachenko, V., Taubert, A., Hermosilla, C., Beckmann, S., Grevelding C. G., Zahner, H. (2007): „Characterization of *Eimeria bovis* microneme 4 protein (EbMIC4)“. Vortrag auf der Tagung “Living together - Physiopathology of intracellular parasitic diseases.” 1st Three Counties Joint Meeting der French Society of Parasitology, German Society of Parasitology (DGP), Swiss Society of Tropical Medicine and Parasitology in Strasbourg (Frankreich), 14.-16.06.2007
- Dyachenko, V., Hermosilla, C., **Lutz, K.**, Taubert, A., Beck, E., Zahner, H. (2006): “Identification and localization of *Eimeria bovis* calcium dependent protein kinase 1 (EbCDPK 1)”. Poster auf der Tagung „Apicomplexan Biology in the Post-Genomic Era“ in Dresden, 17. -20.05.2006
- **Lutz, K.**, Dyachenko, V., Taubert, A., Hermosilla, C., Zahner, H. (2006): “Characterization of *Eimeria bovis* microneme protein 4 (EbMIC4)”. Poster auf der Tagung „Apicomplexan Biology in the Post-Genomic Era“ in Dresden, 17.-20.05.2006

- Dyachenko, V., **Lutz, K.**, Zahner, H. (2006): "Identification and characterisation of *Eimeria bovis* calcium dependent protein kinases 1 (EbCDPK 1)". Vortrag auf der „22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie e. V.(DGP)“ in Wien, 22.-25.02.2006
- **Lutz, K.**, Zahner, H. (2006): "Characterization of *Eimeria bovis* microneme 4 protein (EbMIC4)". Vortrag bei dem "2nd Short Course for Young Parasitologists" der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie e. V. (DGP) in Wien, 20.-22. 02.2006

Stipendium:

Die vorliegende Promotion wurde ca. drei Jahre (Oktober 2004 – Dezember 2007) durch die Deutsche Forschungsgesellschaft im Rahmen des Graduiertenkolleg 455: „Molekulare Veterinärmedizin“ der Justus-Liebig-Universität Gießen unterstützt.

Danksagung

Sie ist Abschluss und Neubeginn zugleich

Herrn Prof. Dr. Zahner danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas, dessen langjährige Betreuung und Korrektur.

Herrn Prof. Dr. Clauss für die Übernahme des Erstgutachtens und die freundliche Aufnahme in den Naturwissenschaftlichen Fachbereich.

Dr. Anja Taubert und Dr. Carlos Hermosilla danke ich von ganzem Herzen für ein immer offenes Ohr, die umfassende und vielfältige Unterstützung, die weit über den normalen Institutsalltag hinausging. Ohne Euch wäre vieles nicht möglich gewesen.

Dr. Monica Linder und Dr. Sigrid Schmidt für die freundliche und tatkräftige, eigentlich nicht mehr selbstverständliche Unterstützung, nicht nur wenn es ums Thema Proteomik ging.

Herrn Prof. Dr. Grevelding sei für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Fragestellungen sowie der ständigen Diskussionsbereitschaft gedankt.

Dank an Prof. Dr. Dorresteyn und Dr. Holz für die Nutzung des konfokalen Mikroskops.

Bedanken möchte ich mich recht herzlich bei Mirjam Lang und Svenja Beckmann im „Mädchenzimmer“ sowie Viktor Dyachenko, Dennis Wolf und Jan Behrendt im „Jungszimmer“ für angeregte Diskussionen, die vielen lustigen Stunden, das gemeinschaftliche Bewältigen von „Frustmomenten“ und das Ertragen meines nicht immer „leicht zu verdauenden“ Humors.

Sehr herzlichen Dank auch an Frau Brigitte Hofmann und Frau Birgit Reinhard, die unsere kleine Arbeitsgruppe komplettierten und auch bei „Havarien“ kühlen Kopf bewarten.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, für die freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft mit folgendem Zitat:

„Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie ein Schwatz mit Kollegen auf dem Flur“

[Arno Penzias (*1933), amerik. Nobelpreisträger]

Bedanken möchte ich mich auch bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung und dem Graduiertenkolleg 455: „Molekulare Veterinärmedizin“ stellvertretend bei Prof. Dr. Petzinger, Prof. Dr. Bauerfeind und Frau Heber für die tatkräftige Hilfe.

Vor allem möchte ich mich aber bei meiner Familie im Großen und Kleinen bedanken, die immer an mich geglaubt hat, mich über alle Maßen unterstützt und mir zeigt, wie vielfältig das Leben sein kann.

Eidesstattliche Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen habe, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, November 2008

