IDENTIFIZIERUNG EINER PROTEINKINASE MIT CALMODULIN-ÄHNLICHER DOMÄNE BEI *EIMERIA BOVIS* UND STUDIEN ZU IHRER LOKALISATION IM PARASITEN

VIKTOR DYACHENKO

Віктор Дяченко

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG

édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757 Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Gießen Betreuer: Prof. Dr. H. Zahner

Identifizierung einer Proteinkinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne bei *Eimeria bovis* und Studien zu ihrer Lokalisation im Parasiten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

VIKTOR DYACHENKO

Tierarzt aus Kharkiv, Ukraine

Gießen, 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. H. Zahner

Prof. Dr. C. Lämmler

Tag der Disputation: 27.01.2006

meinen Eltern und meiner Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG			
2	LITERATURÜBERSICHT			
2.1 2.1.1	<i>Eimeria</i> -Infektionen des Rindes <i>Eimeria bovis</i> : Taxonomie	2 2		
2.1.2	Entwicklungszyklus von E. bovis	2		
2.1.3	Pathogenese und Klinik der E. bovis-Infektion	5		
2.2	Ultrastrukturelle Besonderheiten der Apicomplexa, ihrer Organellen und deren Produkte	6		
2.3	Proteinkinasen mit Calmodulin-ähnlicher Domäne und bekannte Vertreter bei Apicomplexa	11		
2.4	Rolle des Ca ²⁺ als Second Messenger in der Signaltransduktion bei Apicomplexa	16		
3	MATERIAL UND METHODEN	19		
3.1	Versuchstiere	19		
3.1.1	Kälber	19		
3.1.2	Gewinnung vom Seren	19		
3.2	Eimeria bovis	20		
3.2.1	Infektion von Kälbern mit E. bovis	20		
3.2.2	Gewinnung von E. bovis-Oozysten	20		
3.2.3	Gewinnung von E. bovis-Sporozoiten	21		

3.2.4	Infektion von Bovinen fetalen Gastrointestinalzellen (BFGZ I) mit	
	Sporozoiten und Entwicklung von E. bovis-Schizonten I in der Zellkultur	23
3.2.4.1	Wirtszellen BFGZ I	23
3.2.4.2	Infektion von BFGZ I	24
3.2.5	Gewinnung von E. bovis-Merozoiten I aus Zellkultur	24
3.3	Nukleinsäuren	25
3.3.1	Gewinnung von DNA aus E. bovis-Sporozoiten	25
3.3.2	Gewinnung von Gesamt-RNA und mRNA aus E. bovis-Merozoiten I	26
3.3.3	Fällung und Konzentrationsbestimmung der DNA	27
3.3.4	DNA-Auftrennung in Agarosegelen	29
3.3.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
3.3.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	30
3.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.3.7.1	Aufreinigung von PCR-Produkten	33
3.3.7.2	Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden mittels PCR	33
3.3.7.3	PCR mit Bakterienkolonien	33
3.3.8	Klonierung von PCR-Fragmenten	34
3.3.8.1	Vektoren	35
3.3.8.2	Vorbereitung des Zielfragmentes zur Ligation	36
3.3.8.3	Ligation	36
3.3.8.4	Transformation von kompetenten E. coli	37
3.3.9	Primersynthese	38
3.3.10	Sequenzieren von Nukleinsäuren	38
3.3.11	Southern Blot und Hybridisierung von Nukleinsäuren	39
3.3.11.1	Nukleinsäurentransfer auf Membranen (Vakuumtransfer)	39
3.3.11.2	Hybridisierung von Nukleinsäuren.	40
3.4	Bakterien (<i>E. coli</i>)	42
3.4.1	Anzucht und Aufbewahrung	42
3.4.2	Herstellung kompetenter Zellen (CaCl ₂ -Methode)	43

3.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation) durch alkalische Lyse			
3.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen			
3.4.5	Herstellung von Plating-Bakterien für die Amplifikation von Phagen			
3.4.6	Cre loxP-vermitteltes Ausschneiden von Plasmiden aus der Phagen-DNA			
3.5	Bakteriophagen	46		
3.5.1	Titerbestimmung, Amplifikation und Aufbewahrung	46		
3.6	Merozoiten I cDNA-Banken	47		
3.6.1	Herstellung einer SMART [™] cDNA-Bank	47		
3.6.2	Herstellung einer OrientExpress [™] -cDNA-Bank (OrientExpress [™] -cDNA			
	Synthese- und Klonierungs-Kit, Novagen)	50		
3.7	Screen der cDNA-Banken	54		
3.7.1	Immunscreen einer Expressions-cDNA-Bank	54		
3.7.2	Screen der cDNA-Bank mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden	55		
3.7.3	Isolierung der positiven Klone	55		
3.8	Proteine	56		
3.8.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	56		
3.8.2	Präzipitation von Proteinen	56		
3.8.3	SDS-PAGE	57		
3.8.4	Coomassie-Färbung von Proteinen	58		
3.8.5	Western Blot und Immunfärbung	59		
3.8.5.1	Proteintransfer auf Membranen	59		
3.8.5.2	Blockieren der Membran und Inkubation mit Antikörpern	60		
3.8.5.3	Visualisierung	61		
3.9	Herstellung und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	61		
3.9.1	Expression von 6×His-Proteinen in E. coli	62		
3.9.2	6× His-tag Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Chelatsäule	63		

3.9.3	Aufreinigung mittels SDS-PAGE	64
3.9.4	Dialyse von Proteinen	65
3.9.5	Immunisierung von Kaninchen und Seren	66
3.10	Immunhistologie	66
3.10.1	Fixierung von <i>E. bovis</i> -Sporozoiten; -Merozoiten I sowie von infizierten Zellen	66
3.10.2	Indirekter Immunfluoreszenztest	67
4	ERGEBNISSE	69
4.1	Herstellung und Screen der cDNA-Banken	69
4.1.1	Überprüfung der durchnittlichen Größen der klonierten cDNAs	69
4.1.2	Screenen der cDNA-Banken	70
4.1.2.1	Screen mit Seren aus postpatenten reinfizierten Rindern	70
4.1.2.2	Screen mit affinitätsgereinigten Antiköpern	70
4.1.2.3	Screen der SMART-cDNA-Bank mit einer Digoxigenin-markierten Sonde von Klon 3.	72
4.2	Ermittlung des 3'-Endes der <i>Eb</i> CDPK 1-cDNA	73
		75

4.3.1	cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz
122	Funktionala Domönon dos Protoins
4.3.2	
4.3.3	Homologievergleiche.

4.4	Expression der Teilsequenzen von <i>Eb</i> CDPK 1 in <i>Escherichia coli</i>	86
4.4.1	Expressionskonstrukte	86
4.4.2	Proteinexpression und die Aufreinigung von 6× His-Fusionsproteinen	87
4.4.2.1	Fragment 1 (EbCDPK 1-Fragment 1)	88
4.4.2.2	Expression von Fragment 2 (EbCDPK 1-Fragment 2)	90
4.4.2.3	Expression von Fragment 3 (EbCDPK 1-Fragment 3)	92

75

77

82

4.5	Antiseren und Reaktivität der Antikörper gegen rekombinante <i>Eb</i> CDPK 1-Peptide	93
4.5.1	Antiserum gegen Fragment 1 (aEbCDPK 1-Fragment 1)	93
4.5.2	Antiserum gegen Fragment 2 (α <i>Eb</i> CDPK 1-Fragment 2)	94
4.5.3	Antiserum gegen Fragment 3 (α <i>Eb</i> CDPK 1-Fragment 3)	95
4.5.4	Antiserum CaEm70/1 gegen EmCDPK (Eimeria maxima-Proteinkin	nase
	mit Calmodulin-ähnlicher Domäne)	96
4.6	Nachweis von <i>Eb</i> CDPK 1 in Entwicklungsstadien von <i>E. bovis</i>	97
4.6.1	EbCDPK 1 in Sporozoiten	97
4.6.2	EbCDPK 1 in Merozoiten I	100
4.6.3	Agglutinationstest mit <i>Eb</i> CDPK-Antiseren	102
5	DISKUSSION	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	114
7	SUMMARY	116
8	LITERATURVERZEICHNIS	117
9	ANHANG	136

-

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BFGZ I	bovine fetale Gastrointestinalzellen
CaM	Calmodulin
Cam	Chloramphenikol
CDPK	Proteinkinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne
CLSM	Konfokales Laser-Rastermikroskop
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
GRA	Dichte Granula – spezifisches Protein
His-Tag	Hinstidin-Sequenz eines Proteins
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
IMC	Innerer membranen Komplex
IMDM	Iscove's modified dulbecco's medium
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MARCKS	myristoyliertes alanin-reiches Proteinkinase-C-Substrat
MIC	Mikronemen-spezifisches Protein
MKS	multiple Klonierungsstelle
MTO	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MWCO	Molecular Weight Cut Off, Aufschlussgrenze, kDa
OD	Optische Dichte
OPG	Oozysten pro Gramm Kot
p. i.	post infectionem
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfa/Ga	Paraformaldehyd/Glutaraldehyd
PV	parasitophore Vakuole
ROP	Rhoptrien-spezifisches Protein
RT	Raumtemperatur
Src	Sarc-Tyrosinkinase

ABKÜRZUNGEN

Aminosäuren

Α	Alanin	Μ	Methionin
С	Cystein	Ν	Asparagin
D	Asparaginsäure	Р	Prolin
Ε	Glutaninsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
Η	Histidin	Т	Threonin
Ι	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1 EINLEITUNG

Die Eimeriose des Rindes ist eine weltweit vorkommende Erkrankung von Kälbern und Jungtieren, die mit akuten bis chronischen, meist nicht fieberhaften, katarrhalischen oder hämorrhagischen Enteritiden einhergeht (Bürger, 1983). Beim Rind sind weltweit 21 *Eimeria*-Arten bekannt (Pellerdy, 1974); 13 davon sind in Mitteleuropa nachgewiesen. Darunter gelten als die pathogensten Arten *E. bovis* und *E. zuernii* (Sahlinger, 1977). *E. bovis*-Infektionen können in schweren Fällen zwar zum Tode führen, doch sind es wie bei den anderen Kokzidioseerregern in erster Linie weniger auffällige Faktoren, die für den Tierhalter zu wirtschaftlichen Einbußen führen, wie schlechte Futterverwertung und mangelnde Gewichtszunahmen (Gräfner et al., 1985)

E. bovis ist ein intrazellulärer Parasit und befällt seine Wirtszellen, wie Kokzidien generell, durch aktives Eindringen (Chobotar et al., 1993). Während der Invasion erfolgen in zeitabhängiger Weise die Freisetzung von einer Reihe von Molekülen aus Organellen des Apikalkomplexes der Parasiten sowie eine Reihe morphologischer und physiologischer Veränderungen in der Parasitenzelle (Dubremetz et al., 1998; Carruthers und Sibley, 1997). Calcium-Signale in der Parasitenzelle spielen dabei eine wichtige Rolle und sind ein kritischer Faktor einer erfolgreichen Invasion, welche dem Parasiten das Überleben und die Weiterentwicklung sichert (Carruthers und Sibley, 1999; Pezzella et al., 1997). Unter den Calcium-abhängigen Proteinkinasen von Apicomplexa findet sich eine besondere mit Calmodulin-ähnlicher Domäne ausgestattete Gruppe (CDPK), die ursprünglich bei Pflanzen beschrieben worden war, sich aber weder bei Pilzen noch metazoären Tieren findet (Harper et al., 1991, Zhang und Choi, 2001). Da einige Befunde bei Parasiten der Gattungen Plasmodium und Toxoplasma darauf hindeuten, daß derartige Enzyme eine Rolle bei der Wirtszellinvasion spielen (Kieschnick et al., 2001; Billiker et al., 2004), erscheinen sie von besonderem parasitologischem Interesse, auch im Bezug auf die Kokzidiosen des Rindes.

In der vorliegenden Arbeit wird daher eine Isoform der Proteinkinase mit Calmodulinähnlicher Domäne aus *E. bovis* sequenziert (*Eb*CDPK 1), teils charakterisiert und in Sporozoiten und Merozoiten I des Parasiten lokalisiert.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 *Eimeria*-Infektionen des Rindes

2.1.1 *Eimeria bovis*: Taxonomie

Der Erreger *Eimeria bovis* ist ein Protozoon der Gattung *Eimeria*, der der Familie Eimeriidae angehört und mit anderen wichtigen Krankheitserregern, wie *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* zu der Klasse Coccidea zählt. In Tabelle 2.1 ist die aktuelle Taxonomie des Erregers dargestellt.

Reich	PROTOZOA	
Stamm	ALVEOLATA	
Unterstamm	APICOMPLEXA	
Klasse	COCCIDEA	
Ordnung	EIMERIIDA	
Familie	EIMERIIDAE	
Gattung	EIMERIA	
Art	EIMERIA BOVIS	

Tabelle 2.1 Taxonomie von E. bovis

2.1.2 Entwicklungszyklus von E. bovis

Die Entwicklung von *E. bovis* verläuft nach einem allgemeinem Grundmuster der Gattung *Eimeria* (Long, 1978). Der Lebenszyklus von *E. bovis* (siehe Abbildung 2.1) umfasst damit drei Vermehrungsphasen (Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie) und läuft

obligatorisch zum Teil exogen (Sporogonie) und zum Teil endogen im Wirt (Schizogonie und Gamogonie) ab.

Die unsporulierten Oozysten (Abbildung 2.1, A) werden mit den Fäzes in die Außenwelt ausgeschieden. Dort sporulieren sie in wenigen Tagen unter Bildung von 4 Sporozysten mit je 2 Sporozoiten in jeder Sporozyste (B). Die Sporulation der Oozysten erfolgt in der Außenwelt und wird durch Feuchtigkeit und höhere Temperaturen bis 25 - 28 ° C sowie ausreichend Sauerstoff stimuliert. Sie dauert unter optimalen Bedingungen 2 - 3 Tage (Ernst und Benz, 1986; Graat at al., 1994). Die Tiere infizieren sich durch die orale Aufnahme von sporulierten Oozysten, aus welchen dann im Dünndarm unter Einfluss von Trypsin bei pH 7,5 - 8,5 und unter Einwirkung von Galle die Sporozoiten (C) freigesetzt werden (Nyberg und Hammond, 1964). Die freien Sporozoiten invadieren aktiv die Endothelzellen (D) der zentralen Lymphkapillaren der Zotten des hinteren Dünndarmes, bevorzugt im terminalen Ileum, und entwickeln sich dort zu 1. Schizonten (E), die wegen ihrer Größe (bis > 435 µm) auch als Makroschizonten bezeichnet werden. Diese sind makroskopisch als weiße Pünktchen durch die Darmmukosa sichtbar und enthalten 14 – 18 Tage p.i. durchschnittlich ca. 120.000 Merozoiten (F) der ersten Generation (Hammond et al., 1946).

Die Merozoiten der ersten Generation entwickeln sich nach ihrer Freisetzung in den Epithelzellen von Zäkum und Kolon zu ca. 10 μ m großen 2. Schizonten (G) (Hammond et al. 1963), die nur jeweils 30 – 36 Merozoiten der zweiten Generation enthalten (Hammond et al. 1963). Aus diesen Merozoiten entstehen die geschlechtlichen Stadien: Mikro- (I), Makrogamonten (J) und schließlich Mikro-, Makrogametozyten, aus denen nach einer Syngamie letztlich die Oozysten (K) entstehen, die 18 bis 21. Tag p. i. erstmals in den Fäzes nachweisbar sind (Hammond et al., 1963; Daugschies et al., 1986).



Abbildung 2.1: Entwicklungszyklus von E. bovis (Quelle: Bowman, 1995) A: unsporulierte Oozyste; B: sporulierte Oozyste; C: Sporozoit; D: befallene Endothelzellen; E: Makroschizont; F: Merozoiten I; G: Schizont II; H: Merozoit II; I+J: männliche und weibliche Gamonten; K: neugebildete Oozyste

2.1.3 <u>Pathogenese und Klinik der E. bovis-Infektion</u>

Bei E. bovis – Infektionen sind die Reaktionen auf die sich in Endothelzellen befindenden Makroschizonten I relativ gering. Sie bestehen in Hypertrophie des Kernes und Zytoplasmas der befallenen Zelle (Bürger, 1983). Erst die Schizonten II, Gamonten und in den Zellen gebildeten Oozysten rufen schwere Veränderungen vor allem in Zäkum, aber auch in den distalen 2 Metern des Dünndarmes und im proximalen Kolon hervor. Sie gelten als pathogene Entwicklungsstadien und verursachen die klinischen Symptone (Hammond et al., 1946). Um den 16. – 18. Tag nach der Infektion mit E. bovis – Oozysten sind, im Ausmaß abhängig von der Infektionsdosis, Epithelzellen an der Basis der Drüsen mit Schizonten II, und Gamonten besetzt. Die Drüsen sind erweitert, subepithelial zellulär infiltriert und im Bereich der Lamina propria und Submukosa ödematös mit erweiterten Lymph- und Blutgefäßen (Bürger, 1983). Bei schweren Infektionen heben sich an den folgenden Tagen die Epithelien großflächig ab, und auf der nackten Lamina propria befinden sich diphteroide Auflagerungen aus Blut, Fibrin, Granulozyten, Bakterien, Oozysten und Zellresten. Die Kapillaren sind erweitert, thrombosiert oder aufgerissen, und es kommt zu starken Hämorrhagien. Infolge einer Störung der Prostaglandinsynthese und -abgabe kommt es zusätzlich zu einer Beeinträchtigung der Blutstillung (Bürger, 1983). Vom 22. – 26. Tag p.i. ersetzen dichte, flache Lagen von Granulationsgewebe die Mukosa, oft bis hinunter zur Lamina muscularis. Bei weitgehender Zerstörung der Drüsenzellen sind nur Epithelinseln sichtbar. Die tieferen Gewebeschichten werden ödematös, stark zellig infiltriert und hyperämisch (Hammond et al., 1946; Friend und Stockdale, 1980). Abgesehen von oft schweren Hämorrhagien führen die Dickdarmveränderungen zu Resorptionsstörungen, u. a. von Natrium- und Chloridionen und damit verbunden zu Wasserverlust mit dem Kot und Dehydratation (Stockdale und Sheard, 1982; Daugschies et al 1986).

Gelegentlich können auch zentralnervöse Störungen bei einer *E. bovis* – Infektion auftreten, wobei als Symptome Schreckhaftigkeit, tetanische Krämpfe, Nystagmus, Opisthotonus und Ruderbewegungen beschrieben wurden (Niilo, 1970; Isler et al. 1987). Nach dem hämorrhagischen Durchfall entwickelt sich die Anämie. Todesfälle sind besonders bei Jungtieren nicht selten. Eine Kokzidiose-Rekonvaleszenz verläuft oftmals zögerlich (Daugschies et al., 1986)

2.2 Ultrastrukturelle Besonderheiten der Apicomplexa, ihrer Organellen und deren Produkte

Die Parasiten des Substammes der Apicomplexa besitzen als Eukariota Zellkern und typische Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Ribosomen und Endoplasmatisches Retikulum (Roberts und Hammond, 1970). Eine Reihe von morphologischen Merkmalen wie eine gestreckte Form der Zelle und das Vorhandensein bestimmter Organellen am apikalen Ende (apikaler Komplex, daher der Name des Stammes) sind für die Parasiten dieses Stammes typisch (Levine, 1970).

Die Sporozoiten und Merozoiten sind von einer Pellikula umgegeben. Die Pellikula hat komplexe Struktur, die aus einer äußeren Membran, einem eine inneren Membranenkomplex (IMC) und einer dazwischenliegenden osmiophoben Schicht besteht (Roberts und Hammond, 1970). Die äußere Membran hat eine Dicke von etwa 90 Å und stellt eine durchgehende Umhüllung des Parasiten dar. Der IMC hat eine Dicke von etwa 115 Å und weist Unterbrechungen an den Polarringen und Mikroporen auf (Roberts und Hammond, 1970; Chobotar et al., 1975). Zwischen äußerer Membran und IMC in der osmiophoben Schicht (Dicke ≈ 165 Å) wurde eine Reihe von Proteinen beschrieben, welche vermutlich für die "gliding motility" und Invasion verantwortlich sind (Übersicht in Meissner et al., 2002; Soldati und Meissner, 2004). Und zwar befindet sich in dieser Schicht auf der inneren Seite der äußeren Membran ein heterotrimerer Myosin A -Proteinkomplex. Ein solcher Proteinkomplex besteht bei T. gondii aus einer schweren Kette des Myosin A (TgMyoA), welches der Klasse XIV der Myosine angehört, einer leichten Kette 1 (TgMLC 1) sowie einem myristoylierten Protein (TgMADP), durch welches der Komplex in der Membran verankert wird (Herm-Götz et al., 2002). Auf der gegenüberliegenden Seite liegt im Komplex mit dem IMC zum größten Teil globuläres Aktin (Dobrowolski et al., 1998; Foussard et al., 1990). Nach einer anderen Meinung befindet sich der Myosin A-Proteinkomplex auf der IMC Seite und Aktin auf der Seite der äußeren Membran (Soldati und Meissner, 2004; Bergman et al., 2003). Bei der Fortbewegung des Parasiten findet auf bis jetzt ungeklärte Weise findet eine kurzfristige Polymerisierung von Aktin statt und der Aktin-Myosin-Motor setzt die Proteine, vorwiegend aus den Mikronemen, in Bewegung. Die Pellikula ist außerdem mit Bestandteilen des Zytoskeletts verknüpft, welches Mikrotubuli und ein Netzwerk von Intermediärfilament-ähnlichen Proteinen umfasst (Übersicht bei Morrissette und Sibley, 2002).





Der apikale Komplex setzt sich aus folgenden Elementen zusammen (Chobotar und Scholtyseck, 1982):

- Polarring-Komplex
- Subpellikuläre Mikrotubuli
- Konoid und konoidale Ringe
- Mikronemen
- Rhoptrien
- Mikroporen

• Dichte Granula

Der **Polarring-Komplex** ist eine osmiophile ringförmige Verdickung am apikalen Pol der Parasitenzelle und wird durch den IMC und die Verankerung von subpellikulären Mikrotubuli geformt (Nichols und Chiapinno, 1987). Bei höheren Vergrößerungen beobachteten Nichols und Chiapinno (1987), dass der Polarring aus zwei dünneren Ringen besteht, wobei der posterior liegende Ring als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTO) dient (Russel und Burns, 1984; Nichols und Chiapinno, 1987). Am Polarring setzen die **subpellikulären Mikrotubuli** an, welche sich in einer helikalen Anordnung bis hin zum Zellkern erstrecken (Chobotar und Scholtyseck, 1982; Chiappino et al., 1984; Nichols und Chiapinno, 1987). Die Anzahl der Mikrotubuli (18 – 73) variiert stark stadienund auch speziesspezifisch (Scholtyseck et al., 1972). Die Mikrotubuli der Coccidia haben einen Durchmesser von 20 – 26 nm und sind wie herkömmliche Mikrotubuli aus 13 längsverlaufenden Protofilamenten aufgebaut, welche ihrerseits aus α - und β -Tubulindimeren bestehen (Russel und Burns, 1984; Schwarzman et al., 1985; Hu et al., 2002).

Das Konoid stellt einen hohlen, abgestumpften Kegel dar, der aus einem Satz von spiralig angeordneten, filamentären Strukturen mit 25 – 30 nm im Durchmesser besteht (Chobotar und Scholtyseck, 1982). Die Anzahl der fibrillären Strukturen unterliegt starken speziesabhängigen Schwankungen (Chobotar und Scholtyseck, 1982). In Abhängigkeit von den jeweiligen Vertretern der Apicomplexa hat das Konoid an seinem Vorderende einen Durchmesser von 150 – 400 nm, an seinem Hinterende von 200 – 530 nm (Scholtyseck, 1973). Die Länge des Konoids beträgt 1/20 – 1/75 der Länge der einzelnen Parasitenstadien (Scholtyseck et al., 1970). Die filamentären Strukturen des Konoids sind aus unkonventionellen Tubulinpolymeren aufgebaut (Hu, et al., 2002). Konoidale Tubulin-Protofilamente werden (anders als die geschlossenen, aus 13 Protofilamenten bestehenden Mikrotubuli) als geöffnete, Komma-ähnliche und aus 9 Protofilamenten bestehende Strukturen beschrieben (Hu et al., 2002). Am Vorderende des Konoids befinden sich zwei präkonoidale Ringe, welche integrale Bestandteile des Konoids darstellen und durch eine Membran mit fibrillären Strukturen des Konoids verbunden sind (Scholtyseck et al., 1970; Chobotar und Scholtyseck, 1982). Innerhalb des Konoids verlaufen die Ausführungsgänge der Rhoptrien getrennt durch zwei konventionell aufgebaute Mikrotubuli (Hu, et al., 2002; Nichols und Chiappino, 1987). Die Lage des Konoids bezüglich des Polarring-Komplexes ist variabel; es kann bis über das MTO vorgestreckt werden (Roberts und Hammond, 1970;

Monteiro et al., 2001; Mondragon und Frixione, 1996). Die Protrusion des Konoids ist abhängig von der Konzentration von Ca^{2+} im Zytoplasma der Parasitenzelle (Mondragon und Frixione, 1996; Monteiro et al., 2001). Es wird vermutet, dass das Konoid eine mechanische Rolle bei der Penetration von Zellen spielt (Chobotar und Scholtyseck, 1982; Mondragon und Frixione, 1996).

Zu den sekretorischen Organellen des apikalen Komplexes gehören **Mikronemen**, **Rhoptrien** und **dichte Granula**, deren Sekretion im Laufe des Invasionsvorganges zeitlich aufeinander abgestimmt ist (Carruthers and Sibley, 1997).

Die Mikronemen sind osmiophile, längliche, vesikuläre Strukturen (Chobotar und Scholtyseck, 1982), welche ihren Inhalt (Mikronemenproteine) unmittelbar vor und während der Invasion der Wirtszelle sezernieren (Übersicht bei Tomley und Soldati, 2001; Carruthers, 2002). Die Ausschüttung erfolgt über das "vorgestreckte" Konoid vermutlich mittels der Fusion von einzelnen Mikronemen-Vesikeln mit der äußeren Plasmamembran (Carruthers und Sibley, 1999). Bei Apicomplexa wurden bisher 29 Mikronemenprotein-kodierende Gene identifiziert (Übersicht bei Tomley und Soldati, 2001). Dabei wurden auf Proteinebene einige Leitmotive festgestellt:

 etwa bei der Hälfte der bekannten Mikronemenproteine wurde eine Transmembrandomäne in der Nähe des COOH-Terminus vorhergesagt (Carruthers, 2002);

• viele Mikronemenproteine weisen Homologien zu adhäsiven Motiven auf, welche sich in Integrinen, Trombospondin, Kallikrein und EGF (Epidermal growth factor) in höheren Eukarionten finden (Übersicht bei Tomley und Soldati, 2001);

• mehrere Mikronemenproteine können miteinander interagieren und sogenannte adhäsive Komplexe bilden (Carruthers, 2002; Meissner et al., 2002). TgMIC 1 (*Toxoplasma gondii*-Mikronemenprotein 1) besitzt zwei Thrombospondin-ähnliche Polypeptide und hat als Interaktionspartner TgMIC 4 (6 Kallikrein-ähnliche "Apple"-Domänen) und TgMIC 6 (3 EGF-ähnliche Domänen und eine Transmembran-Domäne); beide TgMIC 1 und TgMIC 4 können Liganden der Wirtszelloberfläche binden und sind für die adhäsiven Eigenschaften des Komplexes verantwortlich. In diesem Komplex dient vermutlich TgMIC 6 mit seiner Transmembrandomäne als ein Linker zwischen adhäsiven Domänen der Micronemenproteine und dem Aktin-Myosin-Motor (Meissner et al., 2002; Reiss et al., 2001). In den anderen Mikronemenprotein-Komplexen [TgMIC 8/MIC 3] und [TgMIC 2/M2AP] fungieren TgMIC 8 und TgMIC 2 mit ihren Transmembrandomänen als Träger des Proteinkomplexes auf der Parasitenoberfläche (Reis et al., 2001; Rabenau et al., 2001). Bei *Eimeria tenella* werden die adhäsiven Komplexe zwischen *Et*MIC 4 und *Et*MIC 5 gebildet, wobei *Et*MIC 4 als Träger des für die Zelladhäsion verantwortlichen *Et*MIC 5 dient (Periz et al., 2005)

An Mikronemenproteinen wurde gezeigt, das sie nach der Sekretion auf der Pellikulaoberfläche mit Hilfe eines pellikulären Aktin-Myosin-Motors vom apikalen Pol in Richtung Hinterende gebracht werden. Dabei wird postuliert, dass im Falle einer erfolgreichen Bindung von adhäsiven Mikronemenprotein-Komplexen an ihren Liganden im Wirt und Versetzung von oben genannten Komplexen vom apikalen zum distalen Pol eine Vorwärtsbewegung des Parasiten stattfindet (Carruthers und Sibley, 1999; Bumstead und Tomley, 2000). Immer noch ist aber unbekannt, über welches Molekül (welche Moleküle) die Verbindung zwischen dem Aktin-Myosin-Motor und der zytoplasmatischen Domäne der Mikronemenprotein-Komplexe stattfindet (Übersicht bei Soldati et al., 2001, Soldati und Meissner, 2004).

Andere Organellen mit sekretorischer Funktion sind Rhoptrien. Die Rhoptriensekretion erfolgt nach der Reorientierung des Parasiten mit dem apikalen Pol zu Wirtszellmembran und während des Endringens in die Wirtszelle. Dabei wird bei der invadierten Wirtszelle durch die Invagination der Wirtszellmembran eine parasitophore Vakuole (PV) gebildet (Nichols et al., 1983; Suss-Toby et al., 1996). Hakansson et al. (2001) berichteten bei T. gondii über die Entstehung von Satelliten-Vesikeln während des Invasionsvorganges, welche sich im Wirtszellzytosol befinden und ohne Beteiligung der Wirtzellmembran geformt werden. Beide Strukturen beinhalten Rhoptrien-spezifische Proteine ROP1 (Saffer et al., 1992) und ROP 2 (Beckers et al., 1994) und können nach der Invasion miteinander fusionieren (Hakansson et al., 2001). Die aus Rhoptrien sezernierten Proteine spielen eine Rolle bei der Modifizierung der Wirtszellmembran zur PV-Membran (Mordue et al., 1999). Um die spätere Fusion von Lysosomen mit PV verhindern zu können, werden die Zelloberflächenrezeptoren (FcR, MHC I und MHC II) während der Bildung der PV-Membran ausgeschlossen. Ferner fehlten in der PV-Membran auch lysosomale Kompartimentmarker und Fusionsproteine (rab5, rab7 NSF, H⁺ - Protonpumpe) (Mordue und Sibley, 1997). Außerdem wurde die Beteiligung von in PV-assoziiertem ROP 2 bei der Anheftung von Wirtsmitochondrien an die PV und der Rekrutierung von Lipiden aus dem Zytosol beschrieben (Nakaar et al., 2003).

Dichte Granula sind mit einer Membran abgegrenzte, kugelige Vesikel und befinden sich je nach Stadium und Spezies nicht nur im apikalen Komplex sondern auch im Zytoplasma hinter dem Zellkern (Scholtyseck, 1979; Carruthers und Sibley, 1997). Die Sekretion aus dichten Granula erfolgt in die PV nach dem Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle (Leriche und Dubremetz, 1990). Im Unterschied zu Mikronemen und Rhoptrien setzen dichte Granula ihren Inhalt nicht über den apikalen Pol, sondern über die Pellikula, vorwiegend im apikalen Bereich, frei (Leriche und Dubremetz, 1990; Dubremetz et al., 1993). Sie wandern hierzu in Richtung Pellikula und fusionieren mit der äußeren Plasmalemma (Leriche und Dubremetz, 1990). Einige Proteine aus den dichten Granula wurden bei T. gondii teilweise charakterisiert. Unter ihnen finden sich Nukleosidtriphosphat-Hydrolasen (Sibley et al., 1994); Proteaseinhibitoren (Morris et al., 2002) und 9 dichte Granula-spezifische Proteine GRA 1 – 9, deren Funktion nicht vollständig aufgeklärt wurde (Cesbron-Delauw, 1994; Fischer et al., 1998; Jacobs et al., 1998; Carey et al., 2000; Adjogble et al., 2004). Einige Dichte Granula-spezifische Proteine (GRA 3, GRA 5) werden in die PV-Membran integriert, andere (GRA 2, GRA 1) verbleiben zwischen PV-Membran und Pellikula (Lecordier et al., 1993). Bermudes et al. (1994) beobachteten fluoreszenzmikroskopisch im Wirtszellzytoplasma feine Stränge von GRA 3, welche zu den Vakuolen oder zum Zellkern abzweigten.

2.3 Proteinkinasen mit Calmodulin-ähnlicher Domäne und bekannte Vertreter bei Apicomplexa

Die Proteinphosphorylierung stellt einen wichtigen biochemischen Prozess bei der Signaltransduktion dar. Die kovalente Bindung von Phosphatgruppen an Aminosäuren kann bei den Zielproteinen Veränderungen der Konformation bewirken und damit verbunden zu Veränderungen ihrer enzymatischen Aktivität oder Ligandenbildung führen. Die Proteinphosphorylierung ist ein reversibler Prozess und kann durch Phosphatasen rückgängig gemacht werden. Das macht Schritte der Signaltransduktion, welche durch Kinasen und Phosphatasen vermittelt werden zu einem feineinregulierbaren System (Alberts et al., 2002).

Die Proteinkinasen mit Calmodulin-ähnlicher Domäne werden aufgrund ihrer Sequenzhomologien und ihrer enzymatischen Spezifität in einer Superfamilie der Serin-, Threonin-, und Tyrosinkinasen zusammengefasst. Die Moleküle dieser Superfamilie katalysieren den Transfer von Phosphat vom ATP an die entsprechende Aminosäure des zu phosphorylierenden Proteins. Die Superfamilie teilt sich in 5 große Gruppen, unter welchen sich die CaM-Gruppe (Calmodulin; Aktivierung von Kinasen durch Wechselwirkung mit Ca^{2+}) findet (Hanks und Hunter, 1995). Calmodulin ist ein kleines calciumbindendes Molekül, das in allen eukaryontischen Zellen vorhanden ist und als Mehrzweckrezeptor für intrazelluläre Ca^{2+} -Schwankungen dient. Das Protein besitzt an seinen NH₂- und COOH-terminalen Enden zwei hochaffine Ca^{2+} -Bindungsdomänen (EF-Hände). Calmodulin verändert nach der Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen seine dreidimensionale Konformation und in der Interaktion mit Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Kinasen führt dies zu einer allosterischen Aktivierung des Enzyms (Alberts et al., 2002).

In die CaM-Gruppe gehört ebenfalls die erstmals bei Pflanzen und später bei einigen Protozoen beschriebene relativ neue Familie der Proteinkinasen mit Calmodulin-ähnlicher Domäne (CDPK). CDPKs wurden bis jetzt bei Pflanzen, einigen Dinoflagellata und Apicomplexa sowie Grünalgen beschrieben, aber sie wurde nicht bei höheren Tieren und Pilzen ermittelt (Harper et al., 1991; Zhao et al., 1992). Bei den Vertretern der CDPK-Familie handelt es sich um Proteine, die aus einer Polypeptidkette mit einer katalytischen Kinasedomäne am NH2-terminalen Ende, einer Zwischendomäne und einer Calmodulinählichen Domäne mit 4 Ca²⁺-bindenden EF-Händen am COOH-terminalen Ende bestehen. Die Zwischendomäne wirkt auf die katalytische Domäne autoinhibitorisch (Harper et al., 1994; Vitart et al., 2000). Die am COOH-terminalen Ende liegende Ca²⁺-Bindungsdomäne stellt einen Calciumsensor zur Aktivierung der Kinase dar (Christodoulou et al., 2004; Weljie und Vogel, 2004). An der AtCDPK Isoform AK 1 aus Arabidopsis thalina und PfCDPK Isoform 1 aus Plasmodium falciparum wurde gezeigt, dass die COOH-terminal liegenden EF-Hände (COOH-Lobus) eine höhere Bindungsaffinität zu Ca²⁺ als die NH₂terminal liegenden EF-Hände (NH₂-Lobus) besitzen (Christodoulou et al., 2004; Zhao et al., 1994, siehe Abbildung 2.3). Dies führt dazu, daß vermutlich in vivo der COOH-Lobus Calmodulin-homologen Domäne permanent mit Ca²⁺ aus dem basalen der zytoplasmatischen Calcium-Pool aufgeladen ist, und der NH₂-Lobus mit seiner geringeren Affinität zu Ca²⁺ als sensibler Sensor für Calcium-Konzentrationsschwankungen dient. Nach der Bindung von zwei weiteren Calciumionen am NH2-Lobus erfolgt eine weitere Veränderung der dreidimensionalen Konformation des Proteins. Im Zuge dieser Veränderung löst sich das Pseudosubstrat der autoinhibitorischen Domäne vom aktiven Zentrum des Enzyms und die Kinase wird aktiv (Christodoulou et al., 2004).



Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der CDPK – Aktivierung durch Ca²⁺ am Beispiel der Aktivierung von *At*CDPK Isoform AK 1. (Quelle : Christodoulou et al., 2004)

Die Sequenzierung des *Arabidopsis thaliana*-Genoms zeigte, daß 34 Gene verschiedene Isoformen der CDPK kodieren und die Erkenntnisse aus Sequenzierprojekten von Kulturpflanzen (Soja, Tomate, Reis und Mais) deuten auch auf die Zugehörigkeit von CDPK-Genen zu einer Multigenfamilie, wobei die einzelnen CDPK-Isoformen durch "multi copy"-Gene kodiert werden (Harper and Harmon, 2005). Die unterschiedliche Lokalisation von verschiedenen Isoformen der CDPKs in den Pflanzenzellen lässt vermuten, daß sie an vielseitigen Wegen der Signaltransduktion teilnehmen. Bei Pflanzen wurden die CDPKs im endoplasmatischem Retikulum (Lu und Hrabak, 2002; Dammann et al., 2003), in Plasmamembranen (Yoon et al., 1999; Dammann et al., 2003) und

Peroxisomen (Dammann et al., 2003) nachgewiesen. Die Mehrheit der CDPK-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* trägt die Konsensussequenz für die N-Myristoylierung am Glycin 2 (Boisson et al., 2003), wobei die N-Myristoylierung am NH₂-terminalen Glycin bei *Cucurbita pepo* CDPK 1 (Zucchini, Ellard-Ivey et al., 1999), *Arabidopsis thaliana* CPK 2 (Lu und Hrabak, 2002), *Lycopersicon esculentum* CPK 1 (Tomate; Rutschmann et al., 2002) nachgewiesen wurde. Die Myristoylierung ermöglicht die Verankerung des Proteins über einen Fettsäurenrest in der Membran.

Die biochemischen Untersuchungen der Aktivität von verschiedenen CDPK-Isoformen in verschiedenen Pflanzen lassen vermuten, dass CDPKs bestimmte lokale Calcium-Signale erkennen und je nach der CDPK-Isoform unterschiedliche Signaltransduktionswege einschalten können (Übersicht bei Ludwig et al., 2004). Die sogenannten Ca²⁺-Signaturen werden von verschiedenen pflanzlichen Stressfaktoren wie Kälte, Dürre, Salz oder pathogenen Mikroorganismen ausgelöst (Übersicht bei Evans et al., 2001) und führen über verschiedene CDPK-Isoformen zur Aktivierung bestimmter Signalwege, welche mit der Aktivierung von Resistenz-Genen gegenüber den jeweiligen Streßfaktoren enden (Ludwig et al., 2004).

Die CDPKs bei Apicomplexa haben die gleiche Domänenstruktur wie jene bei Pflanzen und weisen etwa 50 % Ähnlichkeit mit diesen auf, die CDPK-Familie bei Apicomplexa ist aber mit deutlich weniger Isoformen in jedem Organismus vertreten. Das Genom von *Plasmodium falciparum* kodiert 6 putative CDPKs und eine CDPK-ähnliche Kinase, bei der aber die Calmodulin-ähnliche Domäne fehlt (Billker et al., 2004). Bei *T. gondii* sind bis jetzt nur 2 CDPKs sequenziert worden (Kieschnick, 2001). Die Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über einige bekannte CDPKs bei Apicomplexa.

Die Rolle der CDPKs bei Apicomplexa wie auch bei Pflanzen wird der Ca²⁺-abhängigen ist Signaltransduktion zugeschrieben. Auffallend auch das Expressionsmuster verschiedener CDPK-Isoformen bei unterschiedlichen Parasitenstadien. Bei Toxoplama gondii-Tachyzoiten werden TgCDPK 1 und TgCDPK 2-Transkripte nachgewiesen, aber nur TgCDPK 1-mRNA wird in Protein translatiert (Kieschnick et al., 2001). Bei Plasmodium falciparum-befallenen Erythrozyten wurden PfCDPK 1 als Protein und *Pf*CDPK 2 als Transkript im Ringstadium (5 – 18 h p. i.), Trophozoitenstadium (17 – 33 h p.i.) und Schizontenstadium (37 – 43 h p.i.) nachgewiesen (Zhao et al., 1993; Färber et al., 1997), wobei Li et al. (2000) die PfCDPK 1-mRNA in allen intraerythrozytären Stadien nachweisen konnten. Die Expression einer weiteren Isoform, PfCDPK 3, findet in

intraerythrozytären Geschlechtsstadien – Gametozyten statt (Li et al., 2000) und die Expression von *Pf*CDPK 4 wurde sowohl in intraerytrozyteren Stadien (Gametozyten) als auch in Entwicklungsstadien in Moskitos (Gameten und Ookineten) nachgewiesen (Billker et al 2004).

Spezies	Molekül	Accesion-number	Beschrieben von/durch
C. hominis	ChCDPK 1	EAL36787	Genomsequenzierung
C. hominis	ChCDPK 2	EAL38263	Genomsequenzierung
C. hominis	ChCDPK 7	EAL37804	Genomsequenzierung
C. parvum	CpCDPK 3	<u>AAS47707</u>	Huang, 2004
T. gondii	TgCDPK 1	<u>AAG53993</u>	Kieschnick, 2001
T. gondii	TgCDPK 2	<u>AAG53994</u>	Kieschnick, 2001
E. tenella	<i>Et</i> CDPK	<u>CAA96439</u>	Dunn et al., 1996
P. falciparum	<i>Pf</i> CDPK 1	<u>CAA47704</u>	Zhao, 1992
P. falciparum	PfCDPK 2	<u>X99763.1</u>	Färber, 1997
P. falciparum	PfCDPK 3	Q9NJU9	Genomsequenzierung
P. falciparum	<i>Pf</i> CDPK 4	Q8IBS5	Gardner et al., 2002

Tabelle 2.1: CDPKs von Apicomplexa aus Datenbanken

Es liegen Befunde vor, nach denen CDPKs an der Invasion von Wirtszellen und am Parasiten-Egress beteiligt sind. Der Einsatz des $[Ca^{2+}]_i$ -abhängigen Proteinkinasen-Inhibitors KT5926 in einer Konzentration von 1 – 5 µM führte zur Hemmung der "gliding motility" und Invasionsfähigkeit von *T. gondii*-Tachyzoiten. Dies könnte aber auch durch die Inhibition der Freisetzung von Mikronemenproteinen erklärt werden, denn es wurde keine Sekretion und kein "surface capping" von *Tg*MIC 2 registriert (Dobrowolski et al., 1997). KT5926 ist ein Inhibitor der Myosin light-chain kinase (MLCK), welcher in der Konzentration von 20 nM (IC₅₀ für MLCK aus Säugern) beide (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige und –unabhängige) MLCK's der glatten Muskulatur blockiert (Nakanishi et al., 1990). Interessanterweise wird die Kinaseaktivität von rekombinanter *Tg*CDPK 1 auch durch KT5926 in der Konzentration von 1 µM inhibiert (Kieschnick et al., 2001). Ein bei *P. berghei* orthologes Molekül, *Pb*CDPK 4, ist unter anderem auch an der Invasion beteiligt. Billker et al. (2004) beobachteten eine 50fache Reduktion der Invasionsfähigkeit von Ookineten zu Moskito, welche aus *Pb*CDPK 4-knockout Gameten gebildet wurden.

Eine andere Funktion von *Pb*CDPK 4 ist die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade als Antwort auf einen erhöhten Ca^{2+} -Spiegel nach Induktion durch das Moskito-spezifische Molekül Xanthurensäure (Billker et al. 2004). Diese *Pb*CDPK 4-abhängige Regulation

koordiniert bei männlichen Gamonten die Parasitendifferenzierung, und zwar die Replikation des Genoms, Mitose-assoziierte Veränderungen des Zytoskeletts und die Zusammensetzung von Axonemen (Billker et al. 2004).

Bei Sporozoiten von *Eimeria maxima* wurde CDPK erstmals als eines der Leukozytenstimulierenden Antigene identifiziert (Bumstead et al. 1995). Nachfolgende Charakterisierung der CDPK aus *Eimeria maxima* und *Eimeria tenella* zeigte, dass die beiden Kinasen zu CDPK I aus *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* hoch homolog sind. *Et*CDPK und *Em*CDPK konnten nicht in unsporulierten Oozysten nachgewiesen werden; während der Sporulierung wird das Protein erst nach 6 – 18 h nachgewiesen. Bei den sporulierten Oozysten und Sporozoiten wird die Kinase konstitutiv exprimiert und im apikalen Bereich des Methanol/Aceton-fixierten Sporozoiten lokalisiert (Dunn et al., 1996). Bei *E. tenella*-infizierten Zellen hatte die CDPK eine tendenzielle Oberflächenlokalisation. Die genaue Funktion der CDPK bei Eimerien ist unbekannt, allerdings wird die Beteiligung der CDPK bei der Infektion von Wirtszellen und später beim Egress von Merozoiten I aus infizierten Zellen angenommen (Dunn et al., 1996).

2.4 Rolle des Ca²⁺ als Second Messenger in der Signaltransduktion bei Apicomplexa

Viele extrazelluläre Signale induzieren eine Erhöhung der zytosolischen Konzentration Ca^{2+} , welches als wichtiger "second messenger" in eukariontischen Zellen sowohl bei der Antwort auf externe Stimuli als auch bei der Steuerung von vielen weiteren intrazellulären Prozessen eine Rolle spielt. In eukariontischen Zellen dienen Ca^{2+} -bindende Proteine, wie Troponin C, Calmodulin, CDPK als Überträger des Calciumsignals und können in vielen Fällen enzymatische Kaskaden auslösen. Dies resultiert unter anderem in einer Aktivierung der Gentranskription und Translation (Alberts et al., 2002).

Die Invasion von Wirtszellen durch Parasiten des Stammes Apicomplexa hängt kritisch von der Mobilisierung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern und dem Ca²⁺-Einstrom in das Parasitenzytoplasma ab. Das Invasionsvermögen von *T. gondii*-Tachyzoiten wird dramatisch reduziert, wenn das extrazelluläre Calcium durch die Chelatoren EGTA oder BAPTA und das zytoplasmatische Calcium durch BAPTA-AM oder die Kombination von EGTA und A23187 abgereichert wird (Pezzella et al., 1997; Vieira und Moreno, 2000). Lovett und Sibley (2003) postulieren allerdings, dass nur die Chelation von intrazellulärem

Calcium einen Einfluß auf das Invasionsvermögen von *T. gondii* – Tachyzoiten hat und die Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ Mikronemensekretion und "gliding motility" nicht beeinflusst.

Auf der anderen Seite löst der mit dem Ca²⁺-Ionophor A23187 induzierte Anstieg der intrazellulären Ca²⁺- Konzentration morphologische Veränderungen in der Parasitenzelle aus. Bei T. gondii-Tachyzoiten wird nach Ca²⁺-Ionophor-Behandlung das Konoid herausgestreckt, welches sich vor der Behandlung bei den meisten Parasitenzellen in einem zurückgezogenen Zustand auf der Höhe des Polarring-Komplexes befindet (Monteiro et al., 2001; Mondragon und Frixione, 1996). Behandlung mit den Ca²⁺-Inophoren A23187 oder Ionomycin ruft auch Mikronemensekretion hervor, wobei Mikronemenproteine offenbar durch die Fusion von Mikronemenvesikeln mit der Plasmamembran sezerniert werden (Carruthers und Sibley, 1999). In dem apikalen Bereich der Parasitenzelle wurden nach der A23187-Behandlung auch elektronen-transparente Vesikel beobachtet, welche den entleerten Mikronemen ähnlich sahen (Carruthers und Sibley, 1999; Monteiro et al., 2001). Monteiro et al. (2001) stellten nach der A23187-Behandlung auch fest, daß die dichte Granula sich am Rande der Parasitenzelle befanden und in manchen Fällen einen Kontakt zum IMC hatten. Im Gegensatz zu Mikronemen konnte der erhöhte Ca²⁺-Spiegel keine Sekretion von Rhoptrien und Dichten Granula auslösen (Carruthers und Sibley, 1999). Auch beim Egress intrazellulärer Parasiten aus ihren Wirtszellen scheinen Calciumsignale beteiligt zu sein. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine experimentell erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ zum Egress intrazellulärer Stadien von T. gondii führt (Ellison et al., 2001; Stommel et al., 1997; Black et al., 2000). Bei in vitro-Kulturen von Sarcocystis neurona bewirkte die Erhöhung der [Ca2+]i die synchrone Freisetzung der Merozoiten aus den reifen Schizonten (Ellison et al., 2001).

Aus früheren Arbeiten geht deutlich hervor, dass die Calciumsignale im Zytosol des Parasiten und der Wirtszelle bei verschiedenen Prozessen im Infektionsgeschehen beteiligt sind und offenbar die Signaltransduktionskaskaden mittels Calcium-bindender Proteine wie Calmodulin, CDPK, MLCK einleiten. Im Moment ist noch sehr wenig über Signaltrasduktion bei Apicomplexa bekannt. Viele Prozesse, wie die Ausstülpung des Konoids, die Sekretion aus Organellen des Apikalkomplexes oder die "gliding motility" sind noch in weiten Teilen unverstanden. Es ist wichtig, die Mechanismen der Signaltransduktion während der Invasion und Parasit-Wirt-Interaktion aufzuklären, da einzelne Komponeneten von Signalkaskaden als Angrifsstellen für Antiparasitika fungieren könnten. In diesem Zusammenhang bietet sich die CDPK der Apicomplexa als ein mögliches Zielprotein bei der Entwicklung einer neuen causativen Coccidien-Therapie an.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

3.1.1 <u>Kälber</u>

Um *Eimeria bovis*-Oozysten zu gewinnen und die Erhaltung des *E. bovis*-Stammes [dabei handelt es sich um einen *E. bovis*-Stamm H, ein vor einigen Jahren in Norddeutschland gewonnenes Feldisolat (Fliege et al., 1992)] zu sichern, werden regelmäßig Bullenkälber eingesetzt. Konventionell gezüchtete und gehaltene Kälber der Rasse Deutsch Schwarzbunte werden im Alter von 2 Wochen von ortsansässigern Viehhändlern gekauft. Um akzidentelle Kokzidieninfektionen zu vermeiden, werden die Kälber im institutseigenen Stall untergebracht und aufgezogen. Zwei getrennte Stockwerke stehen für die kokzidienfreie Haltung zur Verfügung. Die Kälber werden am Anfang zweimal täglich mit Milchaustauscher (200 g/Mahlzeit, RCG, Münster) gefüttert. Ab der zweiten Woche wird zusätzlich pelletiertes Ergänzungsfutter (Raiffeisen Warenzentrale Rhein Main eG Werk, Wiesbaden) *ad libitum* gegeben. Wasser und autoklaviertes Heu stehen ebenso *ad libitum* zur Verfügung.

3.1.2 <u>Gewinnung vom Seren</u>

Material:

- Blut
- Glycerol (MP Biochemicals)

Vorgehensweise:

Das abgenommene Blut wird für 4 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich das Blutgerinnsel bildet. Zur Retraktion des Blutgerinsels wird der Ansatz bei 4° C über Nacht inkubiert. Danach wird das Serum gesammelt und das Gerinnsel wird zusätzlich 10 min bei 3000 ×g zentrifugiert. Das Serum wird aus dem Überstand entnommen und aliquotiert bei -20° C aufbewahrt. Um wiederholtes Auftauen und Einfrieren des Serums zu vermeiden, wird das Serum 1:1 mit Glycerol vermischt und bei -20° C aufbewahrt.

3.2 *Eimeria bovis*

3.2.1 Infektion von Kälbern mit *E. bovis*

Material:

- Oozystensuspension in 2% K₂Cr₂O₇ (wird bei 4° C im Kühlraum aufbewahrt)
- Phosphate buffered saline (PBS) wird aus einer 10fachen Stammlösung zubereitet
- 10× PBS
 - 137 mM NaCl, 80 g/l (Roth) 2,7 mM KCl, 2 g/l (Merck) 1,5 mM KH₂PO₄, 2 g/l, (Merck) 6,5 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 11,5 g/l (Merck)

Vorgehensweise:

Kälber werden im Alter von ca. 7 Wochen mit je. 50.000 sporulierten Oozysten von *E. bovis* infiziert. Dazu wird die entsprechende Menge Oozysten-Suspension 10 min bei $400 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wird dreimal mit PBS gewaschen um die Reste von K₂Cr₂O₇ zu entfernen. Anschließend wird es in 10 ml PBS resuspendiert und den Kälbern per os appliziert. Ab dem 18. Tag p. i. werden Kotproben täglich untersucht. Mit Beginn der Oozystenausscheidung (in der Regel dauert die Präpatenz 21 Tage) wird die Oozystenausscheidung täglich anhand der OPG (Oozysten pro Gramm Kot)-Werte ermittelt.

Für die Gewinung von Infektionssera werden die Kälber am 48 Tag p. i. mit der gleichen Oozystenmenge reinfiziert. Am 14. Tag nach der Reinfektion werden von jedem Kalb etwa 200 ml Blut entnommen und Serum gewonnen (Kapitel 3.1.2).

3.2.2 <u>Gewinnung von E. bovis-Oozysten</u>

Material:

- 3 Siebe mit Maschenweiten von 300 μ m, 150 μ m und 80 μ m
- gesättigte Zuckerlösung mit einer Dichte von 1,35
- Aräometer (IDL), Messbereich: 1 1.2 g/ml und 1.2 1.4 g/ml
- flache Plastikschalen und Glasplatten
- Plastikeimer, 101
- Zentrifugengefäße 250 ml aus Polypropylen (Herolab LongLife®)
- 4% und 2% $K_2Cr_2O_7$ Lösungen (Merck)
- 80 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen, Nunc EasYFlaskTM (Nunc)

Vorgehensweise:

Während der Patenz werden die Fäzes der Kälber mit einem OPG-Wert von ≥1000 gesammelt. Der Kot wird mit Leitungswasser durch die Siebe mit absteigender

Maschenweite gewaschen, um grobe Partikel aus der Suspension zu entfernen. Die resultierende Suspension wird in 101-Eimern 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Oozysten sedimentieren zu lassen. Danach wird vorsichtig etwa die Hälfte des Überstands abgekippt und verworfen. Die restliche Suspension, die die Oozysten im Sediment enthält, wird mit gesättigter Zuckerlösung im Verhältnis 1:1 gemischt, anschließend mit der gesättigten Zuckerlösung auf die Dichte von 1,15 justiert.

Die Flotation der Oozysten findet in Plastikwannen mit einer Oberfläche von 800 cm² statt. Zuerst werden die Plastikwannen mit aufgelegten Glasplatten mit Hilfe von Wasserwaage und Holzkeilen präzise waagrecht justiert. Dann werden auf die mit der Kot-Zucker-Suspension randvoll gefüllten Schalen möglichst luftblasenfrei die Glassplatten aufgelegt. Nach Ablauf der Flotationszeit von zwei Stunden werden die Glasplatten vorsichtig abgehoben und die an der Glasplattenunterseite anhaftenden, flotierten Oozysten mit Wasser abgewaschen. Die die abgewaschenen Oozysten enthaltende Flüssigkeit wird gesammelt und zentrifugiert (10 min 400 ×g); die Sedimente werden in Aqua dest. resuspendiert und anschließend 1:1 mit einer 4 % igen (w/v) Kaliumdichromatlösung vermischt. Die somit entstandene 2 % ige Kaliumdichromat-Oozysten-Suspension verbleibt bis zum Abschluß der Sporulation der Oozysten gewöhnlich 1 Woche in den offenen Schalen, wobei eine ausreichende Sauerstoffzufuhr gewährleistet sein muss. Diese wird durch ein zweimal tägliches vorsichtiges Aufrühren der Oozystensuspension oder durch das Einblasen von Luft mit Hilfe einer Pipette sichergestellt. Danach werden die sporulierten Oozysten nochmals abzentrifugiert (10 min 400 \times g) und in 2% iger Kaliumdichromatlösung aufgenommen. In dieser Lösung werden die sporulierten Oozysten in 75 cm² oder 175 cm²-großen Zellkulturflaschen bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt, wobei die Flaschen nicht dicht verschlossen sein dürfen, um den Zutritt von Sauerstoff zu ermöglichen.

3.2.3 <u>Gewinnung von E. bovis-Sporozoiten</u>

Material:

- Oozysten-Suspension in 2 % iger $K_2Cr_2O_7 L\ddot{o}sung$ (Kapitel 3.2.2)
- PercollTM (Amersham Bioscience)
- 1,5 M NaCl (Roth)
- 0,15 M NaCl (Roth)
- Natriumhypochloritlösung mit 4 % wirksamem Chlor, wird frisch von Natriumhypochlorit, NaClO (Roth; 12 % wirksames Chlor) hergestellt
- Inkubationsmedium wird frisch hergestellt und steril filtriert: 0,35 % L-Cystein·HCl (Serva)

1,68% Natriumhydrogenkarbonat, NaHCO₃ (Merk)

- Excystiermedium (nach dem Ansetzen steril filtriert und auf 37° C vorgewärmt):
- 0,12 g Trypsin 1:250 (Sigma)
 2,4 ml Rindergalle (die Galle wird aus der Gallenblase frisch geschlachteter Rinder entnommen und bei -20° C nicht länger als 3 Wochen aufbewahrt)
 27,6 ml 1 × HBSS (Hank's balanced salt solution) wird frisch aus 10 × HBSS erstellt;
- 75 cm² Zellkulturflaschen (Nunc)

Vorgehensweise:

Die *E. bovis*-Sporozoitengewinnung beinhaltet zwei Schritte: Oozystenaufreinigung und Excystierung. Die Oozystenaufreinigung erfolgt mit Hilfe einer isopyknischen Zentrifugation mit Percoll-Gradienten.

Herstellung von Percollgradienten:

Zuerst wird eine isotonische Percoll-Stocklösung (IPS) hergestellt. Dafür werden 9 Teile (v/v) Percoll und 1 Teil (v/v) 1,5 M NaCl-Lösung gemischt. Zur Herstellung einer 60 % igen (v/v) und 50 % igen (v/v) Percoll-Lösung werden IPS und 0,15 M NaCl wie folgt gemischt:

60 % ige Percoll-Lösung: 6 Teile (v/v) IPS + 4 Teile (v/v) 0,15 M NaCl-Lösung

50 % ige Percoll-Lösung: 5 Teile (v/v) IPS + 5 Teile (v/v) 0,15 M NaCl-Lösung

Jeweils 10 ml von der hergestellten Percoll-Lösungen werden in 14 ml-Beckmann-Zentrifugenröhrchen gefüllt und 20 min bei 4° C mit $30.000 \times g$ zentrifugiert; im Laufe dieser Zentrifugation baut sich ein Dichtegradient auf.

Oozystenaufreinigung:

Die Oozysten-Suspension wird zunächst 10 min bei 400 ×g zentrifugiert. Das Oozysten enhaltende Pellet wird in der Natriumhypochlorit-Lösung aufgenommen und im Eisbad unter Rühren 20 min inkubiert. Dieses Gemisch wird danach 5 min bei 200 ×g zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation befinden sich die Oozysten im Überstand, welcher mit der Pipette abgenommen und 1:1 mit Wasser gemischt wird. Dann folgt die nächste Zentrifugation (10 min bei 400 ×g), um Oozysten zu sedimentieren. Das Sediment wird mit wenig Wasser resuspendiert und auf den 60 % - Percoll-Gradienten aufgetragen. Der Gradient wird 20 min bei 400 ×g in einem Schwenkbecher-Rotor zentrifugiert. Die Oozysten-Bande, die sich im oberen Teil des Gradientes befindet wird abgesaugt und sofort auf den 50 %-Percoll-Gradienten aufgetragen. Die durch Zentrifugation (20 min, 400 ×g) entstandenen "sauberen" Oozysten-Banden werden gesammelt und mit mindestens

40 % (v/v) Wasser gemischt. Eine weitere Zentrifugation (20 min, 400 \times g) sedimentiert die Oozysten.

Für die Excystierung wird das Oozysten-Sediment mit dem sterilen Inkubationsmedium versetzt und in einer 80 cm²-großen Zellkulturflasche in 100 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37° C 20 Stunden inkubiert. Danach werden Oozysten und zum Teil ausgetretene Sporozysten aus dem Inkubationsmedium abzentrifugiert. Das Oozystensediment wird im bei 37° C vorgewärmten Exzystiermedium aufgenommen und in die 80 mm²-Zellkulturflaschen überführt. Die Exzystierung von Sporozoiten erfolgt in 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37° C unter mikroskopischer Kontrolle in stündlichen Intervallen. Die Exzystierung findet i. d. R. im Verlauf von drei bis vier Stunden statt.

Gewöhnlich wird bei einer Exzystierungsrate von 50 % die Suspension mit 400 ×g 10 min abzentrifugiert und das Pellet wird, je nach dem für welche Versuche die Sporozoiten eingesezt werden, entweder dreimal mit 1× PBS gewaschen und bei -80° C eingefroren oder im Zellkulturmedium aufgenommen. Die Sporozoitenanzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.4 Infektion von Bovinen fetalen Gastrointestinalzellen (BFGZ I) mit Sporozoiten und Entwicklung von *E. bovis*-Schizonten I in der Zellkultur

3.2.4.1 Wirtszellen BFGZ I

Material:

- Bovine fetale Gastrointestinalzellen (BFGZ I; Hermosilla et al., 2002)
- Versenpuffer (portioniert je 200 ml und autoklaviert): 136,9 mM NaCL, 8 g/l (Roth)
 2 mM KCl, 0,2 g/l (Meck)
 8,1 mM Na₂HPO₄×2H₂O, 1,45 g/l (Roth)
 1,4 mM KH₂PO₄, 0,2 g/l (Merck)
 5,3 mM EDTA, 0,2 g/l (Sigma)
 H₂O
- Gepufferte Trypsin-Lösung (wird sterilfiltriert und portioniert je 50 ml bei 4° C aufbewahrt): 136,9 mM NaCL, 8 g /l (Roth)
 5 mM KCl, 0,38 g/l (Merck)
 7 mM Na₂HPO₄×2H₂O, 0,125 g/l (Roth)
 5,5 mM Glucose, 1 g/l (Merk)
 0,82 mM Tris, 3 g/l (MP Biomedicals)
 2,5 g Trypsin 1:250 (Sigma)
 H₂O
- Trypsin/Versen-Puffer: 1 Teil gepuferter Trypsin-Lösung zu 4 Teilen Versenpufer dazugeben
- Iscove's modified dulbecco's medium, (IMDM; Sigma); vor der Verwendung müssen pro eine 500 ml Medium 100 ml L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma) zugegeben werden
- Foetales Kälber Serum, FKS (Biochrom)
- 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc)

- Zellkultur-Platten, Multidish 6 Wells Nunclon Delta Si (Nunc)
- Deckglässer, 24×24 mm

Vorgehensweise:

BFGZ I waren ursprünglich aus der Dünn- und Dickdarmschleimhaut 4 – 6 Monate alter Rinderfeten isoliert und immortalisiert worden (Hermosilla et al., 2002). Die Zelllinie wird in substituiertem IMDM mit 10 % FKS in 25 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Konfluenz der Zellrasen werden die Zellen einmalig mit Versenpuffer gewaschen und anschließend mit Trypsin in Versenpuffer (3 ml pro Flasche) abgelöst. Nach einmaligem Waschen im IMDM (5 min bei 400 ×g), werden die Zellen in jeweils 3 neue Flaschen oder in die Vertiefungen einer 6-Loch-Platte, die vorher mit jeweils einem Deckglas ausgelegt worden waren, verteilt. Mediumwechsel erfolgt jeden zweiten Tag. Zur Infektion mit *E. bovis*-Sporozoiten werden Zellrasen mit 70 – 80 % Konfluenz verwendet.

3.2.4.2 Infektion von BFGZ I

Material:

• Sporozoiten in IMDM

Vorgehensweise:

Je nach Fragestellung werden $2 \times 10^5 - 4 \times 10^5$ (pro Zellkulturflasche) oder $3 \times 10^4 - 6 \times 10^4$ (pro Vertiefung einer 6er Lochplatte) *E. bovis*-Sporozoiten auf die BFGZ I gegeben. Danach werden die Zellen weitere 14 – 20 Tage lang kultiviert. Ab dem 10. Tag p.i. kann man im Mikroskop die Makroschizonten beobachten, und ab dem Tag 14 p. i. erfolgt das Austreten von Merozoiten I aus Makroschizonten.

3.2.5 <u>Gewinnung von E. bovis-Merozoiten I aus Zellkultur</u>

Material:

- Infizierte BFGZ I mit reifen Schizonten
- 50 ml Zentrifugationsgefässe (Nunc)
- IMDM (Sigma)
- $1 \times PBS$
- 1,8 ml Kryogefässe (Nunc)

Vorgehensweise:

Die Merozoiten I-enthaltenden Zellkulturüberstände werden in den 50 ml-Zentrifugationsgefäßen gesammelt und 10 min bei 600 ×g zentrifugiert. Die Überstände werden abgesaugt und verworfen und die die Merozoiten und Zellreste enthaltenden Pellets werden im einem 50 ml-Zentrifugationsgefäß zusammengefügt und einmal mit PBS
gewaschen (10 min bei 600 ×g). Weitere Verunreinigungen, wie Wirtszellen oder ihre Reste werden durch dreifaches Waschen mit PBS entfernt. Dazu wird das Pellet in 20 ml $1 \times PBS$ resuspendiert und 1 min bei 200 ×g zentrifugiert. Der Merozoiten-enthaltende Überstand wird gesammelt und der Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Die gesammelten Überstände werden 15 min bei 300 ×g zentrifugiert, um die Merozoiten I zu sedimentieren. Das Waschen unter diesen Bedingungen wird noch einmal wiederholt. Je nach Verwendung werden die Merozoiten I entweder in 1 ml PBS bei -80° C oder in Pelletform (für die Präparation von Nukleinsäuren) in einem 1,5 ml-Zentrifugengefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.3 Nukleinsäuren

3.3.1 <u>Gewinnung von DNA aus E. bovis-Sporozoiten</u>

Material:

- frisch excystierte Sporozoiten
- DNA Extraktionspuffer, pH 8 100 mM Tris (MP Biomedicals) 100 mM EDTA (Sigma) 0,5 % Sodium Dodecyl Sulfate, SDS (Serva)
- Ribonuclease A (Rnase A; Sigma), Stammlösung: 20 mg/ml; wird bei –20° C aufbewahrt
- Proteinase K (Serva) Stammlösung: 20 mg/ml wird bei –20° C aufbewahrt
- Roti[®]-Phenol (Roth)
- Chloroform/Isoamylalkohol: Chloroform wird mit Isoamylalkohol in einem Verhältnis von 49:1 gemischt
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol: Phenol wird im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol (49/1) gemischt und bei 4° C aufbewahrt
- 3M Natriumacetat: der pH-Wert wird mit Essigsäure auf pH 5,2 eingestellt; die Lösung wird autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.
- Isopropanol (Riedel-de Haën)
- TE Puffer (Kaptel 3.3.1)
- QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen)

Vorgehensweise:

Für die Gewinnung von genomischer DNA wird das aus Sporozoiten bestehende Pellet (Kapitel 3.2.3) in Extraktionspuffer aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wird auf einem Schüttler 30 min bei 37° C inkubiert. Es folgt eine Rnase A-Behandlung (30 min bei 37° C, Endkonzentration der Rnase 20 μ g/ml) und eine Proteinase K-Behandlung (5 h bei 56° C, bei langsamer Zugabe der Proteinase auf eine Endkonzentration von 100 μ g/ml und gelegentlichem Mischen), daß sich eine klare, visköse Flüssigkeit bildet. Diese, die freie genomische DNA enthaltene Flüssigkeit wird nach Zugabe eines gleichen Volumens

Phenol durch Kippen des Gefässes gemischt, bis sich eine Emulsion bildet. Die Emulsion wird mit 5000 ×g, 10 min bei 4° C zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wird mit einer Pipette mit weiter Öffnung in ein neues Gefäss verbracht, mit 1 Volumen Phenol/Chloroform versetzt, gemischt wie zuvor und nochmals zu den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Die Phenol/Chloroform-Extraktion wird einmal wiederholt. Der Überstand wird wiederum in ein neues Gefäß gegeben, mit einem Volumen Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert wie zuvor. Die Chloroformextraktion wird einmal wiederholt. Der Überstand der letzten Chloroformbehandlung wird in ein frisches Gefäss überführt, mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol (alternativ 1 Volumen Isopropanol) versetzt und mit 25000 ×g 30 min zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wird zweimal mit 70 % igem Alkohol gewaschen und in einem geöffneten Eppendorf-Gefäß luftgetrocknet. Das Pellet wird in 200 μ l TE Puffer aufgenommen und bei 4° C über Nacht gelöst. Optionales Erhitzen des DNA-Pellets auf 50° C im TE Puffer beschleunigt das Lösen der DNA. Die genomische DNA wird bei 4° C aufbewahrt.

Für die Isolierung der genomischen DNA wird alternativ der QIAamp[®] Mini Kit von Qiagen verwendet. Im Einzelnen: das Sporozoiten-Pellet wird in 180 µl ATL-Puffer aufgenommen. Anschließend werden 20 µl Proteinase K dazugegeben, durch kurzes Vortexen gemischt und bei 56° C unter Schütteln auf dem Schüttel-Heiz-Block solange inkubiert, bis die Sporozoiten sich komplett lösen. In der Regel ist die Lyse nach 2 - 3 Stunden abgeschlossen. Es werden 20 µl Rnase A zugegeben, gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Danach werden 200 µl Puffer AL dazugegeben, gemischt und 10 min bei 70° C inkubiert. Nach dem Abkühlen des Ansatzes bei Raumtemperatur werden 200 µl Ethanol (96 – 100 %) hinzugegeben und gemischt. Die Lösung wird auf die QIAamp-Zentrifuge-Säule geladen und 1 min bei 6000 ×g zentrifugiert. Es folgt das Waschen der Säule mit jeweils 500 µl der Puffer AW1 und AW2 bei 20 000 ×g. Die DNA wird mit 200 µl deionisiertem Wasser eluiert (2 min 6000 ×g). Diese Elution wird mit dem Durchfluß noch mal wiederholt. Die Ausbeute liegt bei 2 - 3 µg DNA aus 10⁷ Sporozoiten.

3.3.2 <u>Gewinnung von Gesamt-RNA und mRNA aus E. bovis-Merozoiten I</u>

Material:

- *E.bovis*-Merozoiten
- RNeasy[®]- Micro Kit (Qiagen)
- Oligotex TM-mRNA Mini Kit (Qiagen)

Vorgehensweise:

Für die Isolierung der gesamten RNA wird der RNeasy[®]-Kit verwendet. Die mRNA wird aus der gesamten RNA mit Hilfe des OligotexTM-Kits isoliert. Im Allgemeinen richteten sich die eingesetzten Verfahren nach den dem Kit beiliegenden Protokollen. In Kürze: die aus der Zellkultur gewonnenen Merozoiten I (Kapitel 3.2.5) werden in 600 μ l RLT Puffer aufgenommen, durch kurzes Vortexen gemischt und mit Hilfe einer sterilen 20G Kanüle und steriler Spritze resuspendiert. Dabei erfolgt das Scheren genomischer DNA und großer Molekülkomplexe. Es wird ein Volumen von 70 %igem Ethanol dazugegeben und durch Pipettieren gut gemischt. Da das Säulenladevolumen 700 μ l nicht übersteigen darf, wird der Ansatz portionsweise auf die Säule geladen und 1 min bei 800 ×g zentrifugiert. Die Säule wird zuerst einmal mit 700 μ l RW1 Puffer, dann zweimal mit 500 μ l RPE Puffer gewaschen (1 min 20000 ×g). Zur RNA-Elution werden 50 μ l DEPC-Wasser direkt auf die Säulenmatrix pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und 1 min bei 800 ×g zentrifugiert. Der Gesamt-RNA-Ertrag liegt bei 10 μ g aus 10⁶ Merozoiten I.

Die mRNA wird wie folgt isoliert:

Das Gesamtvolumen der RNA-haltigen Lösung wird mit DEPC-H₂O auf 500 μ l gebracht. 500 μ l OBB Puffer und 30 μ l Oligotex-Suspension wurden zugegeben und durch mehrfaches Kippen des Zentrifugengefäßes gemischt. Die Suspension wird 3 min bei 70° C auf einer Heizplatte inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen. Nach der Inkubation wird die Suspension auf Raumtemperatur gebracht (etwa 10 min). Die Oligotex-Matrix mit der gebundenen mRNA wird 2 min bei 14000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der sedimentierte mRNA-Oligotex-Komplex wird mit 400 μ l OW 2 Puffer gemischt. Die Suspension wird auf die Zentrifugier-Säule aufgetragen und diese in einem Sammelgefäß 1 min bei 20.000 ×g zentrifugiert. Die Säule wird mit 400 μ l OW Puffer 2 unter oben genannten Bedingungen gewaschen. Zur mRNA-Elution wird die Säule in ein 1,5 ml Zentrifugengefäß eingesetzt. Die Oligotex-Matrix wird durch Pipettieren mit 30 μ l 70° C-heißes OEB Puffer gemischt und dann 1 min bei 20.000 ×g zentrifugiert. Die Konzentration der mRNA wird mit Hilfe des Spektrophotometers abgeschätzt.

3.3.3 Fällung und Konzentrationsbestimmung der DNA

Material:

- Ethanol absolut (Riedel-de Haën), gekühlt bei -20°C
- Isopropanol (Riedel-de Haën)
- 70% Ethanol
- 3 M Natriumacetat, pH 5,5
- TE-Puffer, pH 7,5: 10 mM Tris-HCl (MP Biomedicals) 1 mM EDTA (Sigma)

Vorgehensweise:

Zur Fällung von DNA werden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol 96 % (alternativ 0,5 Volumen Isopropanol) zugegeben, vermischt und zur Sedimentation 30 min bei 20000 ×g und 4° C zentrifugiert (längere Zeiten bei $\leq 1 \mu g$ DNA). Anschließend wird der Überstand abgezogen und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, indem jeweils 500 µl Ethanol zum Pellet pipettiert werden und unter den Bedingungen von oben 5 min zentrifugiert wird. Das DNA-Pellet wird 10 min bei RT (alternativ 5 min bei 37°C) getrocknet und in der gewünschten Menge TE-Puffer (alternativ in sterilem H₂O milli-Q) aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-haltigen Lösungen erfolgt über Absorptionsspektrometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration wird nach der folgenden Gleichung ausgerechnet:

$$c[\mu g/ml] = OD_{260} \times V \times F$$

Die molare Konzentration von Oligonukleotiden (Primer) wird annähernd nach der folgenden Formel berechnet:

$$c[pmol/\mu l] = \frac{OD_{260} \times V \times 100}{n}$$

c Konzentration der Ausgangslösung OD₂₆₀ Adsorption bei 260 nm V Verdünnungsfaktor F Multiplikationsfaktor: 50 für ds DNA, 40 für RNA, 33 für ssDNA, 20 für Nukleotide. n Anzahl der Nukleotide

Alternativ kann die Menge der DNA direkt auf einem Agarosegel in Anwesenheit eines DNA-Markers bekannter Konzentration (GeneRulerTM DNA Ladder Mix) nach Färbung im Ethidiumbromidbad (Kapitel 3.3.4) abgeschätzt werden. Die Konzentration einer

bestimmten DNA-Bande wurde abgeschätzt, indem die Fluoreszenz-Intensität dieser Bande mit der einer von der Größe ähnlichen DNA-Marker-Bande verglichen wird.

3.3.4 DNA-Auftrennung in Agarosegelen

Material:

- Agarose, Elektrophoresis Grade (MP Biomedicals)
- 50× TAE-Puffer, pH 8,3 mit Essigsäure eingestellt: 2 M Tris (MP Biomedicals), 50 mM EDTA (Sigma), 0,5 M Natrium Acetat, (68 g/l).
- Ethidiumbromid (Roth): Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml) wird im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt; die Gele werden in einer Lösung aus ca. 0,5 μg/ml Ethidiumbromid in 1× TAE-Puffer im Dunkeln bei RT gefärbt
 10× Gel-Ladepuffer:
- 10× Gel-Ladepuffer: 5ml Glycerol,Ultra Pure (MP Biomedicals) 100 µl gesätigte Lösung Bromphenolblau (Merck) 100 µl 10 % Lösung Xylencyanol FF (Sigma) 2 ml 0,5 M EDTA (Sigma) 1 ml 10× TAE H₂O ad 10 ml
- Molekulargewichtstandard: GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Fermentas) Bandengrößen in kb: 10 / 8 / 6 / 5 / 4 / 3,5 / 3 / 2,5 / 2 / 1,5 / 1,2 / 1,031 / 0,9 / 0,8 / 0,7 / 0,6 / 0,5 / 0,4 / 0,3 / 0,2 / 0,1

Vorgehensweise:

DNA-Fragmente werden durch Elektrophorese in Agarose-Gelen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Elektrophorese wird in Horizontal-Apparaturen eigener Herstellung (Werkstatt MZI, Giessen) durchgeführt (Gelgrößen: Minigel $7.5 \times 5.0 \times 0.4$ cm und Midigel $14 \times 11 \times 0.4$ cm). Der Grösse der erwarteten DNA-Fragmente entsprechend werden 0.5 - 2% ige Agarose-Gele verwendet. Agarose wird in 1× TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, in den Gelschlitten gegossen und mit einem sog. Probenkamm versehen. Zum Laden wurden die Proben mit 1/10 Volumen Gel-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Spannung von 120 V für 45 min (Minigel) oder von 20 V für 12 h (Midigel) in einer mit 1 × TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer. Als Kontrolle für den Verlauf der Elektrophorese dient die Farbstoffbande des Ladepuffers. In einem 0,8 % igem Gel läuft Xylencyanol bei 4 kb und Bromphenolblau bei 0,3 kb. Die DNA-Fragmente werden im Gel nach Anfärbung mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (10 min und anschließend dreimal mit Leitungswasser gewaschen) unter UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und photographiert. Anhand der Molelulargewichtstandards wird die Größe der Banden bestimmt.

3.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Material:

- E.Z.N.A.[®] Gel-Extraktionskit (PeqLab)
- Silika-Suspension nach Boom et al. (1990)
- 6 M NaJ-Lösung
- Waschpuffer pH 7,5: 100 mM NaCl 10 mM Tris 2,5 mM EDTA 50°% Ethanol

Vorgehensweise:

Nach einer Ethidiumbromid-Färbung wird die DNA im Gel mit Hilfe schonenden, langwelligen UV-Lichts (365 nm) kurz visualisiert, um die Lage der gewünschten DNA-Bande markieren zu können. Das Gelstück mit der Bande wird ausgeschnitten, in 3 Volumen der NaJ-Lösung aufgenommen und bei 50° C 5 min unter Schütteln inkubiert, bis die Agarose komplett aufgelöst ist. Dann werden 10 µl der Glassmilch dazugegeben, gut vermischt und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Die Suspension wird 1 min bei 20.000 ×g zentrifugiert. Das Pellet wird zuerst zweimal mit der NaJ-Lösung, dann zweimal mit Waschpuffer gewaschen und getrocknet. Die DNA wird in der gewünschten Menge autoklaviertem H₂O (milli Q) aufgenommen. Alternativ kann die DNA mit Hilfe des EZNA[®] – Kits (gleiches Funktionsprinzip) isoliert werden.

3.3.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Material:

- zu spaltende DNA
- Restriktionsendonukleasen (Fermentas)
- 10× Puffer (Fermentas)

Vorgehensweise:

Die Spaltung erfolgt nach Angaben der Hersteller unter Verwendung mitgelieferter $10 \times$ Restriktionspuffer. Um "Stern"-Aktivitäten (Spaltung an abweichenden Erkennungssequenzen) zu vermeiden, darf die Konzentration des Enzyms 10 Units pro 1µg zu spaltenden DNA nicht übersteigen; die Glycerolkonzentration sollte ebenfalls $\leq 5\%$ sein. Zur Stabilisierung wird bei Inkubationszeiten von mehr als 3 h BSA (0,1 mg/ml) zugesetzt. Bei der Restriktion mit zwei Enzymen, die verschiedene Reaktionsbedingungen erfordern, wird zunächst das Enzym mit den Niedrigsalzbedingungen eingesetzt; nach Inaktivierung (15 min, 80° C) wird die Pufferbedingung für das zweite Enzym eingestellt. Alternativ kann man einen speziellen Puffer für eine Doppelrestriktion einsetzen. Für die Restriktion randständiger Schnittstellen wird das 2 - 3 fache der Enzymkonzentration verwendet. Die Dauer der Inkubation richtet sich nach Angaben des Herstellers und kann bis zu 20 h betragen. Die Reaktion wird durch Inaktivierung der Enzyme bei 80° C für 15 min gestoppt.

3.3.7 <u>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</u>

(nach Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985 und 1988) Material:

- Taq-DNA-Polymerase, 1 U/µl (PeqLab)
- 10× Reaktionspuffer Y für hohe Erträge (PeqLab): 200 mM Tris-HCl (pH 8,55) 160 mM (NH₄)₂SO₄ 20 mM MgCl₂
- 10× Reaktionspuffer S für hohe Spezifitäten (PeqLab): 100 mM Tris-HCl (pH 8,8)
 500 mM KCl
 15 mM MgCl
- Verdünnungspuffer für Taq-DNA-Polymerase (PeqLab): 20 mM Tris-HCl (pH 8.8) 100 mM KCl 0,2 mM EDTA 55 % Glycerin 0,5 % Tween 0,5 % Nonidet P40 250 µg/ml Gelatine
- dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, (Fermentas)
- PCR-Reaktionsgefäße, 200 μ l (M β P)
- H₂O (milli Q Grade)

Vorgehensweise:

Die Durchführung erfolgt entweder in einem Thermoblock mit schneller Heiz-Kühl-Funktion (PCR-Maschine mit einem Peltier-Effekt), oder in einem Robocycler mit 4 Blöcken. In diesem Fall hat jeder Block seine konstante Temperatur und der Arm der PCR-Maschine bewegt die PCR-Gefäße zwischen den Heiz- bzw. Kühlblöcken.

Die jeweiligen Reaktionsbedingungen (Puffer, Zyklen) sind von der verwendeten DNA-Polymerase, der Kombination von Oligonukleotiden und der zu amplifizierenden Sequenz abhängig. Ein 50 µl-Reaktionsmix wird wie in Tabele 3.1 aufgeführt angesetzt. In die PCR-Reaktionsmixe mit dem Reaktionsvolumen von 20µl, 25µl und 100µl werden die einzelnen Reagenzien mit Berücksichtigung der notwendigen Endkonzentration gegeben.

Reagenz	Quantität u.	Endkon-	Bemerkung	
0	Konzentration	zentration	6	
Template-DNA	X μl	-	Bei PCRs mit genomischer DNA (Amplifikation von "single copy"- Fragmenten) werden in der Regel 100 ng DNA eingesetzt. Bei Plasmiden oder "multi copy"- Fragmenten wird die DNA-Menge auf 1ng – 100 pg reduziert.	
Primer	1 μl (15 pmol/μl) von jedem Primer	0,3 μM je Primer	Je nach gewünschter Ausbeute kann die Primerkonzentration zwischen 10 pmol/µl und 30 pmol/µl variieren.	
10× Reaktionspuffer	5 µl	$1 \times$	Je nach Anwendung wird Reaktionspuffer S oder Y genommen	
dNTPs-Mix	1 μl (10 mM von jedem)	200 μM je Nucleotid	Zu hohe Konzentrationen hemmen die Reaktion.	
Polymerase	1U (1 U/μl)	0,02 U/µl	Wird zum Schluss pipetiert. Sie kann aber auch nach der initialen Denaturierung zugegeben werden ("hot start"). Taq-Polymerase von PeqLab muss vorher mit mitgeliefertem Verdünnungspuffer auf die Arbeitsverdünnung von 1 U/µl verdünnt werden.	
H ₂ O	auf 50 µl	-	verwendet wurde "Cross-linked" Wasser.	

Tabelle 3.1: Zusammensetzung eines typischen 50 µl PCR-Ansatzes

Bei der parallelen Durchführung von vielen Reaktionen wird ein Master-Mix (Wasser, 10× Puffer, dNTPs, Primer und Taq in einem Gefäss) angefertigt, der dann in einzelne 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße aliquotiert wird. Am Ende wird nur die Template-DNA zugegeben. Alle Pipettiervorgänge werden auf Eis durchgeführt.

Die PCR wird üblicherweise nach dem in Tabelle 3.2 wiedergegebenen Schema ausgeführt. Die Annealingtemperaturen und die Elongationszeiten können je nach Anwendung stark variieren.

Tabelle 3.2: Temperaturschema einer typischen PCR

Schritt	T [°C]	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	30 sek	
Annealing	45-65	30 sek	30 bis 35
Elongation	72	1-3 min	
finale Elongation	72	5 min	1
Kühlblock	4	œ	

Im Robocycler dagegen müssen die Zeiten entsprechend den Temperaturunterschieden zwischen den einzelnen Schritten verlängert werden, denn beim Wechsel des Heizblockes verändert sich die Temperatur im PCR-Gefäss mit der Geschwindigkeit von 1° C/sek.

Nach der PCR werden $8 - 12 \mu l$ von jedem Reaktionsansatz elektrophoretisch aufgetrennt, im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht begutachtet (Kapitel 3.3.4).

3.3.7.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Material:

- PCR-Produkt
- E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit (PeqLab)
- H₂O (milli Q Grade)

Vorgehensweise:

Die Aufreinigung der PCR-Produkte dient zur Entfernung von restlichen Primern, Nukleotiden, Salzen und Enzymen nach der PCR. Der PCR-Reaktionsansatz wird mit 4 bis 5 Volumina CP-Puffer durch Vortexen gemischt. Die Mischung wird auf die HiBind[®]-DNA-Säule geladen und 1 min bei 10.000 ×g zentrifugiert. Es folgen 2 Waschschritte mit 750 µl DNA-Waschpuffer (1 min, 10.000 ×g). Danach wird die Säule durch Zentrifugieren (1 min, 10.000 ×g) getrocknet. Die DNA wird mit 30 µl deionsiertem Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit Hilfe des Spektrophotometers (Kapitel 3.3.3).

3.3.7.2 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden mittels PCR

Material:

- PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche)
- Primer (Tabelle 3.5, s. 20)

Vorgehensweise:

Es werden nach den Richtlinien aus dem Kapitel 3.3.7 gleichzeitig zwei 100 μ l PCR-Ansätze vorbereitet. Der erste mit 10 × PCR DIG probe synthesis mix und der andere mit normalen dNTPs (dies dient zur qualitativen Kontrolle des DIG-dUTP Einbaus). In der PCR-Maschiene werden 30 Zyklen gefahren. Die Dig-markierten und normalen PCR-Produkte werden mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.3.4) überprüft. Üblicherweise ist das markierte Produkt bedingt durch den Digoxigenin-dUTP-Einbau etwas größer als das unmarkierte. Das DIG-PCR-Produkt wird mit Hilfe eines Cycle-Pure-Kits aufgereinigt (Kapitel 3.3.7.1) und die Konzentration der Sonde wird mittels Spektrophotometrie ermittelt (Kapitel 3.3.3).

3.3.7.3 PCR mit Bakterienkolonien

Material:

• LB-Medium mit Selektionsantibiotika (Kapitel 3.4.1)

- Zahnstocher aus Holz (autoklaviert)
- 96 Loch-Mikrotiterplatte (TPP-Tissue Culture Products)
- Primer, PCR-Puffer, Taq-Polymerase dNTPs-Mix (Kapitel 3.3.4)
- Mineralöl (Sigma)
- PCR-Reaktionsgefäße (M β P)

Vorgehensweise:

Diese Technik dient zur schnellen Ermittlung der Insertgrößen nach einer Klonierung und Transformierung der kompetenten Zellen. Von ausplattierten Bakterien werden 10 - 20 Kolonien mit sterilen Zahnstochern aufgenommen, in 100 µl LB-Medium (mit je nach Vektor selektiven Antibiotika) in eine 96 Loch-Mikrotiterplatte verbracht und bei 37° C 1 h unter Schütteln (160 rpm) inkubiert. Es wird ein Mastermix für 20 Reaktionen mit je 20 µl angesetzt [4 µl Vorwärtsprimer (15 µM), 4 µl Rückwärtsprimer (15 µM), 20 µl 10× Reaktionspuffer, 4 µl dNTPs-Mix 4 µl Taq-Polymerase (1 U/µl), 160 µl H₂O]. Von den 20 Kulturen wird nach einer Stunde je 1 µl Bakteriensuspension entnommen und als Template mit 19 µl Mastermix im PCR-Gefäss gemischt. Der Ansatz wird mit 20 µl Mineralöl überschichtet und nach dem in der Tabelle 3.3 abgebildeten Programm amplifiziert.

Tabelle 3.3: Temperaturschema einer typischen Kolonien-PCR

Temperatur, °C	Zeit	Zyklen
94	2 min	1
94	30 sec	
55	30 sec	30
72	X min	
72	5 min	1

Die Amplifikationszeit X hängt von der Größe des erwarteten Inserts und von der ungefähren Prozessivität der Taq (1 kb/min) ab. Bei Fragmenten <500 bp wird mit mindestens 30 sec gerechnet.

Von jedem Ansatz werden 10 μ l auf ein 1% iges Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht begutachtet (Kapitel 3.3.4).

3.3.8 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Proteinexpression und die DNA-Sequenzierungen wird das Klonieren der DNA-Fragmente in Vektoren benötigt.

3.3.8.1 Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Sequenzierung und Proteinexpression Plasmid-Vektoren verwendet. Die Expressionsvektoren (pQE) kann man am besten in *E. coli* XL-1 blue vermehren, denn dieser Stamm besitzt eine natürliche Mutation *laqI*^q. Das führt zu einer Überproduktion des Repressorproteins für ein *lac* – Operon und im Endeffekt zur Unterdrückung der basalen Proteinexpression und problemlosen Plasmidvermehrung.

In der multiplen Klonierungsstelle (MKS) werden die passenden Schnittstellen ausgesucht. Bei der Klonierung in die Expressionsvektoren muss man immer darauf achten, das der richtige Leserahmen nach der Ligation erhalten bleibt. Um das zu erleichtern, gibt es vor MKS bei pQE-31, -32 Vektoren zusätzliche ein oder zwei Basenpaare (Abbildung 3.1). Es wird die Restriktionsspaltung von 10 μ g Vektor-DNA mit zwei ausgewählten Enzymen angesetzt (Kapitel 3.3.6). Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA gestoppt, und die verdaute Plasmid-DNA wird mit Na-Acetat/Ethanol gefällt (Kapitel 3.3.3). Die DNA wird in 30 μ l autoklaviertem H₂O (milli Q) gelöst, mit 10× Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.3.4), um die kleinen DNA-Fragmente nach der Restriktionsspaltung zu entfernen.

pQE-30



Klonierungsstellen. Zwischen His-Tag (grün markiert) und der multiplen Klonierungsstelle (Rahmen) befinden sich je nach Vektor zusätzliche Basenpaare (rot markiert), um den gewünschten Leserahmen zu erzielen. Quelle: QIAexpressioniestTM, Qiagen, 2003

Die gewünschte Plasmid-DNA-Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten und die Plasmid-DNA wird daraus eluiert (Kapitel 3.3.5). Die Konzentration des Vektors wird mit Hilfe des Spektrophotometers bestimmt (Kapitel 3.3.3).

3.3.8.2 Vorbereitung des Zielfragmentes zur Ligation

Für das Klonieren von PCR-Fragmenten in Vektoren mit überstehenden Enden ("sticky ends") werden vor allem für die PCR die sog. Anker-Primer verwendet. Sie besitzen am 5'-Ende eine oder mehrere Restriktionsschnittstellen sowie eine flankierende Schutz-Sequenz meist drei Nukleotiden. Die Effizienz der Schneidbarkeit von terminaler Restriktionsschnittstellen kann aus einer Tabelle des New England Biolab-Kataloges entnommen werden. Nach der PCR (Kapitel 3.3.7), der Aufreinigung des PCR-Produktes (Kapitel 3.3.7.1), und der Spaltung mit gewünschten Restriktionsendonukleasen (Kapitel 3.3.6) wird das PCR-Produkt nochmals aufgereinigt (Kapitel 3.3.7.1), und die Konzentration der DNA wird im Spektrophotometer (Kapitel 3.3.3) bestimmt.

3.3.8.3 Ligation

Material:

- Vektor-DNA
- DNA-Fragment
- T4 DNA-Ligase (Invitrogen)
 5× Ligationspuffer (Invitrogen) bei -20° C aufbewahrt: 250 mM Tris·HCl (pH7,6)
 50 mM MgCl₂
 5 mM ATP
 5 mM Dithiothreitol
 25 % (w/v) Polyethylenglykol 8000
 0,5 M EDTA (Sigma)

Vorgehensweise:

Zur Ligation ("Blunt-End-Ligation", "Cohesive-End-Ligation") werden die Vektor- und die Fragment-DNA in einem molaren Verhältnis 1:3 vermischt. Der Ligationsansatz wird wie in der Tabelle 3.4 dargestellt angesetzt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung eines typischen 20 µl Ligationsansatzes.

Reagenz	Quantität u. Konzentration	Bemerkung
5× Ligationspuffer	4 µl	
Vektor-DNA	3-30 fmol	in der Regel werden 100 ng DNA eingesetzt
Fragment-DNA	9-90 fmol	
T4 DNA-Ligase	1 µl (1 U/µl)	
H_2O (milli Q)	ad 20 µl	

Die Ligation erfolgt 1 h bei RT. Bei der Blunt-End-Ligation, sowie bei der Cohesive-End-Ligation mit AT-reichen überstehenden Enden (z. B. *Eco R* I-Schnittstellen) den Ligationsansatz bei 12° C 16 - 24 Stunden zu inkubieren. Zum Stoppen der Reaktion wird 1 μ l 0,5 M EDTA dazugegeben. Der Ligationsansatz wird bei 4° C aufbewahrt, alternativ bei -20° C eingefroren.

3.3.8.4 Transformation von kompetenten E. coli

Material:

- *E. coli* (Stämme-K12-Derivate: XL 1 blue, M15, SG13009)
- Eiskalte CaCl₂-Lösung: 50 mM CaCl₂ (Roth) 10 mM Tris (MP-Biomedicals)
 S O C Madium (nH 7 autoklaujart, wird aingefra
- S.O.C.-Medium (pH 7, autoklaviert, wird eingefroren bei -20° C aufbewahrt): 1 % Tryptone (Invitrogen) 0,5 % Yeast Extract (Invitrogen) 10 mM NaCl (Roth) 2,5 mM KCl (Merck) 10 mM MgSO₄·7H₂O (Merck) 10 mM MgCl₂ (Merck) 20 mM Glukose (Merck)
- runde LB-Agar-Petrischallen mit entsprechenden Selektionsantibiotikum (Kapitel 3.5.1)

Vorgehensweise:

Für die Transformation werden 1 μ l und 5 μ l vom Ligationsansatz (Kapitel 3.3.8.3) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 μ l der Suspension mit kompetenten Zellen vorsichtig gemischt. Die Mischung wird 30 min auf Eis inkubiert (Adsorbtion). Anschliessend erfolgt ein Hitzeschock bei 42° C für 2 min (alternativ bei 37° C für 5 min) mit einer Abkühlung 2 min auf Eis. Der Hitzeschock wird einmal wiederholt. Zu jedem Ansatz werden 900 μ l bei 37° C vorgewärmtes S.O.C.-Medium dazugegeben und anschließend unter leichtem Schütteln (160-170 rpm) für 1 h bei 37° C inkubiert (Regeneration und Expression der Antibiotika-Resistenzgene). Auf die Antibiotika-LB-Agar-Petrischalen werden 100 μ l und restliche 900 μ l der Bakteriensuspension ausplatiert. Die Platten werden umgedreht bei 37° C über Nacht inkubiert.

Parallel dazu wird eine positive Kontrolle geführt, um die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen zu überprüfen. Die kompetenten Zellen werden mit 1 ng unverdautem Kontrollplasmid in 20 μ l TE-Puffer bei o. g. Bedingungen transformiert. Diese Transformationsmischung wird unverdünnt sowie 1:10 und 1:100 in vorgewärmtem SOC-Medium verdünnt ausplattiert. Die Transformationseffizienz liegt in der Regel bei 10⁶-10⁷ Kolonien/µg Plasmid-DNA.

Die Insert-Größen werden mit Hilfe der Kolonien-PCR überprüft (Kapitel 3.3.7.3). Die Kolonien, die das gewünschte Fragment enthalten, werden separat auf einer Agarplatte mit Selektionsantibiotika ausgestrichen.

3.3.9 <u>Primersynthese</u>

Alle Oligonukleotide wurden nach eigenen Vorgaben von MWG Biotech synthetisiert. Die Primer werden in 200 µl sterilem ddH₂O durch Vortexen gelöst (Primer-Stammlösung). Zur Konzentrationsbestimmung der Primer-Stammlösung wird eine 1:200 Verdünnung angefertigt (Kapitel 3.3.3). Aus dieser Primer-Stammlösung werden 15 pmol/µl oder 10 pmol/µl Arbeitslösungen in autoklaviertem H₂O (milli Q) hergestellt.

Name	Gen/Spezies	Orientierung	Sequenz $5' \rightarrow 3'$
Eb.3 exp S2	Kinase-Klon 3	sense	gcggatccGAGGAAATCCACAAAATG
Eb.3_exp_A	Kinase-Klon 3	anti	gaaagettTAAATGTTGCTGCTGATG
Eb.CDPK_exp6_S	EbCDPK	sense	catggatccTGAGGTGCTTCACGG
Eb.CDPK_exp5_S	EbCDPK	sense	caaggatccCAGAAATTAGCAGCAGCG
Eb.CDPK_exp5+6_A	EbCDPK	anti	ag <u>ctgcag</u> CTTTCGGATCACCGC
Eb.CaM2_seq_S	EbCDPK	sense	TCGAGAAAACGACTGGAAAG
Eb(Ca)CaM_seq_S	EbCDPK	sense	TACATGCATCGGAACAGGAT
Eb.CaM_exp_S	EbCDPK	sense	aaggatccAGCAGGCTCAAAGGTGGA
Eb.CaM_exp_A	EbCDPK	anti	ataaagcttTCCAGTGACGGTACATCA
Eb.ref.body_S	Refraktilkörperchen	sense	AAGTGACGTGGATCAAGG
Eb.ref.body_A	Refraktilkörperchen	anti	ACATCATTAGCAGCAAC
pQE_seq_for	pQE-Vektoren	sense	TTGCTTTGTGAGCGGATAAC
pQE-f	pQE-Vektoren	sense	GAATTCATTAAAGAGGAGAAA
pQE-r	pQE-Vektoren	anti	CATTACTGGATCTATCAACAGG
5'-SeqTriplEx2	pTrilEx2-Vektor	sense	TCCGAGATCTGGACGAGC
3'-SeqTriplEx3	pTrilEx2-Vektor	anti	TAATACGACTCACTATAGGG
SiTag-Primer	pSCREEN1-Vektor	sense	CGAACGCCAGCACATGGACA
SP6-Promoter_1-	pSCREEN1-Vektor	anti	GCATTTAGGTGACACTATAGA
Primer			
Eb18S.s1	Eimeria bovis 18S	sense	CCCATGCATGTCTAAGTATAAGC
	rDNA		
Eb18S.a1	Eimeria bovis 18S	anti	CCATGTCTGGACCTGGTGAGT
	rDNA		
M 13 F	Vektoren	sense	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M 13 R	Vektoren	anti	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA
SMART-5'PCR	SMART-Linker	sense	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
SMART-3'PCR	SMART-Linker	anti	TAGAGGCCGAGGCGGCCGAC

Tabelle 3.5: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primer

3.3.10 <u>Sequenzieren von Nukleinsäuren</u>

Alle Sequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit wurden von SEQLAB (Sequence Laboratories GmbH, Göttingen) durchgeführt. Für die Sequenzierung werden die Plasmid-DNA (Kapitel 3.4.3 u. 3.4.4) bzw. die aufgereinigten PCR-Produkte (Kapitel 3.3.7.1) eingesetzt. Die notwendige Menge an DNA (Plasmid-DNA: 0,6 μ g; PCR-Produkte: ~1000 bp: 200 ng, ~500 bp: 100 ng, ~200 bp: 40 ng) wird mit 20 pmol eines geeigneten Primers

(18 bis 22 bp, T_m = 54 – 62° C) in einem PCR-Gefäss gemischt und versendet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mit Hilfe eines Chromas-Programms.

3.3.11 Southern Blot und Hybridisierung von Nukleinsäuren

3.3.11.1 Nukleinsäurentransfer auf Membranen (Vakuumtransfer)

Material:

- Ethidiumbromidlösung (Kapitel 3.3.2)
- Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH (Roth) 1,5 M NaCl (Roth)
- Depurinierungslösung: 0,25 M HCl: 1 Teil 36 % HCl (Riedel-de Haën) + 45,4 Teile ddH₂O
- Biodyne[®] A oder B Membrane (Pall GmbH Filtrationstechnik)
- Whatmann-Papier (dünn)
- Gummi-Maske mit einem Fenster in Gelform, aber 0,5 cm allseits kleiner
- 20× SSC (Kapitel 3.4.2.2)
- 1% Agarose in 1× TAE-Puffer (Kapitel 3.3.4)
- Geräte fürden Transfer: Vakuumkammer TE80 Transvac (HOEFER) Vakuumpumpe PV100 Red-Evac (HOEFER)
- Chemilumineszenz-Substrat: CDP-StarTM Chemiluminescent Substrat (New England Biolabs): 1:250 Verdünnung von CDP-StarTM in 1× Assay-Puffer (0,025-0,1 ml/cm² Membran)
- Plastikfolie: Polystar PE-Schlauchfolie (Rische & Herfurth)
- Frischhaltefolie
- BioMax Light 1- Röntgenfilme, BioMax Light-1 (Kodak)

Vorgehensweise:

Ein Agarose-Gel mit der elektrophoretisch-aufgetrennten DNA (Kapitel 3.3.4) wird 15 min im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht zusammen mit einem Lineal neben dem Gel photographiert, um später die Position der Banden auf der Membran lokalisieren zu können. Vor dem Transfer wird das Agarose-Gel 2×10 min in Depurinierungs- und 2×15 min in Denaturierungslösung bei RT in einer Glaswanne geschwenkt. Auf die Vakuumkammer wird ein in 20×SSC getränktes Whatmann-Papier gelegt, darauf eine Nylon-Membran (vorher in H₂O und 2× SSC getaucht), dann die Gummi-Maske und zum Schluss das Gel, wobei das Gel 0,5 cm allseits der Maske aufliegen sollte. Die Gelränder und Probentaschen werden mit 1% Agarose abgedichtet. Nachdem die Klammern an die Vakuumkammer angebracht worden sind, wird ein Unterdruck von 0,6 Bar mit Vakuumpumpe angelegt. Die Pufferkammer wird anschließend mit 20×SSC bis über das Gel gefüllt, und wenn alles abgedichtet ist, kommt die 20×SSC-Lösung nur tröpfchenweise in die Vakuumkammer. Nach einer Transferzeit von 1 h werden die Auftragstaschen auf der Membran mit Bleistift gekennzeichnet und beschriftet. Das Gel wird zur Kontrolle des Transfers erneut im Ethidiumbromidbad gefärbt. Membran wird in 2×SSC gewaschen und zur Fixierung der DNA zwischen zwei dicken Whatmann-Papieren in Alufolie 1 h bei 80° C gebacken.

3.3.11.2 Hybridisierung von Nukleinsäuren.

Material:

- 20×SSC (pH 7,0 mit 1 M HCl eingestellt, Puffer wird autoklaviert und bei RT aufbewahrt):
 3 M NaCl (Roth)
 2 M Na Citent (Signa)
 - 0,3 M Na₃Citrat (Sigma)
- Heringsperm-DNA: 10 mg/ml (hitzedenaturiert, bei -20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt).
- 100× Denhardts: 2× SSC,
 2% (w/v) BSA Albumin Fraktion V (Roth)
 2% (w/v) Ficoll Typ 400 (Sigma)
 2% (w/v) Polyvinylpyrolidon (Serva)
 - Hybridisierungslösung:
- 5× SSC, 50 mM Na-Phosphat pH 6,5, 0,1 % SDS,
 - $5 \times \text{Denhardts},$

200 µg/ml denaturierte gescherte Heringsperm-DNA

- DIG (Digoxigenin-markierte)-DNA-Sonden (Kapitel 3.3.7.2)
- Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (Roche): es wird zum Nachweiss von Digoxigenin eine 1:10000 Verdünnung der Antikörper in Blockierungspuffer verwendet
- Waschpuffer I: 2× SSC 0,1 % SDS • Waschpuffer II: 0,2× SSC 0,1 % SDS
- Maleinsäure-Puffer, pH 7,5 wird mit NaOH eingestellt, Puffer wird autoklaviert und bei RT aufbewahrt:

100 mM Maleinsäure (Sigma) 150 mM NaCl

- 10 % Kaseinstocklösung, Blocking-Reagenz aus dem Kit: ,Dig DNA Labeling and Detection Kit' (Boehringer Mannheim) in Maleinsäure-Puffer wird bei –20° C aufbewahrt.
- Blockirungspuffer: 1 % ige Kaseinlösung (10°% ige Kaseinstocklösung wird mit Maleinsäurepuffer 1:10 verdünnt)
- Waschlösung: Maleinsäure-Puffer
 0.3 % Tween-20 (Ald
 - 0,3 % Tween-20 (Aldrich)
- Cronex MF-E-Fixierer, 2 l Arbeitslösung werden wie folgt angesetzt: zu 1 l Leitungswasser werden unter Rühren zuerst 500 ml Lösung A und dann 100 ml Lösung B, zum Schluss werden noch 400 ml Wasser dazugegeben.
- Cronex MD-Entwickler, 21 Arbeitslösung werden wie folgt angesetzt: zu 11 Leitungswasser werden unter Rühren 500 ml Lösung A, 50 ml Lösung B und dann 100 ml Lösung C dazugegeben, danach wird das ganze mit 350 ml Wasser auf 21 gebracht.
- Röntgenfilme BioMax Light 1 (Sigma)
- CDP Star Substrat (25 mM), (New England BioLabs)
- CDP Star Assay Puffer (25×) (New England BioLabs)
- Detektionspuffer (pH 9,5 autoklaviert und bei RT aufbewahrt) vor dem Gebrauch wird 1M MgCl₂ bis zu einer Konzentration von 1 mM dazugegeben.
 0,1 M Tris-Puffer
 - 0,1 M NaCl
- Frischhaltefolie

Vorgehensweise:

Die Hybridisierung Digoxigenin-markierter DNA an membrangebundener Nukleinsäure wird in einem Hybridisierungsofen (Biometra) durchgeführt. Der Vorteil des Hybridisierungsofens liegt neben der leichten Handhabbarkeit darin, dass sehr wenig (3-5 ml) Hybridisierungslösung benötigt wird und damit eine hohe spezifische Aktivität der markierten Probe erreicht werden kann.

Die Membranen mit der darauf fixierten DNA werden kurz in $2 \times SSC$ angefeuchtet und zur Absättigung freier Bindungsstellen (Vorhybridisierung) 30 min bei 50° C in 40 ml Hybridisierungslösung pro Hybridisierungsröhre inkubiert. Die Hybridisierung erfolgt dann in 5 ml frischer Hybridisierunglösung mit der hitzedenaturierten DIG-DNA-Sonde (Die Lösung wird hier 5 min im Wasserbad gekocht, danach sofort im flüssigen Stickstoff für 5 min eingefroren und anschließend langsam auf Eis aufgetaut; die Konzentration beträgt 10 – 15 ng DIG-markierter DNA pro ml Hybridisierundslösung) über Nacht bei 60° C. Danach wird die unspezifisch gebundene DNA-Probe durch mehrere Waschschritte entfernt:

2×15 min im Waschpuffer I bei RT in einer Plastikschale unter leichtem Schwenken;

1×15 min mit 42° C vorgewärmtem Waschpuffer II;

2×10 min mit auf 60° C vorgewärmtem Waschpuffer II im 60° C Schüttel-Wasserbad, je nach gewünschter Stringenz auch bei höheren Temperaturen.

Wenn eine Kreuzhybridisierung erforderlich ist, werden die Hybridisierung bei 45° C über Nacht und der 3. Waschschritt bei 50° C mit 0,4× SSC (niedrigere Stringenz) durchgeführt. Anschließend werden die Membranen kurz in Maleinsäure-Puffer äquilibriert, dann 30 – 60 min im Blockierungspuffer inkubiert und anschließend in der Anti-DIG-Antiköperverdünnung im Blockierungspuffer weitere 30 – 60 min inkubiert. Ungebundenes Antikörper-Konjugat wird durch 2× 10 min Waschen in Waschlösung entfernt.

Zur Visualisierung werden die Membranen im Detektionspuffer kurz gewaschen. Der Assay-Puffer wird mit H₂O milli-Q bis ein Mal verdünnt (man verwendet 0,025 - 0,1 ml/cm² der Membran). Anschließend wird eine Arbeitsverdünnung des Substrats von 1:200 mit 1× Assay-Puffer erstellt. Die Membran wird in Plastikfolie mit der entsprechenden Menge der Arbeitsverdünnung des Chemiluminiszenz-Substrats luftblasenfrei eingeschweißt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Danach werden der Plastikbeutel angeschnitten die Membran herausgenommen, überschüssiges Substrat

abgetropft und die Membran zwischen zwei Blättern Frischhaltefolie luftblasenfrei gelegt. In der Dunkelkammer bei rotem Licht werden die Röntgenfilme auf die Membranen aufgelegt. Die Exponierungszeiten dauern üblicherweise zwischen 1 - 30 min. Danach werden die Filme bis zur gewünschten Farbintensität entwickelt, fixiert und getrocknet.

3.4 Bakterien (E. coli)

Stamm	Genotyp	Stockplate
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1,	I P. Totrozuldin 15ug/ml
(Stratagene)	<i>lac</i> , [F' <i>lacI</i> ^q Z ΔM 15, <i>pro</i> AB, Tn10(Tet ^r)]	LB-Tetrazykini 13µg/ini
M15[pREP4]	Nal ^s , Str ^s , Rif ^s , Lac ⁻ , Ara ⁻ , Gal ⁻ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ ,	I D Kanamuain 25 ug/ml
(Qiagen)	Lon^+	LB-Kallalliyelli 23 µg/lill
ER 1647	F^{-} fhuA2 $\Delta(lacZ)$ r1 supE44 recD1014 trp31 mcrA1272::	
(Novagen)	Tn10(Tc ^R) his-1 rpsL104 (strR) xyl7 mtl2 metB1 Δ (mcrC-	LB-Tetrazyklin 15 µg/ml
	mrr)102:: Tn10(Tc ^R) hsdS (r_{k12} - m_{k12} -)	
SG13009 [pREP4]	Nal ^s , Str ^s , Rif ^s , Lac ⁻ , Ara ⁻ , Gal ⁻ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ ,	I D Kanamuain 25 ug/ml
(Qiagen)	Lon^+	LB-Kananiyeni 23 µg/mi
BM 25.8	supE44, thi Δ (<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD</i> 36, <i>proAB</i> ⁺ , <i>lac</i> I ^q Z	LB-Kanamycin 50µg/ml,
(Novagen)	Δ M15] λ imm434 (kan ^R)P1 (cam ^R) hsdR (r _{k12} - m _{k12} -)	Chloramphenikol 34 µg/ml
BL21(DE3)pLysE	E = ampT hadS (r = m) and dom (DE2) mI va E (CmR)	LB-Chloramphenikol 34
(Novagen)	$\Gamma = OmpT nsas_B (I_B = III_B =) gal acm (DE3) pLys E (Cm)$	µg/ml

3.4.1 <u>Anzucht und Aufbewahrung</u>

Material:

- Luria Broth Base Medium, LB (Invitrogen):
 - 25 g Mediumpulver auf 1 l H_2O . Das LB-Medium wird autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt
- LB-Agar-Nährplatten:
- 1 1 LB + 15 g Agar werden autoklaviert und in 94/16 mm Platten (ca. 20 25 ml pro Platte) gegossen.
- Glycerol Ultra Pure (MP Biomedicals)

Vorgehensweise:

Die Bakterien-Stämme werden in Glycerinkulturen bei -80° C aufbewahrt, und, ausgehend von einer Einzelkolonie bzw. einem Abstrich aus einer Glycerinkultur, in LB-Medium (bei Zusatz entsprechender Antibiotika wird eine Selektion erreicht) bei 37° C angezogen. Die Aufbewahrung erfolgt als Ausstrich auf (Antibiotika)-LB-Agarplatten (1 – 2 Monate) und in einer 15 % igen Glycerinkultur bei -80° C (mehrere Jahre).

3.4.2 <u>Herstellung kompetenter Zellen (CaCl₂-Methode)</u>

Material:

- E. coli Stamm XL1
- LB-Medium (Kapitel 3.4.1)
- CaCl₂-Puffer, (autoklaviert und bei –4° C aufbewahrt): 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 100 mM CaCl₂.

Vorgehensweise:

Eine Einzellkolonie oder eine Stecknadelspitzen-große Menge der Glycerinkultur wird in 10 ml LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika verbracht und über Nacht bei 37° C und Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag werden 10 ml der Übernachtkultur zu 40 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) in ein 250 ml Gefäß pipettiert und 2-3 h unter gleichen Bedingungen inkubiert, bis eine optische Dichte 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm ($OD_{600} = 0,5$) erreicht wird. Die Bakterienkultur wird dann für 10 min auf Eis gestellt und anschließend mit 3000 ×g, 5 min bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und das Bakterienpellet vorsichtig in 30 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert und auf Eis bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die kompetenten Zellen vor der Transformation nochmal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und in 3 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden bis zur Transformation auf Eis gehalten.

3.4.3 <u>Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation) durch alkalische Lyse</u>

Material:

- LB-Medium + Selektionsantibiotika (Kapitel 3.4.2)
- Lösung I pH 8,0: 25 mM Tris-HCl (MP Biomedcals) 10 mM EDTA (Sigma) 50 mM Glucose (Merck)
- Lösung II: 0,2 M NaOH 1% SDS (Serva)
- Lösung III: 3 M Kalium-Acetat pH 4,8 (mit Eisessig eingestellt)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt)
- Rnase A (Sigma)
- Handelsübliche Zahnstocher, autoklaviert

Vorgehensweise:

Die Einzelkolonien werden von einer Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, in 10 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum verbracht und über Nacht

unter Schütteln (200 rpm) bei 37° C inkubiert. Von der Übernachtkultur werden dann 2 ml oder 5 ml (je nach Kopienanzahl der zu isolierenden Plasmide) abgenommen, 5 min bei 3000 ×g zentrifugiert. Zum Bakteriensediment werden 100 μ l Lösung I hinzugegeben und die Bakterien werden durch "Ratschen" über ein Metallgitter resuspendiert. Die Bakterien werden durch Zugabe von 200 μ l Lösung II und vorsichtiges Mischen lysiert. Sofort nachdem die Bakteriensuspension klar geworden ist, werden 150 μ l der Lösung III hinzugegeben, kräftig gemischt und das ausgefallene Netzwerk aus Bakterien-DNA und Protein/SDS-Komplex für 20 min bei 20.000 ×g sedimentiert. Der Überstand wird in ein Reaktionsgefäß dekantiert. Es erfolgt das Fällen der Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol (20 min mit 20.000 ×g). Das DNA-Sediment wird zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 μ l TE-Puffer mit Rnase A (40 μ g/ml) gelöst. Die Konzentration der Plasmid-DNA wird spektrophotometrisch bestimmt (Kapitel 3.3.3).

3.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen

Material:

- LB-Medium + Selektionsantibiotikum: (Kapitel 3.4.2)
- QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (Qiagen)

Vorgehensweise:

Von ausgewählten Klonen werden Übernachtkulturen in 10 ml LB-Medim mit Selektionsantibiotika angelegt. Die Bakterien aus 2 ml einer Übernachtkultur werden 1 min bei 20.000 ×g, sedimentiert und die Plasmid-DNA wird mittels des QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kits gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte DNA von jedem Klon wird von der DNA-Bindungsmatrix der Mini-Säulen in 50 μ l autoklaviertes H₂O (milli Q) eluiert. Die Konzentration spektrophotometrisch ermittelt (Kapitel 3.3.3).

3.4.5 <u>Herstellung von Plating-Bakterien für die Amplifikation von Phagen</u>

Material:

- E. coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene, Heidelberg), ER 1647 (Novagen)
- MgSO₄-LB-Medium: LB-Medium (Kapitel 3.4.1) 10 mM MgSO₄
 0,2 % Maltose (erhöht die Anzahl der *lam*B-Rezeptoren)
- 10 mM MgSO₄, (autoklaviert und bei 4° C aufbewahrt)
- 20 % Maltose (Sigma), steril filtriert

Vorgehensweise:

10 ml MgSO₄-LB-Medium werden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Von dieser Übernachtkultur wird 1 ml entnommen und zu 30 ml MgSO₄-LB-Medium mit 0,5 ml 20 % iger Maltose (Endkonzentration 0,2%,) gegeben und unter Schütteln bei 37° C so lange inkubiert, bis eine $OD_{600} = 1,0$ erreicht ist. Nach einer Zentrifugation bei 3000 ×g, 5 min wird das Bakteriensediment in 12 ml (0,4 Volumen) 10 mM MgSO₄ vorsichtig resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wird bei 4° C aufbewahrt und kann 1 Woche lang verwendet werden.

3.4.6 Cre *loxP*-vermitteltes Ausschneiden von Plasmiden aus der Phagen-DNA

Material:

- *E.coli* Stamm BM 25.8 (Novagen)
- runde LB-Agar-Nährplatten mit Selektionsantibiotikum (Penicillin oder Carbenicillin, alternativ auch andere Selektionsantibiotika je nach Resistenzgen)
- 1 M MgCl₂
- LB-Medium (Kapitel 3.4.1)

Vorgehensweise:

Eine Einzelkolonie von der Kanamycin-LB-Agarplatte wird in 10 ml LB-Medium verbracht und bei 31° C unter Schütteln (150 rpm) inkubiert, bis die Keimdichte eine $OD_{600}=1, 1-1, 4$ erreicht. Zu der Kultur werden 10 µl der 1M MgCl₂-Lösung hinzugefügt (die Endkonzentration soll 10 mM betragen). In einem 15 ml Glasröhrchen werden 200 µl Kultur mit 20 µl Phagenlysat (Kapitel 3.5.1) vermischt und bei 31° C 15 min inkubiert. Anschließend werden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und eine weitere Stunde bei 31 C und Schütteln (150 rpm) inkubiert. Danach werden 50 µl und 200 µl auf die LB-Agar-Nährplatte mit Penicillin (100 µg/ml) oder Carbenicillin (50 µg/ml) ausplatiert und bei 37° C über Nacht inkubiert. Die Einzelkolonien können direkt in einer PCR (Kapitel 3.3.7.3) auf die Insertgrößen analysiert werden. Die Plasmide, die direkt aus BM 25.8 isoliert werden, können nicht sequenziert werden. Aus diesem Grund wird der *E. coli*-Stamm XL-1 blue mit diesen Plamiden zusätzlich transformiert und für die Sequenzierung (Kapitel 3.3.9) verwendet.

3.5 Bakteriophagen

3.5.1 <u>Titerbestimmung, Amplifikation und Aufbewahrung</u>

Material:

- Runde und quadratische Petrischalen (94/16 und 120/120/17 mm, Greiner Bio-One) mit MgSO₄-LB-Agar-Nährboden (Medium wird autoklaviert und flüssig in die Platten ausgegossen, der Nährboden wird 1h unter einem Laminar Flow getrocknet):
 11LB
 10 mM MgSO₄·7H₂O (Merck)
 1,5 % Selekt Agar (Invitrogen)
- 10× λ-Verdünnungspuffer pH 7,5 (wird autoklaviert und bei 4° C aufbewahrt):
 1 M NaCl (Roth)
 0,1 M MgSO₄·7H₂O (Merck)
 0,35 M Tris-HCl (MP Biomedicals)
- $1 \times \lambda$ -Verdünnungpuffer. Dazu wird $10 \times$ Puffer 1:10 mit H₂O verdünnt, die Gelatine (Serva) von einer 2 % igen Stocklösung in einer Konzentration von 0,01% dazugegeben. Der $1 \times \lambda$ -Verdünnungspuffer wird autoklaviert und bei 4° C aufbewahrt.
- Chloroform (Roth)
- Di-Methyl Sulfoxid, DMSO (Roth)
- LB-Top-Agarose (autoklaviert und bei RT aufbewahrt): LB-Medium (Kapitel 3.4.1)
 0,6-0,7 % Agarose Elektrophoresis Grade (MP Biomedicals)
 10 mM MgSO₄·7H₂O (Merck)
- Plating-Bakterien (Kapitel 3.4.5)

Vorgehensweise:

<u>Titerbestimmung.</u> Zur Bestimmung des Titers einer Phagenlösung werden Aliquots einer 10fachen Verdünnungsreihe in dem $1 \times \lambda$ -Verdünnungspuffer mit 100 µl Plating-Bakterien (Kapitel 3.4.5) gemischt (200 µl bei quadratischen Platten), nach 15 min Adsorption bei 37° C (Wasserbad, ohne Schütteln) mit 3 ml (8 ml bei quadratischen Platten) Top-Agarose (48° C, wurde mit abgeflammten Pipetten mit breiter Öffnung pipettiert) gemischt, auf eine trockene, bei 37° C vorgewärmte LB-Agar-Nährplatte ausgegossen und gleichmässig verteilt. Nach 5 min ist die Top-Agarose fest, und die Platte wird umgedreht bei 37° C (λ TriplEx2: 6-10 h) inkubiert. Ein Phagenpartikel kann durch Infektion und Lyse der ihn umgebenden Bakterien $10^5 - 10^7$ Phagen produzieren, dabei entsteht in einem Bakterienrasen ein klarer Plaque. Der Phagentiter wird in pfu/ml (plaque forming unit) angegeben und wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$pfu/ml = \frac{Anzahl der Plaques \times Verdünnungsfaktor \times 10^{3}}{\mu l Aliquot der 10 \times Verdünnungsreihe}$$

<u>Amplifikation einer cDNA-Bank.</u> Um eine ausreichend große Anzahl an Klonen in der cDNA-Bibliothek zu erlangen wird die cDNA-Bank amplifiziert. Dazu werden etwa 5 – 7×10^4 Phagenklone auf einer quadratischen Platte ausplattiert. Für λ TtiplEx2- und

 λ SCREEN-1-Phagen wird generell die o.g. Zahl empfohlen (Angaben von Clontech und Novagen). Nach der Inkubation bei 37° C für 6-18 h oder nachdem die Plaques konfluent geworden sind, werden 10 ml vom 1× λ -Verdünnungspuffer dazugegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert; danach wird zusätzlich 1 h bei RT auf einem Orbitalschüttler geschüttelt, um die Phagenpartikel aus den Plaques zu eluieren. Die Phagenlösung wird nach der Sedimentation der Bakterien- und Agarosereste (10 min, 5000 ×g) mit 0,3 % Chloroform versetzt. Die Aufbewahrung erfolgt in 50 ml-Schraubdeckelröhrchen bei 4° C. Bei dieser Methode fällt der Titer pro Jahr etwa um den Faktor 10. Für die langfristige Aufbewahrung wird die Phagenlösung nach Zugabe von DMSO (10 % Endkonzentration) bei –80° C eingefroren.

3.6 Merozoiten I cDNA-Banken

3.6.1 <u>Herstellung einer SMART™ cDNA-Bank</u>

SMART-Technologie (<u>S</u>witching <u>M</u>echanism <u>At</u> 5' End of <u>RNA</u> <u>T</u>ranskript) ist eine Methode zur Produktion der vollständigen cDNA (theoretisch jeder zweite Klon enthält eine vollständige cDNA), aus sowohl der gesamten RNA als auch der poly-A⁺ RNA. In diesem System hybridisiert ein dT-Primer am polyA-Schwanz einer mRNA und mit Hilfe einer reversen Transkriptase wird die Kopie des mRNA-Moleküls hergestellt. Nach der Klonierung der cDNA in den λ TripleEx2TM-Phagenvektor bieten sich zum Screen weitere Möglichkeiten, wie Blau/Weiß-Selektierung der rekombinanten Kolonien, Expression in allen 3 Leserahmen und Cre-*lox*-vermittelte Subklonierung der Phagen-DNA in die Plasmid-DNA. Für die Herstellung der SMARTTM cDNA-Bank wurde ein Kit von Clontech verwendet.

Material:

- Merozoiten-spezifische poly A⁺ RNA
- 10 μM SMART IV[™] Oligonukleotid (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCG-GG-3')
- 10 μM CDS III/3''PCR Primer (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)₃₀N₋₁N-3)
- 10 µM 5' PCR Primer (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3')
- PowerScriptTM Reverse Transcriptase
- 5× First-Strand Buffer: 250 mM Tris (pH 8,3) 30 mM MgCl₂ 375 mM KCl
- 20 mM Dithiothreitol (DTT)
- 20 µg/µl Proteinase K
- *Sfi* I Restriktionsverdau
 - 20 U/µl Sfi I Enzym (60 µl)

 $\begin{array}{l} 10 \times \textit{Sfi I} - Puffer~(150~\mu l) \\ 100 \times BSA \end{array}$

- Advantage 2 PCR Kit
 50× Adwantage 2 Polymerase Mix
 10× Adwantage 2 PCR Puffer
 50× dNTPs Mix (10 mM von jedem Nukleotid)
 PCR-Grade Water
- Ligation mit Vektor λ TriplEx2 (Sfi I A und B Phagen-DNA-Arme) T 4 DNA-Ligase 10× DNA-Ligationspuffer ATP

Vorgehensweise:

<u>Erststrangsynthese.</u> Für die Erststrangsynthese wird die aus Merozoiten I isolierte poly $(A)^+$ RNA verwendet. Zu diesem Zweck werden zuerst in einem PCR-Reaktionsgefäß 3 µl der poly A⁺ RNA mit jeweils 1 µl SMART IV Oligonukleotid und 1 µl CDS III/3''PCR Primer vermischt und 2 min. bei 72° C inkubiert (die Sekundärstrukturen werden dabei denaturiert). Der Ansatz wird 2 min auf Eis abgekühlt. In Tabelle 3.7 ist der Ansatz für die Erststrangsynthese aufgeführt.

Tabelle 3.7: Reaktionsansatz zur Erststrangsynthese einer SMART-cDNA

Reagenz	Quantität
poly(A) ⁺ RNA, SMART IV Oligonukleotid, CDS	5µl
III/3''PCR Primer	
5× Erststrang-Puffer	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
PowerScript reverse Transkriptase	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Der Ansatz wird gemischt und bei 42° C 1 h inkubiert.

<u>Amplifikation durch PCR</u>: Als nächstes wird die neu syntetisierte cDNA per PCR amplifiziert. Die Reaktionkomponenten sind in der Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.8: ReaktionsAnsatz zur Amplifizierung der cDNA durch PCR

Reagenz	Quantität
Erststrang cDNA	2 μl
milliQ-H ₂ O	80 µl
10× Advantage 2 PCR-Puffer	10 µl
50× dNTPs Mix	2 µl
5' PCR Primer	2 µl
CDS III/3' PCR Primer	2 µl
50× Advantage 2 Polymerase Mix	2 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Abhängig von der Menge der poly $(A)^+$ RNA werden die cDNAs mit einer unterschiedlichen Anzahl von Zyklen amplifiziert. Für 125 – 500 ng poly A⁺ RNA reichen in der Regel 20 – 24 Zyklen. In der Tabelle 3.9 ist die Temperaturschema in dieser Arbeit verwendeten PCR dargestellt.

Tabelle 3.9:	Temperaturschema	der PCR zur Am	plifizierung der	SMART-cDNA
I as one er,	i emperavar senema	act i cit bai i ini	philliphi ang act	

Schritt	T° C	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	95	1 min	1
Denaturierung	95	15 sek	20
Annealing und Elongation	68	6 min	20

Nach und optional während der Amplifikation (etwa nach 15 oder 20 Zyklen) werden 5 μ l der amplifizierten cDNA auf einem Gel analysiert (Kapitel 3.3.4). Im Gel erscheint die cDNA als Schmier, der sich von 4 kb bis 0,1 kb zieht. 50 μ l der amplifizierten cDNA werden dann mit 2 μ l Proteinase K 20 min bei 45° C behandelt, um die DNA-Polymerase zu inaktivieren. Der Ansatz wird auf 100 μ l mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Es folgt die Chloroform : Isoamylalkohol Extraktion und die Präzipitation mit 3 M Natriumacetat. Das cDNA-Pellet wird in 79 μ l deionisiertem Wasser aufgenommen.

<u>Restriktionsspaltung der Linker:</u> Die das cDNA-Molekül flankierenden Linker (in den bei der Erstrangsynthese verwendeten Primern eingebaut) werden mit *Sfi* I - Resktriktionsenzym gespalten (Restriktionsansatz s. Tabelle 3.10), um die cDNA in die Phagenarme-DNA klonieren zu können.

Tabelle 3.10: Restriktionsansatz zur Spaltung der cDNA-flankierenden Linker

Reagenz	Quantität
cDNA	79 μl
$10 \times Sfi$ I Puffer	10 µl
<i>Sfi</i> I Enzym	10 µl
$100 \times BSA$	1 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Der Reaktionsansatz wird bei 50° C 2 h inkubiert.

<u>Größenfraktionierung</u>: Mit Hilfe der Gelelektrophorese werden kleine DNA-Fragmente entfernt. Dafür wird der Restriktionsspaltungsansatz mit 10 µl Ladepuffer gemischt und in einem präparativen Gel aufgetrennt. Nach der Ethidiumbromidfärbung und Visualisierung im UV-Licht wird aus dem Agarosegel das Stück ausgeschnitten, das die cDNAs in der Größe ab 400 bp enthält (Kapitel 3.3.4). Damit entfernt man sowohl abgeschnittene Linker, als auch die kleinen cDNAs, die bei der Klonierung stören. Die cDNA wird aus der Agarose mit Hilfe von Glasmilch isoliert (Kapitel 3.3.5), mit Natriumacetat präzipitiert (Kapitel 3.3.3) und in 6 μ l H₂O wieder aufgelöst.

Ligation in den λ TripleEx 2-Vektor und Verpackung in die Phagen.

Ligation wird wie in der Tabelle 3.11 ausgeführt, angesetzt.

Tabelle 3.11: Reaktionsansatz zur Ligation von cDNAs in die Phagenarme.

Reagenz	Quantität
cDNA	2,5 µl
λ Phagen-Arme (ng/µl)	1 µl
ATP (10 mM)	0,5 µl
Ligationspuffer	0,5 µl
T4 Ligase	0,5 µl
Gesamtvolumen	5 µl

Die Reaktion erfolgt über Nacht bei 16° C. Die ganze Ligation wird zu dem Phagenverpackungsextrakt (packaging extract) gegeben und bei 22° C 2 Stunden inkubiert. Danach werden 500 μ l des λ -Verdünnungspuffers und 20 μ l Chloroform hinzugefügt. Danach wird der Titer der primären unamplifizierten cDNA-Bank geprüft (Kapitel 3.5.1). Die primäre cDNA-Bank mit dem Phagentiter >10⁶ pfu kann amplifiziert werden (Kapitel 3.5.1).

3.6.2 <u>Herstellung einer OrientExpress™-cDNA-Bank (OrientExpress™-cDNA</u> Synthese- und Klonierungs-Kit, Novagen)

Für die Hestellung dieser cDNA-Bank wird die Strategie des Random-Primer-Systems ausgenutzt. Hier hybridisieren die Hexameren, kurze Oligonukleotide aus 6 Basen bestehend, entlang der mRNA. Anschließend wird in einer Primerverlängerungsreaktion eine Kopie der mRNA hergestellt. Die cDNAs werden dann entsprechend ihren 5'- und 3'-Enden in der mRNA gerichtet kloniert.

Material:

cDNA-Synthese

- Hind III Random-Primers (NNNNNNTT)
- MMLV Reverse Transkriptase
- 5× Erststrang-Puffer
- DNA-Polymerase I
- RNase H
- 5× Zweitstrang-Puffer

cDNA-Enden-Modifikation

- T4 DNA Polymerase
- 10× Flush-Puffer
- EcoRI/HindIII-Linker
- $10 \times Hind$ III Puffer
- 1 mM dNTPs-Mix (1:10 Verdünnung vom 10 mM dNTPs-Mix)

 10× methylierter dNTPs-Mix 100 mM DTT 10 mg/ml Glycogen 4 M Amonium Acetat 	 10× EcoR I Ausgleich-Puffer EcoR I T4 Polynukleotid-Kinase 			
Ligation • T4 DNA-Ligase • Ligase Verdünnungspuffer • 10× Ligationspuffer • 10 mM ATP	 cDNA-Größenfraktionisierung und Verpackung Minisäule-Filtration-Kit EcoR I/Hind III verda dephosphorylierte λSCREEN Phagenarme PhageMaker Extrakt 			

Vorgehensweise:

Erststrangsynthese. Für die Erststrangsynthese nach gegebener Methode benötigt man reine poly $(A)^+$ RNA. Es werden 4 µg der poly A^+ RNA mit 1 µg *Hind* III Random-Primern vermischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen gebracht. Der Ansatz wird 10 min bei 70° C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der mRNA zu zerstören. Der Ansatz wird auf Eis abgekühlt und die Reaktion wird wie in der Tabelle 3.12 dargestellt, angesetzt.

Tabelle 3.12: Reaktionsansatz zur Erststrangsynthese der OrientExpress-cDNA

Pagganz	Quantität
Keagenz	Qualititat
poly A ⁺ RNA, <i>Hind</i> III Random-Primern	20 µl
5× Erststrang-Puffer	10 µl
100 mM DTT	5 μl
10× methylierter dNTPs-Mix	2,5 μl
MMLV RT (200 U/µl)	4 μl
Nukleasen-freies H ₂ O	8,5 μl
Gesamtvolumen	50 µl

Die Erststrangsynthese erfolgt 1 h bei 37° C. Danach wird die Reaktion 10 min bei 70° C inkubiert. Danach folgt die <u>Zweitstrangsynthese</u>. Dazu werden zum Erststrangsythese-Reaktionsansatz die in Tabelle 3.13 aufgeführten Reagenzien zugegeben.

Tabelle 3.13: Reaktionsansatz zur Zweitstrangsynthese

Reagenz	Quantität
Erststrangsynthese-Reaktionsansatz	50 µl
5× Zweitstrang-Puffer	50 μl
100 mM DTT	6 μl
10× methylierten dNTPs-Mix	25 μl
Nukleasen-freies H ₂ O	112,5 µl
DNA-PolymeraseI (10U/µl)	5 μl
RNase H (1 U/ μ l)	1,5 µl
Gesamtvolumen	250 µl

Der Reaktionsansatz wird gemischt und 90 min bei 15° C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wird mit dem gleichen Volumen Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert (30 s vortexen, danach 1 min bei 20000 ×g zentrifugieren). Die wässrige Phase wird in ein neues Gefäss transferiert und die cDNA wird durch Zugabe von 1 µl Glycogen, 250 µl 4 M Ammonium-Acetat und 300 µl Isopropanol präzipitiert (8 min bei 20000 ×g). Das cDNA-Pellet wird nacheinander mit dem 70 % igen und dem 100 % igen Ethanol gewaschen, getrocknet und zum Schluß in 20 µl TE-Puffer wieder aufgelöst.

Erzeugung von glatten Enden der cDNA. Die bei der cDNA-Synthese zurückstehenden Enden werden nun mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt (Tabelle 3.14).

Reagenz	Quantität
Doppelsträngige cDNA	20 µl
10× Flush-Puffer	3 µl
100 mM DTT	1,5 µl
1 mM dNTPs	3 µl
T4 DNA Polymerase	1,5 U
RNase H (1 U/ μ l)	1,5 µl
Gesamtvolumen	30 µl

Tabelle 3.14: Reaktionsansatz zur Erzeugung von glatten Enden der cDNA.

Die Reaktion erfolgt 20 min bei 11° C. Der ReaktionsAnsatz wird mit TE-Puffer auf 50 μ l aufgefüllt und die cDNA wird mit gleicher Menge Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wird das neue Gefäss transferiert und die cDNA wird durch Zugabe von 1 μ l Glycogen, 250 μ l 4 M Amonium-Acetat und 300 μ l Isopropanol präzipitiert (8 min bei 20000 ×g). Das Pellet wird nacheinander mit dem 70 % igen und dem 100 % igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 μ l TE-Puffer gelöst.

Ligation von *EcoRI/HindIII*-Linkern und *EcoRI* und *HindIII* Restriktionsverdau. Vor der Ligation werden die Linker durch kurze Inkubation mit T4 Polynukleotidkinase inkubiert (Reaktionsansatz s. Tabelle 3.15).

Tabelle 3.15:	: Reaktionsansatz	zur Ligation	von	flankierenden	Linker	an	die	cDNA-
Enden								

Reagenz	Quantität
cDNA mit glatten Enden	10 µl
10× Ligationpuffer-Puffer	2 µl
1 mM ATP	2 µl
100 mM DTT	2 µl
(100 pmol) EcoRI/HindIII-Linkers	2 µl
T4 Polynukleotid-Kinase ()	0,5 μl(5 U)
Gesamtvolumen	20 µl

Die Reaktion wird 5 min bei 37° C inkubiert. Danach werden 2 μ l (4 U/ μ l) T4-DNA-Ligase dazugegeben und 20 h bei 16° C inkubiert. Nach der Ligation wird die Ligase durch Inkubation bei 70° C (10 min) inaktiviert. Zur Restriktionsverdau mit *Hind* III und *Eco*R I wird der Reaktionsmix wie in der Tabelle 3.16 dargestellt, angesetzt.

Tabelle 3.16: Restriktionsverdau von cDNA-Linkern mit EcoR I und Hind III

Reagenz	Quantität
cDNA	20 μl
$10 \times Hind III - Puffer$	10 µl
Hind III	5 μl
H ₂ O	65 μl
100 mM DTT	2 µl
Gesamtvolumen	100 µl
Inkubation 2 h bei 37° C, danach werden EcoR I	-Puffer und Enzym
zugegeben	
$10 \times EcoR$ I – Ausgleichpuffer	10 µl
EcoR I	5 μl
Inkubation 4 h bei 37° C	

Nach vierstundiger Inkubation folgen die Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Extraktion und eine Präzipitation nach Zugabe von 1 μ l Glycogen, 120 μ l 4M Ammonium-Acetat und 500 μ l Ethanol. Das Pellet wird nacheinander mit 70 % igem und 100 % igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Größenfraktionisierung wird wie im Kapitel 3.3.10 durchgeführt.

Ligation in den λ SCREEN 1-Vektor und Verpackung in die Phagen. Die cDNA wird mit Phagenarmen von λ SCREEN 1 wie im Kapitel 3.3.10 beschrieben ligiert und in die Phagenhüllen verpackt. Es wird der Titer der primären unamplifizierten cDNA-Bank geprüft (Kapitel 3.5.1). Eine primäre cDNA-Bank mit dem Kolonieentiter >10⁶ pfu kann in Bakterien (Stamm ER 1647) amplifiziert werden (Kapitel 3.5.1).

3.7 Screen der cDNA-Banken

3.7.1 Immunscreen einer Expressions-cDNA-Bank

Material:

- Nitrocellulose-Membranen 0,45 μm (Schleicher und Schuell), 10 cm \times 10 cm, mit 10 mM IPTG getränkt und getrocknet
- Plating-Bakterien BL 21 (DE 3) pLysE (Kapitel 3.5) für λ-SCREEN 1
- Petrischalen, quadratisch (Greiner Bio-One) mit 2× YT Nährboden: 16 g Select Pepton (Invitrogen) 10 g Hefeextrackt (Invitrogen) 5 g NaCl (Roth) 15 g Select Agar (Invitrogen) ad 1 L H₂O autoklaviert und bei RT aufbewahrt
- LB-Top-Agarose (Kapitel 3.5.1)
- Waschpuffer (Kapitel 3.8.5.2)
- Blockierungspuffer (Kapitel 3.8.5.2)
- Antikörper-Inkubationspuffer (Kapitel 3.8.5.2)
- Seren von Rindern nach wiederholten *E. bovis*-Infektion und auf infizierten Zellen affinitätsgereinigte Antikörper
- Sekundärantikörper: Alkalische Phosphatase-gekoppelt
- Chinesische Tusche
- Substratlösung BCIP/NBT (Kapitel 3.8.5.3)
- Plastikfolie, Polystar PE-Schlauchfolie (Rische & Herfurth)

Vorgehensweise:

Der Erstscreen der cDNA-Bank erfolgte mit etwa 100.000 Klonen. Die Klone wurden, auf 7 YT-Platten verteilt, ausplatiert. Die Platten werden umgedreht im Brutschrank bei 37° C 6 Stunden inkubiert, bis die Phagen-Plaques 0,5 – 1 mm groß sind. Dann werden die IPTG-Nitrocelullose-Membranen auf die Bakterienrasen luftblasenfrei aufgelegt und 3 h bei 37° C inkubiert. Danach werden die Petrischalen 1 h bei 4° C inkubiert (erleichtert die Trennung der Membranen von der Agarose). Die Membranen mit anhaftenden rekombinanten Proteinen werden von der Platte vorsichtig abgenommen und kurz im Waschpuffer gewaschen, dann werden die Membranen im Blockierungspuffer 1 h bei RT inkubiert. Gleich im Anschluß folgt die Inkubation 1 h bei RT mit Antiseren in einer Verdünnung 1:1000 bzw. bei affinitätsgereinigten Antikörpern in einer Verdünnung 1:100. Unspezifisch-gebundene Antikörper werden durch dreimaliges 10minütiges Waschen im Waschpuffer entfernt. Die Membranen werden weiter 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung 1:10.000 inkubiert, danach wie oben ausgeführt gewaschen und mit Substratlösung je 2 Stück "mit dem Rücken" zu einander luftblasenfrei in die Plastikfolie eingeschweißt. Die Entwicklung erfolgt über Nacht.

3.7.2 Screen der cDNA-Bank mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Material:

- Nitrocellulose-Membranen 0,45 µm (Schleicher und Schuell)
- quadratische Petrischallen (Greiner Bio-One) mit MgSO₄-LB-Agar-Nährboden (Kapitel 3.5.1)
- LB-Top-Agarose (Kapil 3.6.1)
- Plating-Bakterien ER 1647 für λ -SCREEN 1 und XL 1 blue für λ TriplEx 2
- Digoxigenin-markierte DNA-Sonden
- 20× SSC (Kapitel 3.3.9.2)
- Heringsperm-DNA (Kapitel 3.3.10.2)
- Hybridisierungslösung (Kapitel 3.3.10.2)
- Anti-Digoxigenin-AP Konjugat (Kapitel 3.3.10.2)
- Waschpuffer I und II (Kapitel 3.3.10.2)
- Maleinsäure-Puffer, pH 7,5 (Kapitel 3.3.10.2)
- Waschlösung (Kapitel 3.3.10.2)
- Caseinlösung (Kapitel 3.3.10.2)

Vorgehensweise:

Für einen Erstscreen werden 100.000 Klone verteilt auf 5 Platten ausplatiert (Kapitel 3.5.1). Die Platten werden 5 – 6 Stunden bei 37° C inkubiert, bis die Phagenplaques sichtbar sind. Je 2 Membranen pro Platte (Doppelabdruck) werden nacheinander luftblasenfrei aufgelegt. Die erste Membrane wird 2 min und die zweite im Anschluß 3 min auf dem Bakterienrasen inkubiert. Danach werden die Membranen 1 min im Denaturierungsbad und dann 1 min im Neutralisierungsbad inkubiert. Im Anschluß werden sie kurz in $2 \times$ SSC gewaschen und auf dem Filterpapier getrocknet. Die Fixierung der Nukleinsäuren findet über 1 h bei 80° C statt. Die Hybridisierung Membran-gebundener Phagen-DNA mit Digoxigenin-markierten Sonden ist im Kapitel 3.3.11.2 beschrieben. Die Entwicklung erfolgt über Nacht in Substrat BCIP/NBT. Die positiven Signale werden durch Vergleich von zwei Menbranen einer Platte ermittelt.

3.7.3 Isolierung der positiven Klone

Material:

- $1 \times \lambda$ -Verdünnungspuffer (Kapitel 3.4.1)
- Chloroform (Roth)

Vorgehensweise:

Die Umrisse der Membranen und ihre Tintenmarkierungen werden auf eine durchsichtige Folie übertragen, die zur Deckung mit den korrespondierenden Phagenplatten gebracht wird. Die positiven Plaques werden mit einem abgeflammten Skalpell ausgeschnitten (etwa 0,5 cm × 0,5 cm) und das resultierende Agarstückchen wird in 500 µl 1× λ -Verdünnungspuffer + Chloroform (0,3 %) resuspendiert. Die enthaltenen Phagen werden nun so vereinzelt, dass nach einem zweiten oder dritten Screening ein positives Signal einem isolierten Plaque zugeordnet werden kann, welcher dann mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen wird. Zur Charakterisierung der positiven Phagen wird zuerst eine PCR durchgeführt. Als Matrizen-DNA dienen 3 μ l der Phagenlösung und mit je nach Vektor spezifischen Primern [λ TriplEx2: 5'-SeqTriplEx2 und 3'-SeqTriplEx2; λ SCREEN-1: SiTag-Primer und SP6-Promoter_1-Primer (Kapitel 3.3.9)] werden die in den Phagen klonierten DNAs amplifiziert. Zur weiteren Charakterisierung werden aus Phagen über Cre *loxP*-Sites die klonierten Fragment-tragenden Plasmide ausgeschnitten (Kapitel 3.4.6), und der Sequenzierung zugeführt.

3.8 Proteine

3.8.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Material:

- Protein Assay (Bio-Rad)
- Bovines Serum Albumin, Albumin Fraktion V, BSA (Roth)
- 16-Loch-Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Module, Maxisorp F16)

Vorgehensweise:

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgt nach Bradford (1976). Alternativ kann die Menge von einzelnen Proteinen direkt auf einem Acrylamidgel (Kapitel 3.8.3 und 3.8.4) in Anwesenheit von einem Protein-Marker bekannter Konzentration nach Coomassie-Färbung abgeschätzt werden.

3.8.2 <u>Präzipitation von Proteinen</u>

Material:

- proteinhaltige Lösung
- Methanol (Merck)
- Chloroform (Roth)
- Aceton, -20° C kalt (Roth)
- 1× Probenpuffer wird vom 5× Probenpuffer (Kapitel 3.8.3) hergestellt
- H₂O milli Q

Vorgehensweise:

Zum Zweck der Proteinkonzentrierung vor der SDS-PAGE oder der Entfernung der Detergentien werden die Proteine mit Hilfe von Methanol/Chloroform präzipitiert. Die proteinhaltige Lösung wird mit Methanol/Chloroform/Wasser in einem Verhältniss 1:4/1/3

(v/v) gemischt (Vortex) und 1 min bei 21.000 ×g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation haben sich 2 Phasen gebildet: eine obere wässrige Phase und die untere Chlorophormphase; zwischen den Phasen, finden sich die Proteine. Die obere wässrige Phase wird abpipettiert und verworfen; zum Rest werden 400 µl Methanol gegeben. Der Ansatz wird gemischt und 2 min bei 21.000 ×g zentrifugiert. Das Pellet wird im Speed-vac 10 min getrocknet und anschließend in 20 µl 1× Probenpuffer aufgenommen. Alternativ können die Proteine auch mit –20° C kaltem Aceton präzipitiert werden. Dazu wird die Protein-haltige Lösung mit Aceton im Verhältniss 1:4 (v/v) gemischt und bei –20° C 1 h inkubiert. Danach wird das Proteinpräzipitat bei 20.000 ×g abzentrifugiert.

3.8.3 <u>SDS-PAGE</u>

Material:

- 4× Tris·Cl/SDS, pH 6,8 mit 1 N HCl eingestellt (die Lösung wird bei 4° C höchstens 1 Monat aufbewahrt)
 0,5 M Tris (MP Biomedicals)
 - 0,4 % SDS (Serva)
- 4× Tris·Cl/SDS, mit 1 N HCl auf pH 8,8 eingestellt (die Lösung wird bei 4° C höchstens 1 Monat aufbewahrt)
 1,5 M Tris (MP Biomedicals)
 - 0,4 % SDS (Serva)
- Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung: Rotiphorese[®] Gel 30 (Roth): gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige, 30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1; 4° C aufbewahrt
- mit Wasser gesättiges Isobuthanol
- Ammonium persulphat, APS (Amersham Bioscience): eine 10 % ige Lösung (w/v) in H₂O angesetzt und in 100 μ l Aliquots bei -20°C aufbewahrt
- TEMED (Amersham Bioscience)
- 10× Elektroden (Lauf)-Puffer (pH 8,3): 30,3 g Tris (MP Biochemicals) 144,0 g Glycine (MP Biochemicals) 10,0 g SDS (Serva) H₂O ad 1000 ml,
- 5× Probenpuffer pH 6,8; aliquotiert bei 80° C aufbewahrt: 150 mM Tris·HCl (MP Biomedicals) 10 % SDS (Serva) 12,5 % 2-Mercaptoethanol (Serva) 25 % Glycerol ultra pure (MP Biomedicals) 0,005% Bromphenolblau (Merck)
- Molekulargewichtsmarker: BenchMarkTMProtein Ladder, 15 Banden, 10-220 kDa (Invitrogen)

Vorgehensweise:

Zum Herstellen der Gele werden die mit 70 % Ethanol geputzen Glasplatten mit den Spacern in die Halterung eingespannt und im Giesstand justiert. Je nach gewünschter Polyacrylamidkonzentration des Trenngeles werden die Reagentien, wie in der Tabelle 3.4 aufgeführt angesetzt.

Lösungen, ml	Endkonzentration des Acrylamids im Gel (%)						
	6	7	8	9	10	12	13
Acrylamid/Bisacrylamid	3	3,5	4	4,50	5	6	6,5
4× Tris·Cl/SDS, pH 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
H ₂ O	8,25	7,75	7,25	6,75	6,25	5,25	4,75

Tabelle 3.17: Zusammensetzung von Acrylamid – Monomeren

Die gewünschte Acrylamidkonzentration Gel-Lösung wird unmittelbar vor dem Gießen mit 50 µl 10 % APS-Lösung und 10 µl TEMED versetzt und in die Gelkammern zwischen die durch Spacer auseinandergehaltenen Glasplatten gegossen. Das Monomer wird mit Isobuthanol überschichtet und 30-60 min bei RT zum Polymerisieren stehengelassen. Nach der Polymerisation wird das Gel im Gießstand mit 70 % Ethanol und mit H₂O gespüllt. Das Sammelgel wird als 3,9 % ige Polyacrylamid-Lösung (0,65 ml Acrylamidlösung: Rotiphorese[®] Gel 30, 1,25 ml 4× Tris·Cl/SDS (pH 6,8), 3,05 ml H₂O, 25 µl 10% APS und 5 µl TEMED) auf das Trenngel aufgetragen. Anschließend werden sofort die Kämme zur Formung der Geltaschen angebracht. Nach der Polymerisation des Sammelgels (30 min) werden die Gelkassetten in die Trennkammer eingesetzt und die Kämme vorsichtig entfernt. Die Geltaschen werden mittels einer Pasteur-Pipette vorsichtig mit 1× Elektrodenpuffer gespült und mit den aufbereiteten Proben versehen. Das Volumen der Probe soll zur besseren Auflösung der Proteine nicht 10 µl überschreiten. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA für ca. 15 min (bis die Lauffront das Trenngel erreicht) und dann weiter bei 15 mA bis die Laufront den unteren Gelrand erreicht. Bei diesen Bedingungen dauert die Elektrophorese etwa 1,5 h. Nach der Elektrophorese wird das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt. Die Proteine aus dem Trenngel werden entweder direkt im Gel gefärbt (Kapitel 3.8.4) oder auf eine Membran geblottet (Kapitel 3.8.5).

3.8.4 <u>Coomassie-Färbung von Proteinen</u>

Material:

- Coomassiefärbelösung: 0,05 % Serva Blau R-250 10 % Essigsäure (Merck) 50 % Methanol (Merck) H₂O
- Entfärber für Polyacrylamidgele: 15 % Methanol (Merck) 0,75 % Essigsäure (Merck) H₂O
- Entfärber für PVDF-Membranen:

45 % Methanol (Merck) 1 % Essigsäure (Merck) H₂O

• Whatman-Papier

Vorgehensweise:

Die Coomassie-Färbung basiert auf einer unspezifischen Bindung des Farbstoffes an basische und aromatische Seitenketten des Proteins und erlaubt den Nachweiss von 100 - 300 ng /Proteinbande. Die Färbung des Gels erfolgt 1 h bei RT unter leichtem Schwenken in Coomassie-Färbelösung; die PVDF-Membranen werden 10 min gefärbt. Danach wird mit Entfärbelösung ca. 2 - 3 h entfärbt. Nach der Färbung wird die Membran auf Filterpapier getrocknet. Das Gel wird in eine 5 % ige Glycerinlösung verbracht und kann so bis 2 Wochen aufbewahrt werden. Zum Trocknen wird das Gel auf feuchtes Whatman-Papier verbracht, mit Frischhaltefolie knitterfrei abgedeckt und im Vakuumtrockner bei 80° C 1 h getrocknet.

3.8.5 Western Blot und Immunfärbung

3.8.5.1 Proteintransfer auf Membranen

Material:

- PVDF-Transfer-Membran: ImmobilonTM-P (Millipore), auf die Gelgrösse zugeschnitten
- Filter-Papier: 3 mm dickes Filterpapier (Whatman), jeweils 2 pro Gel
- Transfer-Puffer: 25 mM Tris (MP Biochemicals) 192 mM Glycin (MP Biochemicals) 15% Methanol (Merck) H₂O
- Methanol (Merck)
- H₂O
- Ponceaurot: 1 % Essigsäure (Merck) 0,05 % Ponceau S (Acros) H₂O

Vorgehensweise:

Western Blotting stellt ein Verfahren zum Transfer von Proteinen nach SDS-PAGE auf Träger dar und ist die Voraussetzung für die Durchführung von Immunoblot-Techniken. Das Protein-Blotting wird mit einem Semi-Dry-System durchgeführt. Die Transfereffizienz hängt von vielen Faktoren, wie Gelkonzentration und -dicke, Proteineigenschaften, angelegte Stromstärke, ab.

Die SDS-PAGE-Gele werden nach Beendigung der Elektrophorese und Abtrennen des Sammelgels im Transfer-Puffer zusammen mit den Filterpapieren 15 min äquilibriert. Die PVDF-Membran wird zuerst kurz in Methanol gelegt (5 - 10 s) sowie 5 min in H₂O und anschließend für 10 - 15 min im Transferpuffer äquilibriert.

Die Elektroden des Blotting-Gerätes werden mit 1 - 2 ml Transfer-Puffer benetzt. Auf die untere Elektrode (+) wird ein mit Transfer-Puffer vollgesogenes Filterpapier gelegt, darauf werden die Membran und das Gel gelegt. Nach Auflegen des zweiten mit Transfer-Puffer vollgesogenen Filterpapieres wird über den "Sandwich" eine 2 ml Glasspipette vorsichtig so gewälzt, daß evtl. vorhandene Luftblasen entfernt werden. Anschließend wird die obere Elektrode (-) auf die Kontakte gesetzt. Der Transfer erfolgt mit 200 mA Stromstärke über 1 h. Das SDS-PAGE-Gel kann danach in Coomassie (Kapitel 3.8.4) gefärbt werden, um die Effizienz des Blotting-Vorganges zu überprüfen. Die geblotete Membran wird 3 - 5 min in Ponceaurot gefärbt und bei Bedarf mit Aqua dest entfärbt.

3.8.5.2 Blockieren der Membran und Inkubation mit Antikörpern

Material:

- PVDF-Membran mit geblotteten Proteinen
- Blockierungspuffer: 1× TBS pH 7,4 (Kapitel 3.4.5.2) 0,1 % Tween 20 (Aldrich) 4% BSA (Roth)
- Antikörper-Inkubationspuffer: 1× TBS 0,1 % Tween 20 (Aldrich) 1 % BSA (Roth)
- Sekundärantikörper: Peroxidase-gekoppelt
- Waschpuffer: 1× TBS 0,1 % Tween 20 (Aldrich)
 10× TBS pH 7,4 60.57 g Tris-HCl (MP Biochemi
- 60,57 g Tris·HCl (MP Biochemicals) 85 g NaCl (Roth) H₂O ad 1000

Vorgehensweise:

Zur langfristigen Aufbewahrung der gebloteten Antigene werden die Membranen in Aqua dest. gewaschen und getrocknet. Wenn die Immunfärbung folgt, werden die Membranen in Blockierungs-Puffer verbracht und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4° C im Kühlraum auf der Rotationsplattform zur Absätigung von unspezifischen Proteinbindungstellen inkubiert.

Nach der Blockierung wird der Blockierungspuffer gegen die gewünschte Serumverdünnung ausgetauscht (je nach Antikörpertiter und Entwicklungsmethode schwankt die Serumverdünnung von 100 bis 100.000). Nach Inkubation bei RT für 1 h wird das Serum entfernt. Die unspezifisch gebundenen Antikörper werden durch 5
Waschschritte im Waschpuffer (jeweils 10 min) beseitigt. Danach folgt die Inkubation (1h, RT) in den mit alkalischer Phosphatase oder Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern. Danach werden die Membranen wie oben mit Waschpuffer und einmal in 1× TBS gewaschen.

3.8.5.3 Visualisierung

Material:

- Chemilumineszenz-Substrat zum Nachweis der Peroxidase: ECL+PlusTM Western Blotting Detection System (Amersham Bioscience). Die Lösungen A und B werden bei 4°C aufbewahrt, vor Anfertigung der Substratlösung ca. 30 min bei RT äquilibriert und vor Anwendung im Verhältnis 40:1 (v/v) gemischt; Substratmenge 0.1 ml/cm² Membran.
- Chemilumineszenz-Substrat zum Nachweis der alkalischen Phosphatase: CPD-Star (New England Biolabs). Die Lösungen werden bei 4° C aufbewahrt. Der 25× AssayPuffer wird mit H₂O auf 1× verdünnt und im Verhältnis 1 : 200 Substrat vermischt. Der Substratverbrauch liegt bei 0,025 ml/cm²
- Substrat zum Nachweis der Peroxidase: 4-Chloro-1-Naphthol-Tablets (Sigma). 1 Tablette wird in 10 ml Methanol gelöst (Stocklösung). Für den gebrauchsfertigen Substrat werden 2 ml der Stocklösung + 10 ml 1× TBS + 10 μl H₂O₂ angesetzt.
- Substrat zum Nachweis der alkalischen Phophatase: BCIP/NBT (Roche). 200 μl Substrat + 10 ml Nachweispuffer (pH 9,5)
- Nachweispuffer, pH 9,5: 100 mM Tris·HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl₂
- 1× TBS
- Plastikfolie (Polystar PE-Schlauchfolie, Rische & Herfurth, Hamburg)
- Frischhaltefolie
- Kodak BioMax Light Film, BioMax Light-1 (Sigma)

Vorgehensweise:

Die Membranen werden solange in der Substratlösung inkubiert bis der Farbumschlag und das Verhältnis zwischen der Reaktion und Hintergrund eine gewünschte Intensität erreicht haben. Im Falle von Peroxidase dauert die chromogene Entwicklung 5 - 10 min, bei alkalischer Phosphatase von 5 min bis über Nacht.

Für den chemilumineszenten Nachweis werden die Membranen abgetropft in Plastikfolie eingeschweisst und 5 min mit mit dem entsprechenden Substrat im Substratpuffer inkubiert. Danach werden sie feucht zwischen zwei Blätter der Frischhaltefolie eingelegt. Das weitere Verfahren ist in Kapitel 3.3.10.3 beschrieben.

3.9 Herstellung und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Zum Zweck der Immunisierung werden rekombinante Proteine in *E. coli* hergestellt und mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt.

3.9.1 Expression von 6×His-Proteinen in *E. coli*

Material:

- LB-Medium (Kapitel 3.5.1) mit 100 μg/ml Ampicillin, 20 μg/ml Chloramphenicol, 30 μg/ml Kanamycin
- 1 M IPTG dioxanfrei (Isopropyl-β-thiogalaktosid) (Roth)

Vorgehensweise:

Ein zu exprimierendes DNA-Fragment wird in einem der pQE-30, -31, -32 Vektoren kloniert und zur Transformation des Expressionsstamms M 15 eingesetzt (Kapitel 3.3.7 und untenstehende Unterkapitel). Bei der Expression der *E. bovis*-cDNA-Sequenzen, die reich an Adenin und Tymin sind, ist ein niedriges Expressionsniveau zu erwarten wegen der anderen Codon-Usage von *E. coli*. Um das Problem zu vermeiden, benötigt man eine zusätzliche Transformation mit pCodon+ (Stratagene). Dieses ist ein Plamid, das die zusätzliche tRNAs-kodierenden Gene von Arginin, Leucin, und Isoleucin trägt, so daß E. coli mit zusätzlichen tRNAs substituiert wird. Dabei ist die Transformationsreihenfolge: zuerst pCodon+ und dann pQE.

Screening von kleinen Expressionskulturen mit Zeitverlauf dient dazu das Expressionsniveau in zweistündigen Abständen nach der Induktion zu ermitteln. Von 3 Einzelkolonien werden mit LB-Medium (Amp/Kan/Cam) Übernachtkulturen hergestellt. Von diesen 3 Übernachtkulturen werden 500 µl entnommen und dann damit 10 ml LB (Amp/Kan/Cam) angeimpft. Die 10 ml-Kulturen werden bei 37° C und unter Schütteln (160 - 180 rpm) bis $OD_{600} = 0.6$ inbubiert. Es werden jeweils 1ml nicht-induzierte Kontrollen entnommen und die Bakterien bei 20.000 ×g 1 min zentrifugiert. Die Bakterienpellets werden für spätere Bearbeitung bei -20° C eingefroren. Die Kulturen werden währenddessen durch Zugabe von 1 M IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert. Danach werden stündlich 1 ml Kultur (1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach der Induktion) entnommen und bei o. g. Bedingungen verarbeitet. Die Bakterienpellets werden in jeweils 50 µl 1× Probenpuffer resuspendiert und bei 98° C für 2 min inkubiert (Kochen). Es folgt eine Zentrifugation (20000 ×g 5 min), um Proteinextrakt von der freien DNA zu trennen. Danach werden 5 µl von jedem Proteinextrakt in SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Gel-Färbung analysiert. Es werden die Proteinbanden von der erwarteten Größe von nicht induzierten und induzierten Bakterien verglichen. Von den 3 Klonen eines Konstrukts wird einer für die präparative Proteinexpression ausgewählt. Aus diesem Klon wird auch die Plasmid-DNA präpariert (Kapitel 3.4.4), um das Leseraster auf Fehler durch Sequenzierung (Kapitel 3.3.10) zu überprüfen.

<u>Präparative Proteinexpression in 11-Kulturen.</u> Dafür werden zuerst im LB-Medium (Amp/Kan/Cam) 100 ml Übernacht-Kulturen gewachsen, welche dann zum Animpfen von 11 Kultur benutzt werden. Ein Liter vorgewärmtes 11 LB(Amp/Kan/Cam)-Medium wird in 8 Erlenmeyer-Flaschen (nicht mehr als 160 ml pro Flasche, um die Belüftung des Mediums zu gewährleisten) verteilt und mit 10 ml Übernacht-Kultur angeimpft. Die Kulturen werden bei 37° C und unter Schütteln (160 rpm) 2 – 3 h inkubiert bis $OD_{600} = 0,8$ erreicht. Nach Entnahme von 1 ml Kultur (nicht induzierte Kontrolle) wird die 11 Kultur mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und weitere 2,5 h bei o.g. Bedingungen inkubiert. Danach wird 1 ml induzierter Kontrolle entnommen. Die Bakterien aus der 11 Kultur werden dann durch Zentrifugation (20 min bei 4000 ×g) geerntet. Sie werden im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei - 20° C aufbewahrt.

3.9.2 <u>6× His-tag Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Chelatsäule</u>

Material:

- Ni-NTA Agarose (Qiagen)
- Chromatographie-Propylensäulen (Qiagen)
- Puffer A pH 8 (pH-Wert mit einer 1 N NaOH Lösung eingestellt): 100 mM NaH₂PO₄ (Roth)
 10 mM Tris Cl (MP Biochemicals)
 6 M Guanidin Hydrochlorid 98 % (Acros Organics)
- Puffer B pH 8 (pH-Wert mit einer 1 N NaOH Lösung eingestellt): 100 mM NaH₂PO₄ (Roth)
 10 mM Tris Cl (MP Biomedicals)
 8 M Harnstoff (Sigma)
- Puffer C pH 7 (pH-Wert mit einer 1 N HCl Lösung eingestellt): 100 mM NaH2PO4(Roth) 10 mM Tris Cl (MP Biochemicals) 8 M Harnstoff (Sigma)
- Elutionspuffer E pH 7 (pH-Wert mit einer 1 N HCl Lösung eingestellt): 100 mM NaH₂PO₄ (Roth) 10 mM Tris Cl (MP Biochemcals) 8 M Harnstoff (Sigma) 200 mM Imidazol (Merk)

Vorgehensweise:

Die Bakterienpellets werden langsam auf dem Eis aufgetaut und zur Zell-Lyse im Puffer A resuspendiert (5 ml pro g Bakterienmasse). Die Suspension wird 60 min bei RT auf einem Magnetrührer langsam gerührt. Danach wird der Bakteriendebris durch Zentrifugation bei 10000 \times g für 30 min entfernt.

3 ml 50 % ige Ni-NTA-Agarose (die Menge an Ni-NTA-Agarose errechnet sich aus dem Expressionsneveau; die Bindekapazität der Ni-NTA-Agarose liegt zwischen 5 – 10 mg/ml)

wird im Puffer A äquilibriert. Das Ni-NTA-Agarosepellet wird im Überstand der Bakterienlysate suspendiert und 60 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.

Anschließend wird das Gemisch aus Ni-NTA-Agarose und Lysatüberstand in eine unten verschlossene Chromatographie-Säule gefüllt. Nach Ablauf des Puffers wird die Säule einmal mit 10 ml Puffer A und danach so lange mit Puffer B gewaschen bis bei spektrophotometrischer Messung des Durchlaufes bei einer Wellenlänge von 280 nm E_{280} < 0,01 ist (i.d.R. 5 – 10 Säulen-Volumen). Danach wird die Säule dreimal mit 10 ml Puffer C gewaschen. Die "6×His tagged"-Proteine werden zehnmal mit jeweils 500 µl Elutionspuffer E von der Ni-NTA-Agarose-Säule in 1,5 ml Reaktionsgefässe eluiert (10 Fraktionen). Jeweils 10 µl von jeder Fraktion werden mit 5 µl 5× Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE überprüft.

3.9.3 <u>Aufreinigung mittels SDS-PAGE</u>

Zur Immunisierung mit rekombinanten Antigenen werden die Kontamination von *E. coli*-Proteinen und die Produkte der proteolytischen Spaltung des rekombinanten 6×His-Proteins (sie tragen an ihrem N-terminalen Ende auch ein 6× His-tag und werden in der Ni-NTA-Chromatografiesäule mit aufgereinigt) mittels einer zusätzlichen SDS-PAGE aufgereinigt. Dabei erfolgt die Größenfraktionisierung in einer Polyacrylamidgel-Säule.

Material:

- Acrylamidlösung: Rotiphorese[®] Gel 30 (Roth) (Kapitel 3.4.3)
- 1,5 M Tris·HCl (MP Biochemecals), pH 8,8
- 0,5 M Tris HCl (MP Biochemicals), pH 6,8
- Aqua dest
- 10 % APS und TEMED (Kapitel 3.4.3)
- 1× SDS-Elektrophorese Laufpuffer (Kapitel 3.4.3)
- Puffer B (Kapitel 3.4.6.2)

Vorgehensweise:

Je nach Molekulargewicht von zu reinigenden Proteinen und der Kontaminationsproteinen wird die optimale Acrylamidkonzentration ausgwählt (Tabelle 3.18).

Tabelle 3.18: Die optimale Monomerkonzentration der Acrylamid je anchMolekulargewicht des Proteins (Mini Prep Cell, Instruction Manual, Bio-Rad).

Molekulargewicht des Proteins	% T des Gels
15 – 30 kDa	10-16 %
30 – 50 kDa	9-12 %
50 – 70 kDa	7-10 %

70 – 100 kDa	5-9%
100 – 200 kDa	4 – 8 %

Die Gel-Lösung wird wie im Kapitel 3.8.3 vorbereitet und danach 5 min in der Vacuumkammer entgast. Nach zu Zugabe von 50 µl APS und 2,5 µl TEMED wird der Ansatz in das Gelrohr bis auf 10 cm Höhe gegossen. Die Gel-Lösung wird mit Isobuthanol überdeckt und über Nacht zum Polymerisieren stehen gelassen. Mini Prep Cell wird mit der Gel-Säule nach der Anleitung von Bio-Rad zusammengesetzt.

Die Pufferkammern werden mit einem $1 \times$ Laufpuffer gefüllt. Die Elutionspufferkammer wird mit dem Puffer B eingefüllt. Die Proteinprobe (wird vorher mit 5× Probenpuffer versetzt) wird vorsichtig auf das Gel der Gelsäule aufgeladen. Die Elekrophorese erfolgt bei der konstanten 200 V Spannung über 6 Stunden. Wenn der Lauffront mit Bromphenolblau das Boden der Gelsäule erreicht hat, wird die peristaltische Pumpe an das Elutionsschlauch angeschlossen und mit der Geschwindigkeit von 100 µl/min wird das Elutionspuffer aus dem Elutionsverteiler mit nacheinander aus der Gelsäule austrettenen Proteinen abgepumpt. Alle 4 min werden die Fraktionen gesammelt. Zum Ermitteln der Fraktionen mit dem gewünschten Protein werden von jeder dritten Fraktion 100 µl Eluat entnommen und mit Methanol/Chloroform präzipitiert (Kapittel 3.8.2). Die Proteinpellets werden in 20 µl 1× Probenpuffer aufgenommen und in SDS-PAGE aufgetrennt (Kapittel 3.8.3), dann werden nach Coomassie-Färbung und Trocknung der Gele (Kapitel 3.8.4) die Fraktionen ermittelt, die ein kontaminationsfreies Protein enthalten.

3.9.4 Dialyse von Proteinen

Material:

- Spectra/Por Dialysemembran-Set: 7 Verschlussklammern in drei verschiedenen Ausführungen, ein Dialysegefäss 1800 ml mit Magnetstäbchen und Dialysemembranen der Flachbreite 16 mm und Länge 1 m aus regenerierter Zellulose mit MWCO 3500, 8000, 15000, 25000 und 60000 (Spectrum Laboratories, Roth)
- Proteinlösung, die zu dialysieren ist und geeigneter Dialyse-Puffer
- 1 M Harnstoff (Sigma) in 1× PBS
- $1 \times PBS$

Vorgehensweise:

Ein geeigneter Dialyseschlauch wird ca. 30 min in 500 ml dH₂O einlegt, um Glycerol zu entfernen und dann gründlich mit H₂O abgespült. Der MWCO der Membran ("Molecular Weight Cut Off" oder Ausschlussgrenze in kDa) soll ca. die Hälfte des Molekulargewichtes der in der Membran verbleibenden Makromoleküle haben. Nach

Befüllung mit Dialysiergut und Verschluß wird der Dialysierschlauch in einen mit Dialyse-Puffer gefüllten Behälter gelegt. Die Dialyse erfolgt bei 4° C auf einem Magnetrührer zuerst 12 h gegen 1 M Harnstoff und dann 12 h gegen PBS.

3.9.5 Immunisierung von Kaninchen und Seren

Die Immunisierung des Kaninchens wurde im Auftrag bei Seq Lab, Göttingen durchgeführt. Die dialysierten Proteine werden in Portionen á 200 μ g mit Aceton präzipitiert (Kapitel 3.8.2) und versandt. Die Immunseren von Kaninchen werden aliquotiert und mit 50 % Glycerol versetzt bei –20° C aufbewahrt. Vor der Immunisierung wurden die Seren der dafür vorgesehenen Tiere auf Reaktivität gegen die Antigene überprüft. Nur Tiere mit eindeutig negativen Ergebnis wurden verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antiseren gegen 3 überlappende Fragmente von *Eb*CDPK hergestellt.

3.10 Immunhistologie

3.10.1 Fixierung von E. bovis-Sporozoiten; -Merozoiten I sowie von infizierten Zellen

Material:

- Sporozoiten (Kapitel 3.2.3), Merozoiten I, infizierte Wirtszellen BFGZ, sowie nicht infizierten Kontrollzellen (Kapitel 3.2.4.1 und 3.2.4.2)
- Diagnostische Objektträger, 12 Wells, 5 mm, nummeriert (Erie Scientific Company)
- 10 %ige Paraformaldehyd-Lösung (wird bei –20° C aufbewahrt)
- für 100 ml der 10 % igen Paraformaldehydlösung werden 10 g Paraformaldehyd (Serva) in 60 ml H₂O nach Zugabe von 2 3 Tropfen 1 N NaOH gelöst. Die Lösung wird mit H₂O auf 100 ml gebracht und durch Filterpapier filtriert, und aliquotiert bei 20° C aufbewahrt.
- Gebrauchsfertige gepufferte Paraformaldehyd/Glutaraldehyd (Pfa/Ga) Fixierungslösung: 4 %ige Paraformaldehyd-Lösung; aus 10 %iger Stocklösung verdünnt; 0,25 %ige Glutaraldehyd-Losung; aus 25 %iger (Serva) verdünnt; 1× PBS; aus 10 × PBS verdünnen.
- Methanol (Merk)
- $1 \times PBS$

Vorgehensweise:

Die frisch excystierten Sporozoiten und frisch geernteten Merozoiten I werden mit PBS gewaschen und in 10 – 20 μ l mit einer Konzentration von 1000 Parasiten/ μ l auf die Objektträger aufgebracht. Die Objektträger werden bei RT 3 – 4 h getrocknet und können danach entweder fixiert oder bei - 80° C eingefroren werden. Für die Pfa/Ga-Fixierung werden die Objekträger in der gepufferten Pfa/Ga-Fixierungslösung 10 min bei RT inkubiert. Danach werden sie dreimal mit 1× PBS 5 min gewaschen, getrocknet und bei –

20° C aufbewahrt. Für die Methanol-Fixierung werden die Objektträger 10 min in –20° C kaltem Methanol inkubiert, dann luftgetrocknet und bei –20° C aufbewahrt.

3.10.2 Indirekter Immunfluoreszenztest

Material:

- Objektträger mit fixierten Sporozoiten oder Merozoiten I; Deckgläschen mit fixierten Wirtszellen
- $1 \times PBS$
- Blockierungspuffer I (zur Blockierung von freien Aldehydgruppen): 100 mM Glycin (MP Biomedicals) in 1× PBS
- Blockierungspuffer II: 2 % BSA (Roth) in 1× PBS
- Antikörper-Inkubationspuffer: 1 % BSA (Roth) 1× PBS Antikörper (gewünschte Serumverdünunng) 0,2 % (w/v) Evans Blue-Lösung (Serva) in 1× PBS
- Testsera: αEbCDPK 1-Fragment 3 in den Verdünungen: 1:100, 1:500, 1:1000 Affinitätsgereinigte Antiköper auf dem Fragment 3-Antigen aus dem αEbCDPK 1-Fragment 3-Serum in den Verdünnungen: 1:10, 1:100, 1:500
- Konjugate: Fluorescein (FITC)-gekoppelter affinitätsgereinigter anti-Kaninchen IgG aus Esel. Verdünnung 1:100 (Dianova)
- Einbettungsmittel Mowiol 4.88: 80 ml PBS 40 ml Glycerol ultra pure (MP Biochemicals) 2,4 g Propylgalat (Sigma) 20 g Mowiol 4.88 (Calbiochem) in kleinen Portionen zugeben, über Nacht rühren, danach bei 25.000 ×g 30 min zentrifugieren. Der Überstand wird aliquotiert und bei 4° C aufbewahrt.
 Deckgläser (lang)
- Objektträger für die infizierten Zellen

Vorgehensweise:

Die auf Objektträgern bzw. Deckgläsern Pfa-Ga-fixierten Sporozoiten, Merozoiten und infizierten Zellen werden 10 min bei RT in Blockierungspuffer I inkubiert, um die Reaktivität der freien Aldehydgruppen zu unterbinden. Dieser Schritt entfällt bei den Methanol-fixierten Parasiten und Zellen. Danach werden die Objektträger einmal in 1× PBS gewaschen und im Blockierungspuffer II 30 min bei 37° C inkubiert (Blockierung von unspezifischen Proteinbindungsstellen). Im Anschluß werden die in Antikörper-Inkubationspuffer verdünnten Antisera aufgetragen und bei 37° C 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit 1× PBS werden die in Inkubationspuffer mit Evans Blue-Lösung zur Gegenfärbung 1:1000 verdünnten Konjugate aufgebracht und 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation werden unspezifisch gebundene Immunglobuline durch dreimaliges Waschen wie oben entfernt. Die Objektträger werden mit Mowiol eingedeckelt, die Deckgläsern mit infizierten Zellen mit Mowiol, den Zellrasen nach unten

auf Glassobjektträger, geklebt. Die Präparate wurden nach einer Aushärtungszeit des Mowiols von 24 h im CLSM oder Fluoreszenzmikroskop mit Aufsichtentwicklung untersucht.

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung und Screen der cDNA-Banken

4.1.1 <u>Überprüfung der durchnittlichen Größen der klonierten cDNAs</u>

Nach der Herstellung der Merozoiten I-cDNA-Banken wurden die durchschnittlichen Insertgrößen von 10 bis 20 zufällig ausgewählten Klonen überprüft, um ungefähr die Größen der klonierten cDNAs abzuschätzen. Im Falle der OrientExpressTM-cDNA-Bank (Random Priming Strategie, Vektor λ SCREEN-1) betrug die Insertgröße von 0,2 kb bis 1,5 kb (Abbildung 4.1).



Abbildung 4.1: PCR mit Phagenklonen zur Bestimmung der Insertgrößen; OrientExpress™-cDNA-Bank M: Marker, kb; 1-20: zufällig ausgewählte Phagenklone

Die SMART-cDNA-Bank (Vektor λ TriplEx 2) wies eine durchschnittliche Insergröße von 0,3 kb bis 1,5 bp auf (Abbildung 4.2).



Abblidung 4.2: PCR mit Phagenklonen zur Bestimmung der Insertgrößen; SMARTTM-cDNA-Bank. M: Marker, bp; 1-17: zufällig ausgewählte Phagenklone

Bei der SMART-cDNA-Bank wurde der Anteil nicht rekombinanter Phagen ermittelt. Unter 20 000 Phagen-Klonen fanden sich nur vier nicht rekombinante Klone (0,02 %).

4.1.2 <u>Screenen der cDNA-Banken</u>

4.1.2.1 Screen mit Seren aus postpatenten reinfizierten Rindern

Der Fragestellung nach war geplant, *E. bovis*-spezifische Oberflächenantigene auf infizierten Zellen durch Antikörperscreening von *E. bovis*-cDNA-Banken zu erfassen. Als Werkzeug standen zwei cDNA-Banken zur Verfügung – eine OrientExpressTM-cDNA-Bank im Vektor λ SCREEN 1 und eine SMARTTM-cDNA-Bank im Vektor λ TriplEx2 – sowie entsprechende, teils an infizierten Zellen affinitätsgereinigte Rinderseren. Der Screen der SMARTTM-cDNA-Bank mit den Seren verlief erfolglos. Für den weiteren Immunscreen wurde daher die OrientExpressTM-cDNA-Bank verwendet.

Für den Screen wurde die Verwendung der auf infizierten Zellen affinitätsgereinigten Antikörper aus Immunseren aus reinfizierten Kälber (Badawy, 2004) vorgesehen. Da nicht ausreichend affinitätsgereinigte Antikörper für der Screen zur Verfügung standen, wurde der Screen von 10⁵ Phagenklonen der Merozoiten-I-Expression-cDNA-Bank anfangs mit Gesamt-Seren von postpatenten Rindern durchgeführt. Dabei wurden 106 reaktive Phagenklone ermittelt, welche in einer zweiten und dritten Screenening-Runde aufgereinigt wurden. Diese mit nicht aufgereinigtem Serum reaktive Phagenklone wurden später auf zwei Membranen mit affinitätgereinigten Antikörpern getestet.

4.1.2.2 Screen mit affinitätsgereinigten Antiköpern

Diese Klone wurden mit an infizierten Zellen affinitätgereinigten Antikörpern gescreent. Dabei reagierten 6 Klone, die im Anschluß sequenziert wurden. Es stellte sich heraus, dass kein cDNA-Insert einen vollständigen, durchgehenden Leserahmen aufwies. Nur bei Klon 3 wurde ein durchgehender Leseraster (ORF –2) in der cDNA ermittelt, der jedoch nicht im selben Leserahmen mit dem vorhandenen His-Tag war (Abbildung 4.3). Die Homologiesuche (blastp) in der NCBI Datenbank zeigte, daß ein Teil der abgeleiteten Aminosäurensequenz mit der katalytischen Domäne der Serin/Threonin Proteinkinasen mit Calmodulin-ähnlicher Domäne aus Protozoa und Pflanzen homolog war. Die Aminosäurensequenz hatte eine 39 %ige Identität und 57 %ige Ähnlichkeit zu einer Proteinkinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne (CDPK) aus *Cryptosporidium parvum* und 40 % Identität und 62 % Ähnlichkeit zu homologen Proteinen aus *Ceratopteris richardii*. An beiden Enden der Kinaseteilsequenz konnte man "low complexity" Bereiche feststellen.



Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der cDNA-Sequenz des Phagenklons 3 mit Translation in allen 6 Leserastern. Das Leseraster mit dem His-Tag ist grün unterlegt; das durchgehende Leseraster mit einer Kinase-homologen Sequenz ist rot unterlegt. Die CDPK-homologe Sequenz liegt zwischen R 48 – Y 157. Stopkodons sind mit Sternen gekennzeichnet. Die Position der Primer Eb3_exp_S2 und Eb3_exp_A (siehe Tabelle 3.5, Kapitel 3.3.9) ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

Da CDPKs bisher nur bei Protozoa und Pflanzen beschrieben waren und es auch Hinweise auf das Vorkommen dieser Kinase auf der Oberfläche von *Plasmodium falciparum*infizierten Zellen gab (Zhao et al., 1992), deutete dies auf Vorkommen bei *E. bovis* von Protozoa-spezifischen Signaltransduktionskaskaden, die aber bei Vertebraten nicht vorhanden sind. Die Charakterisierung von einzelnen Molekülen dieser Kaskaden – in dieser Arbeit die Proteinkinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne bei *Eimeria bovis* (*Eb*CDPK 1) – würde Signaltransduktionswege aufdecken und als mögliche Grundlage für Entwicklung von neuen Kokzidienmitteln dienen.

Um die vollständige cDNA-Sequenz der *Eb*CDPK 1 zu ermitteln, wurde für ein Screen mit der Sonde S2 (Kinase-Domäne-kodierende cDNA-Sequenz aus dem Klon 3) mit Phagenklonen der Banken entschieden.

4.1.2.3 Screen der SMART-cDNA-Bank mit einer Digoxigenin-markierten Sonde von Klon 3.

Zur Erweiterung der *Eb*CDPK 1-cDNA erfolgte ein Screen der SMART-cDNA-Bank mit DNA-Sonden (der Vorteil dieser cDNA-Bank gegenüber der OrientExpress[™]-cDNA-Bank ist, daß das 5'-Ende der meisten cDNA-Klone erhalten ist). Die Digoxigeninmarkierte Sonde S2 wurde mittels PCR mit den Primern Eb3_exp_S2 und Eb3_exp_A (vgl. Abbildung 4.3 und Tabelle 3.5) hergestellt. Für den Screen wurden etwa 80 000 Phagenklone eingesetzt. Hybridisieren und Waschen wurde unter weniger stringenten Bedingungen durchgeführt, denn die Sonde hatte nur 40 % Identität mit heterologen CDPKs aus Apicomplexa.

Über den Screen wurden 11 positive Klone identifiziert und in einem weiteren Screen aufgereinigt. Mittels PCR wurden die Insertlängen ermittelt; die Klone mit cDNA-Inserts über 500 bp wurden von beiden Seiten ansequenziert. Dabei wurde ein Klon (Klon 8/S2-H) ermittelt, welcher für eine Kinase-Domäne der gesuchten CDPK kodierte. Die 325

Aminosäuren-lange Sequenz hatte 94 % Identität zu CDPK aus *E. tenella* und 84 % Identität zu CDPK 1 aus *T. gondii*. Die cDNA hatte ein durchgehendes Leseraster und endete ohne Stop-Kodon und ohne 3'-UTR mit einem polyA-Schwanz. Hier wurde als Ursache ein Artefakt vermutet. Dies konnte später bestätigt werden (wegen des hohen AU-Anteils in der mRNA der *Eb*CDPK 1 hatte der dT-Primer bei der cDNA-Synthese an einer Adenin-reichen Stelle in der kodierenden Sequenz hybridisiert, was zur Synthese vom ersten cDNA-Strang in der Mitte der mRNA führte).

Bei der Suche nach funktionellen Domänen mit SMART (Simple Modular Architecture **R**esearch Tool) wurde in der abgeleiteten Aminosäurensequenz eine vollständige katalytische Serin/Threonin-Kinasedomäne festgestellt. Diese Aminosäurensequenz wies eine hohe Homologie zu einer *Eimeria tenella*-CDPK mit der Identität von 96 % und der Ähnlichkeit von 98 % auf. Die Homologie zu der CDPK aus der Pflanze *Arabidopsis taliana* war mit der Identität von 48 % und der Ählichkeit von 64 % jedoch geringer. Von den Homologien ausgehend und durch das Vorhandensein der typischen Kozak-Sequenz (XXRXX<u>AUG</u>G, R-Purine ein A oder ein G) konnte der Translationsstart für das Protein ermittelt werden (Kozak, 1987). Somit war das 5'-Ende der cDNA sequenziert.

4.2 Ermittlung des 3'-Endes der *Eb*CDPK 1-cDNA

Nachdem das 5'-Ende der *Eb*CDPK 1-kodierenden cDNA sequenziert worden war, wurde zuerst per PCR mit der unklonierten SMART-cDNA überprüft, ob eine längere cDNA existiert. Die Amplifikation wurde mit einem Linker-spezifischen Primer (SMART_3' PCR) am 3'-Ende und dem Sequenz-spezifischen Primer (Eb(Ca)-CaM_seq_S) am 5'-Ende durchgeführt (siehe Primertabelle 3.5, Kapitel 3.3.9).

Die erhaltenen PCR-Produkte hatten Größen von etwa 800 bp und 680 bp (Abbildung 4.4), was ungefähr der Insert-Größe des Klons 8/S2-H (vgl. Kapitel 4.1.2.3) entsprach. Das sprach dafür, daß bei den meisten *Eb*CDPK 1-cDNAs der dT-Primer innerhalb der kodierenden Sequenz hybridisierte.

Der Versuch, das 3'-Ende mittels RACE-PCR aus Sporozoiten-mRNA zu amplifizieren blieb erfolglos.



Abbildung 4.4: Amplifikation des 3'-Endes der *Eb*CDPK 1-cDNA aus der unklonierten cDNA. Die PCR-Produkte hatten eine Größe von etwa 800 bp und 680 bp. M: Marker, kb

In der Folge wurde versucht, die OrientExpress[™]-cDNA-Bank mit einer Sonde aus der Kinase-kodierenden Sequenz aus *Eb*CDPK 1 (Sonde S4) zu screenen, um die vorhandene Sequenz zu vervollständigen. Die Position der S4-flankierenden Primer ist der Abbildung 4.5 zu entnehmen.

Die S4-Digoxigenin-markierte Sonde wurde mittels PCR mit Kinase-flankierenden Primern (Eb.(Ca)-CaM seq S und Eb.CaM exp A, siehe Primertabelle 3.5 im Kapitel 3.3.9 und Abbildung 4.5) hergestellt. Für den Screen wurden etwa 50 000 Phagenklone eingesetzt. Die positiven Phagenklone wurden nach einem Rescreen isoliert und die Insertgrößen wurden mittels PCR mit der Primerkombinationen Eb(Ca)-Cam seq S / T7-Terminator und SiTag/EbCam exp A (siehe Primertabelle 3.5 im Kapitel 3.3.9 und Abbildung 4.5) geprüft. Die Phagenklone 2/S4-H und 28/S4-H, von denen es in der PCR mit Eb.CaM exp S/T7-Terminator die größten PCR-Produkte ergab, wurden im zweiten Screen aufgereinigt und zum Sequenzieren in pSCREEN-1 umkloniert. Mit der in Klon 2/S4-H enthaltenen cDNA konnte die bekannte EbCDPK 1-Sequenz zwar um 479 Basenpaaren verlängert werden, doch hörten noch vor dem Stop-Kodon die Homologien zu CDPKs aus anderen Protozoen auf. Man konnte weiterhin in der cDNA nach etwa 60 bp die ganze Linker-Sequenz und anschließend eine kodierende Sequenz feststellen, die eine hohe Homologie zu einem Microneme-Protein 4 von Eimeria tenella aufwies. Dies weist auf eine artefiziell zusammengesetzte cDNA des Klones hin. Der vermutliche Grund zur Entstehung von mehreren zusammenligierten cDNAs ist die Restriktion auch an internen EcoR I und Hind III Schnittstellen und die anschließende Ligation von verschiedenen

cDNAs. In einem weiteren, Klon 28/S4-H, waren dagegen die Sequenz, die das gesamte Cterminale Ende der *Eb*CDPK 1 kodiert und eine etwa 700 bp lange Sequenz nach dem Stopkodon aus dem 3'-Nicht-Kodierungsregion (3'-UTR) enthalten.

4.3 Die Sequenz von *Eb*CDPK 1

4.3.1 <u>cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz</u>

Die cDNA-Sequenz umfasst 2376 bp (Abbildung 4.5); davon entfallen 1535 bp auf den kodierenden Bereich. Bei der cDNA fällt der hohe AT–Anteil (59 % gegenüber 41 % GC) auf. In der kodierenden cDNA beträgt der AT-Gehalt 61 %. Die abgeleitete Aminosäurensequenz besteht aus 511 Aminosäuren. Für das Protein ergibt sich ein berechnetes Molekulargewicht von 57,81 kDa. Der Translationsstart und die Position des ersten Methionins wurden durch Homologievergleich und das Vorhandensein einer typischen Kozak-Sequenz am 5'-Ende der cDNA ermittelt.

1	CA	GTT	CTT	CGG	CCT	ссс	TGC	TAA	ATC'	ГСТ	TCC	CTT	CTC'	TTT.	ATA	TTT	ATA	TTA:	rtt'	TAT	TTT	CTT	TGT	TTA	TTAT
											М	G	Q	Q	Е	S	Т	L	Ρ	A	Е	Ρ	R	Ρ	K
76	TT.	ATT	AAT	TTA	TTT	CCA	TTT	CTA	CAC	AAA	AAT	G G G	GCA	GCA	AGA	AAG	TAC	FTT	GCC	AGC	GGA	GCC	GCG	GCC	CAAG
16	Q	Ρ	A	G	S	К	V	D	K	L	A	A	Т	Ρ	G	V	F	V	Q	Н	S	Т	A	A	F
151	CA	GCC	Eb.C AGC	aM_e AGG	xp_S CTC	AAA	GGT	GGÀ	TAA	ATT	GGC.	AGC	TAC	CCC	TGG	AGT	GTT(CGT	GCA	GCA	CTC	TAC	TGC	TGC	TTTC
41	S	D	R	Y	К	G	Q	R	V	L	G	К	G	S	F	G	Е	V	I	L	С	К	D	К	V
226	AG	CGA	CAG	GTA	TAA	GGG.	ACA	GCG.	AGT'	гст	GGG	TAA	GGG	GAG	TTT	TGG'	IGA	AGT	rat'	FTT.	ATG	TAA	GGA'	TAA	AGTA
66	Т	G	E	E	Y	A	V	K	V	I	S	K	R	Q	V	K	Q	К	Т	D	K	Е	L	L	L
301	AC.	AGG	GGA	GGA	ATA	CGC.	AGT	GAA	GGT	GAT	CTC	TAA	GCG	GCA.	AGT	AAA	ACAG	GAAG	GAC	CGA	TAA	AGA	ATT	ATT	ATTA
91	К	Е	V	Е	L	L	К	K	L	D	Н	Ρ	N	I	Μ	К	L	Y	Е	F	F	Е	D	K	G
376	AA	AGA	AGT	TGA	GTT	ATT.	AAA	GAA	GTT	AGA	CCA	TCC.	AAA	TAT.	AAT	GAA	GTT	ATA	rga	ATT	CTT	TGA	AGA'	TAA	AGGC
116	Y	F	Y	L	V	Т	Е	V	Y	Т	G	G	Е	L	F	D	Е	Ι	Ι	S	R	Κ	R	F	S
451	TA	TTT	TTA	TTT	AGT	TAC	GGA	AGT	CTA	TAC	TGG.	AGG.	AGA	ATT.	ATT	TGA	TGA	GAT	[AT	TAG	CAG	AAA	AAG	GTT	FAGT
141	Е	V	D	A	A	R	I	I	R	Q	V	L	S	G	I	Т	Y	М	Н	R	N	R	I	V	Н
526	GA	GGT	TGA	TGC	TGC	GCG	TAT	CAT	CCG	ACA	AGT.	ATT.	ATC	AGG	CAT	AAC	Eb(C	CAT(M_sec	LS TCG	GAA	CAG	GAT	IGT.	ICAT
166	R	D	L	K	Р	Е	N	L	L	L	Е	S	K	R	K	D	A	N	I	R	I	I	D	F	G
601	CG.	AGA	TTT	AAA	ACC	AGA	AAA	TTT.	ATT	ATT.	AGA	AAG	TAA	AAG.	AAA	AGA'	IGC/	AAA	rat(CAG.	AAT	TAT	TGA	TTT'	IGGA
191	L	S	Т	Н	F	Е	A	Т	K	K	М	K	D	K	I	G	Т	A	Y	Y	I	А	Ρ	Е	V
676	TT.	ATC	AAC	ACA	TTT	TGA	AGC.	AAC	CAA	AAA	AAT	GAA	AGA	TAA	AAT	CGG	AAC	rgco	GTA'	ГТА	CAT	AGC	TCC'	DPK_ TGA	exp6_S GGTG
216	L	Н	G	Т	Y	D	Е	К	С	D	V	W	S	Т	G	V	I	L	Y	Ι	L	L	S	G	С
751	CT	TCA	CGG	GAC	TTA	TGA	TGA	AAA	GTG	IGA	CGT.	ATG	GTC	AAC	GGG	AGT	TAT	FCT?	TTA)	CAT	TCT	TCT	TTC	TGG	CTGC
241	Ρ	Ρ	F	N	G	A	N	Е	F	Е	I	L	K	К	V	Е	К	G	К	Y	Т	F	D	L	P
826	CC	ссс	CTT	TAA	CGG	CGC	CAA	CGA	ATT'	ГGА	GAT	TTT	GAA	GAA	AGT	TGA	GAA	AGG/	AAA	ATA	CAC.	ATT	TGA	TTT2	ACCG
266	Q	W	K	K	V	S	Е	S	A	K	D	L	Ι	R	K	М	L	Т	Y	V	Ρ	Т	Μ	R	I
901	CA	GTG	GAA	GAA	AGT.	AAG	TGA	ATC	TGC	AAA	GGA	TTT	GAT'	TAG.	AAA	GAT	GTT(GAC	GTA'	IGT	TCC	GAC	TAT	GAG	GATA
291	S	A	R	D	A	L	Е	Η	A	W	L	K	Е	A	Ε	S	A	A	D	A	I	D	V	Ρ	S
976	TC	TGC	GAG	AGA	CGC	ATT.	AGA	GCA	TGC	ATG	GCT	TAA	AGA	AGC.	AGA	AAG	IGC'	rgc:	[GA	IGC	GAT	TGA	TGT	ACC	GTCA
316	L Eb	E CaM	S	T A	I	L	Ν	I	R	Q	F	Q	G	т	Q Eb (K	L	A	A	A	A	L	L	Y	М
1051	CT	GGA	AAG	CAC	TAT	TCT	TAA	TAT	TAG	GCA	ATT	TCA	AGG	AAC	GCA	GAA	ATT	AGC/	AGC	AGC	GGC	GTT.	ATT	GTA'	TATG
341	G	S	К	L	Т	S	Ν	Е	Ε	Т	К	Е	L	N	K	I	F	К	K	Μ	D	K	N	G	D
1126	GG.	AAG	CAA	ATT	AAC	ATC.	AAA	TGA	AGA	AAC.	AAA	AGA	ATT	AAA	TAA	AATA	ATT	CAA	AAA	AAT	GGA	TAA	GAA	TGG2	AGAC
366	G	Q	L	D	Κ	Q	Е	L	Μ	Е	G	Y	V	Е	L	М	K	L	К	G	Ε	D	V	S	A
1201	GG.	ACA	ACT	TGA	TAA	GCA	AGA	GCT.	AAT	GGA	GGG	TTA	CGT	CGA	ATT	AAT	GAA	GCT.	FAA	AGG.	AGA	AGA	TGT	TTC'	IGCA
391	L	D	K	S	A	I	E	С	E	V	D	Q	V	L	D	A	V	D	F	D	К	N	G	F	I
1276	TT.	AGA	TAA	AAG	TGC	GAT	TGA	ATG	TGA	AGT	TGA	TCA	AGT	CCT	TGA	TGC	AGT	IGA:	TTT	TGA	TAA	AAA	CGG	CTT	TATC

416 EYSEFVTVAMDRKTLLSRKR LER EbCaM2_seq_S 1351 GAATATTCAGAATTTGTAACAGTAGCGATGGATAGGAAAACCCTTTTATCGAGAAAACGACTGGAAAGAGCCTTC 441 G M F D A D G S G K I S S S E L A T I F G V S E F 1426 GGAATGTTTGATGCCGATGGATCAGGAAAGATCTCCTCATCTGAATTAGCAACGATATTTGGAGTAAGCGAGTTT 466 D S E T W R R V L A E V D K N N D G E V D F D E F 491 Q Q M L L K L C G D P K A A A S A E R T M * Eb CDPK exp5+6 A 1576 CAGCAGATGCTATTGAAGCTTTGCGGTGATCCGAAAGCGGCAGCTTCAGCCGAAAGAACCATGTAAAAAGGATTA 1726 GCTAGCTAATTGGCTAACTAGCTAGTTAGCTGGTTAGCTGGTTAGCGAAAGGGAAGAGCAGATAGCT 1801 TATGAGAAGGAGAGGAGGAGGGAGAGAAAAGAAGAGAGAGAGGAGGCGACGCAACATAAATTTAGAAAGACGTTATAAAATA 1876 AAAATTTGGTAGGATGAGCTCCTACCGCTTATTTATTATGTGGGCAAGACAGCGGGGGGGTTCCGGCTTTGTCTCA 1951 ACAGGCCGGTTTAACAAAGGTGCTTCGGGCAGCAGAAAGACGTA<u>GCTAGCTA</u>GCCAGTTGGCCCGCTAGTTAGCT 2176 CTAGCTAGCTGGTCAGTCAGCTCATCCAGTAAGGGAGCAAACCAGCTGTACATCTGCTGGGTATTAAGTTAATTG 2326 AGCTAGCTAGCTGGCCAGCCGTGGGAGCAAGAGAATAGAGAGGGAAAGCTT

Abbildung 4.5: Vollständige cDNA vom *Eb*CDPK 1 und abgeleitete Aminosäurensequenz. Der Translationsstart und die Kozak-Sequenz befinden sich in Position 103-109 in der Nukleinsäurensequenz. Die funktionalen Domänen in der Aminosäurensequenz, eine katalytische Serin/Threonin-Kinase-Domäne in Position Y 44 – L 301, und Calcium-bindende Domänen E 352 – L 380, E 399 – K 428, R 435 – S 463, T 469 – L 497 (sind blau bzw. grün unterlegt). Zur Position der Domänen vgl. Abbildungen 3.6 und 3.7. Die Position der Primersequenzen sind mit Pfeilen markiert. In der 3'-UTR sind wiederholte Motive unterstrichen.

4.3.2 <u>Funktionale Domänen des Proteins</u>

Die Aminosäurensequenz wurde mit dem Computerprogram SMART im Hinblick auf Proteindomänen analysiert. Die Tabelle 4.1 und die Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen die Position der von SMART identifizierten einzelnen Domänen.

Domäne	Beginn, AS	Ende, AS	E-value
DisEMBL:HOTLOOPS: Region von "intrinsic	1	19	-
disorder"			
S_TKc: Serine/Threonine Proteinkinase,	44	301	1,73e-109
katalytische Domäne			
Efh: EF-hand, Calcium-bindendes Motiv	352	380	1,53e-06
Efh: EF-hand, Calcium-bindendes Motiv	399	428	1,90e-02
Efh: EF-hand, Calcium-bindendes Motiv	435	463	2,72e-03
Efh: EF-hand, Calcium-bindendes Motiv	469	497	1,50e-05
DisEMBL:REM 465: Region von "intrinsic	501	511	-
disorder"			

Tabelle 4.1: Vorhergesagte (SMART) Proteindomänen, Motive und Wiederholungen von *Eb*CDPK 1

Außerdem weist die Aminosäurensequenz des identifizierten Proteins vier für die CDPK-Familie charakteristische Domänen auf: (1) variables NH₂-terminales Segment; (2) kalytische Serin/Threonin-Kinasedomäne; (3) Verbindungsdomäne (Junction-Domäne); (4) Calmodulin-ähnliche Domäne (siehe Abbildung 4.6).



Abbildung 4.6: Lokalisation der funktionellen Domänen von *Eb*CDPK 1 ermittelt durch <u>Simple Modular Architecture Research Tool</u> (SMART). Dis: Region von "intrinsic disorder"; S_TKc: katalytische Domäne von Serin/Threonin-Proteinkinase; JD: Verbindungsdomäne; Efh: Calcium-bindendes Motiv.

Im variablen NH₂-terminalen Segment des Proteins wurde eine potenzielle Myristoylierungsstelle (Program: Myristoylator von ExPASy) ermittelt. Die NH₂-terminale Aminosäurensequenz (MGQQEST) entspricht nach potentieller Methioninentfernung der Konsensus-Sequenz für Myristoylierung von Prosite (Tabelle 4.2).

G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}						
Position	Aminosäuren	Legende				
1	G	NH ₂ -terminales Glycin, an den Myristilrest gebunden				
		wird				
2	{EDRKHPFYW}	Aminosäuren, die an der Position 2 nicht zulässig sind				
3-4	X(2)	zwei bieliebige Aminosäuren				
5	[STAGCN]	Aminosäuren, die an der Position 5 erwünscht sind				
6	{ P }	Prolin, an der Position 6 ist nicht erwünscht				

Tabelle 4.2: Darstellung einer Konsensussequenz für die potenzielle Myristoylierung(Bologna et al., 2004)

Myristoylierung ist eine reversible Proteinmodifikation mit einer 14-C saturierten Fettsäure – Myristylat. In Abbildung 4.7 wird die NH₂-terminale Sequenz von *Eb*CDPK 1 im Vergleich mit *T. gondii*-CDPK 1 und *P. falciparum*-CDPK 1 und *Oryza sativa*-CPK 2 dargestellt. Die beiden letzteren werden nachgewiesenermaßen am NH₂-terminalen Ende mit Myristylat (Acylierung von Glycin) und Palmitat (Acylierung von Cystein) konjugiert. Im Vergleich fällt in den Sequenzen von *Eb*CDPK 1 und *T. gondii*-CDPK 1 das Fehlen von Cysteinen am NH₂-terminalen Ende auf. Dies schließt die Palmitin-Modifation von *Eb*CDPK 1 und *Tg*CDPK 1 aus, denn Palmitylat wird an die Cysteine konjugiert, die in der Nähe des myristoylierten Glycins liegen.

<i>Eb</i> CDPK1	MG QQE S TLPAEP <mark>R</mark> P <mark>K</mark> QPAGS <mark>K</mark> VD <mark>K</mark> LAATPGVFVQHSTAAFS
TgCDPK1	$\underline{\textbf{MG}} \texttt{QQE} \underline{\textbf{s}} \texttt{TLGGAAGEP} \underline{\textbf{R}} \texttt{S} \underline{\textbf{R}} \texttt{G} \underline{\textbf{H}} \texttt{AAGTSGGPGDHLHATPGMFVQ}$
<i>Pf</i> CDPK1	MGC SQ S SNVKDF <mark>K</mark> TRRSKFTNGNNYGKSGNNKNSEDLAINP
OsCDPK2	MG S C C S RATSPDSG R GGANGYGYSHQTKPAQTTPSYNHPQP

Abbildung 4.7: Multiples Alignment von NH₂-terminalen Sequenzen von *Eb*CDPK 1, *T. gondii* CDPK 1 (*Tg*CDPK 1; AAG53993), *P. falciparum* CDPK 1 (*Pf*CDPK 1; P62343) und *Oryza sativa* CDPK 2 (*Os*CDPK 2; P53683) zum Vergleich mit dem Konsensusmotiv und Darstellung von zu acylierenden Aminosäuren. Fett und unterstrichen sind die Aminosäuren aus dem Myrostylierung-Konsusmotiv markiert, basischen Aminosäuren sind blau unterlegt, die Cysteine, die mit Palmitin acyliert werden, sind rot unterlegt.

Die katalytische Kinasedomäne liegt NH₂-terminal und befindet sich in Position Y 44-L 301 auf der Polypeptidkette (Abbildung 4.5). In der katalytischen Domäne des Proteins finden sich alle charakteristischen Merkmale einer Kinase – 11 Subdomänen, zwischen anderen Kinasen konservierte Bereiche und invarianten Aminosäuren an den definierten Positionen (Abbildung 4.8).

EbCDPK1 TgCDPK1 PfCDPK4 AtCDPK1_AK1 MmCaM-Kin2 MmCDK1	YKGQRVLGKGSFGEVILCKDKVTGEEYAVKVISKRQVKQKTDKELLLKEVELLKKLD-HP YKGQRVLGKGSFGEVILCKDKITGQECAVKVISKRQVKQKTDKESLLREVQLLKQLD-HP YKGIKILGKGSFGEVILSRDKHTGHEYAIKVISKKHVKRKTDKESLLREVELLKMLD-HI YSLGRKLGQGQFGTTFLCVEKTTGKEFACKSIAKRKLLTDEDVEDVRREIQIMHHLAGHP YHLYEDIGKGAFSVVRCVKLCTGHEYASKIINTKKLSAR-DHHKLEREARICRLLK-HS YIKIEKIGEGTYGVVYKGRHRVTGQIVAMKKIR-LESEEEGVPSTAIREISLLKELR-HP * . : *:*: **. * * *	59 59 60 58 58
EbCDPK1 TgCDPK1 PfCDPK4 AtCDPK1_AK1 MmCaM-Kin2 MmCDK1	NIMKLYEFFEDKGYFYLVTEVYTGGELFDEIISRKRFSEVDAARIIRQVLSGITYMHR NIMKLYEFFEDKGYFYLVGEVYTGGELFDEIISRKRFSEVDAARIIRQVLSGITYMHK NIMKLYEFFEDNNYYYLVSDVYTGGELFDEIISRKRFYEIDAARIIKQILSGITYMHK NVISIKGAYEDVVAVHLVMECCAGGELFDEIISRKRFYEIDAARIIKQILSGITYMHK NVISIKGAYEDVVAVHLVMECCAGGELFDRIIQRGHYTERKAAELTRTIVGVVEACHS NIVRLHDSISEEGFHYLVFDLVTGGELFEDIVAREYYSEADASHCIQQILEAVLHCHQ NIVSLQDVLMQDSRLYLIFEFLSMDLKKYLDSIPPGQFMDSSLVKSYLHQILQGIVFCHS *::::::::::::::::::::::::::::::::::::	117 117 117 118 116 118
EbCDPK1 TgCDPK1 PfCDPK4 AtCDPK1_AK1 MmCaM-Kin2 MmCDK1	NRIVHRDLKPENLLLESKRK-DANIRIIDFGLSTHFEATK-KMKDKIGTAYYIAPEVLHG NKIVHRDLKPENLLLESKSK-DANIRIIDFGLSTHFEASK-KMKDKIGTAYYIAPEVLHG NNVHRDLKPENILLETKNKEDMIKIIDFGLSTHFEYSK-KMKDKIGTAYYIAPDVLHG LGVMHRDLKPENFLFVSKHE-DSLLKTIDFGLSMFFKPDD-VFTDVVGSPYVAPEVLRK MGVVHRDLKPENLLASKCK-GAAVKLADFGLAIEVQGDQQAWFGFAGTPGYLSPEVLRK RRVLHRDLKPQNLLIDDKGTIKLADFGLARAFGIPIRVYTHEVVTLWYRSPEVLLG ::*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:	175 175 176 176 175 174
EbCDPK1 TgCDPK1 PfCDPK4 AtCDPK1_AK1 MmCaM-Kin2 MmCDK1	TYDEKCDVWSTGVILYILLSGCPPFNGANEFEILKKVEKGKY TYDEKCDVWSTGVILYILLSGCPPFNGANEYDILKKVEKGKY TYDEKCDIWSCGVILYILLSGCPPFNGSNEYDILKKVEAGK	217 217 218 218 218 234
EbCDPK1 TgCDPK1 PfCDPK4 AtCDPK1_AK1 MmCaM-Kin2 MmCDK1	TFDLPQWKKVSESAKDLIRKMLTYVPTMRISARDALEHAWL 258 TFELPQWKKVSESAKDLIRKMLTYVPSMRISARDALDHEWI 258 TFDLPQFKKISDKAKDLIKKMLMYTSAVRISARDALEHEWI 259 DFSSDPWPSISESAKDLVRKMLVRDPKKRLTAHQVLCHPWV 259 DFPSPEWDTVTPEAKNLINQMLTINPAKRITAHEALKHPWV 259 KNTFPKWKPGSLASHVKNLDENGLDLLSKMLVYDPAKRISGKMALKHPYF 284 : .: .: :*: :** . *::: .* * :.	

Abbildung 4.8: Multiples Alignment von katalytischen Ser/Thr-Kinasedomänen von *E. bovis* CDPK 1 (*Eb*CDPK 1), *T. gondii* CDPK 1 (*Tg*CDPK 1), *P. falciparum* CDPK 4 (*Pf*CDPK 4), *Arabidopsis thaliana* CDPK 1 Isophorm AK 1 (*At*CDPK 1_AK1), *Mus musculus* Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (*Mm*Cam-Kinase2; NP_031621) und *Mus musculus* Cyclin-abhängigen Proteinkinase 1 (*Mm*CDK 1; P11440). Die zwischen Kinasen konservierten Motive sind blau unterlegt, die invarianten Aminosäuren sind fett markiert.

Zwischen katalytischen Kinasedomäne und Calmodulin-ähnlicher Domäne findet sich eine Verbindungdomäne, welche wegen ihrer Funktion bei orthologen Proteinen auch als autoinhibitorische Domäne bezeichnet wird (Christodoulou et al., 2004). Weiter in Richtung C-Terminus treten nacheinander 4 Calcium-bindende Domänen (EF-Hände) auf. Alle vier Domänen bestehen aus 29 Aminosäuren langen Polypeptidketten und besitzen an bestimmten Stellen konservierte Aminosäuren (Abbildung 4.9): Asparaginsäure (D^{10} in *Eb*CDPK 1-Sequenz auf Positionen: 386; 433; 469; 503), Asparaginsäure oder Asparagin ($[DN]^{12}$ in *Eb*CDPK 1-Sequenz auf Positionen: 388; 435; 471; 505), Glycin (G^{15} in *Eb*CDPK 1-Sequenz auf Positionen: 391; 438; 474; 508) und Glutaminsäure (E^{21} in *Eb*CDPK 1-Sequenz auf Positionen: 397; 444; 480; 514).

<i>Eb</i> CDPK1_EFh1	1	ELNKIFKKMDKNGDGQLDKQELMEGYVEL
<i>Eb</i> CDPK1_EFh2	1	EVDQVLDAVDFDKNGFIEYSEFVTVAMDR
<i>Eb</i> CDPK1_EFH3	1	RLERAFGMFDADGSGKISSSELATIFGVS
<i>Eb</i> CDPK1_EFh4	1	TWRRVLAEVDKNNDGEVDFDEFQQMLLKL
<i>Tg</i> CDPK1_EFh1	1	ELTAIFHKMDKNGDGQLDRAELIEGYKEL
TgCDPK1_EFh2	1	<u>E</u> VDQVLDAVDFDKNGYIEYSEFVTVAMDR
TgCDPK1_EFh3	1	RLERAFRMFDSDNSGKISSTELATIFGVS
TgCDPK1_EFh4	1	TWKSVLSEVDKNNDGEVDFDEFQQMLLKL
AtCDPK_EFh1	1	GLKEMENMIDADKSGQITFEELKAGLKRV
AtCDPK_EFh2	1	EILDLMQAADVDNSGTIDYKEFIAATLHL
AtCDPK_EFh3	1	HLFAAFTYFDKDGSGYITPDELQQACEEF
AtCDPK_EFh4	1	RIEELMRDVDQDNDGRIDYNEFVAMMQKG
<i>Mm</i> CaM_EFh1	1	EFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSL
<i>Mm</i> CaM_EFh2	1	ELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARK
<i>Mm</i> CaM_EFh3	1	EIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNL
<i>Mm</i> CaM_EFh4	1	EVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK

Abbildung 4.9: Multiples Alignment von 4 Calciumbindungsdomänen aus *Eb*CDPK 1 (*Eb*CDPK 1_EFh1 bis 4), *T. gondii* CDPK 1 (*Tg*CDPK 1_EFh1 bis 4), *Arabidopsis. thaliana* CDPK AK1 (*At*CDPK_Efh1 bis 4) und *M. musculus* Calmodulin 1 (MmCaM_Efh1 bis 4). Die identischen Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt.

Über das Programm "Intrinsic Protein Disorder Prediction 1.4" wurden am N-Terminus (Aminosäuren in der Sequenz 1 – 19) und C-Terminus (Aminosäuren in der Sequenz 501 – 511) nicht strukturierten Bereiche ("disordered" / "unstructured regions") vorhergesagt. Um zu überprüfen, ob sich in diesen Bereichen Aminosäurensequenzen befinden, die als Liganden für Interaktionspartner dienen können, wurde die Aminosäurensequenz über ELM (Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins) geprüft. Im NH₂-

terminalen Bereich (Aminosäuren in der Sequenz 1-19) wurden vom Programm Stellen bestimmt, die mit der hohen Wahrscheinlichkeit als Liganden für Domänen der Interaktionspartner fungieren können.

Ein aus 4 Aminosäuren-bestehendes Peptid T L P A (Aminosäuren in der Sequenz 7-10) wurde als ein Forkhead-assoziierte-Domäne-Interaktionsmotiv 1 (LIG_FHA_1) ermittelt. Dieser Ligand benötigt für die Interaktion mit FHA einen phosphoryliertes Threonin, welcher bei der Autophosphorylierung von *Eb*CDPK 1 entstehen kann. Forkhead-assoziierte-Domäne (FHA) ist ein aus 120 – 140 Aminosäuren bestehendes Proteinmodul, welches in Proteinen aus eukaryontischen und prokaryontischen Zellen vorkommt. Diese Domäne nimmt an der Protein-Protein-Interaktion teil und ist direkt in mehrere zelluläre Ereignisse, wie Signaltransduktion, Zellproliferation und DNA-Reparatur involviert (Übersicht in Durocher und Jackson, 2002).

Zwei weitere Motive (Aminosäuren Nr. 6-12: STLPAEP und 11-17: EPRPKQP) wurden als potentieller SH 3-Ligand 3 (Srk Homology 3-Domäne) erkannt. SH 3 ist eine kleine Proteindomäne aus 50 – 60 Aminosäuren. SH 3-Domänen kommen ebenfalls bei Proteinen vor, welche unter anderem an der Signaltransduktion beteiligt sind. Durch ELM wurden auch weitere Liganden außerhalb der globulären Kinase- und Calmodulin-homologen Domänen ermittelt, welche aber nicht im Intrinsic Disorder-Bereich liegen.

4.3.3 <u>Homologievergleiche.</u>

Mit der abgeleiteten Aminosäurensequenz von *Eb*CDPK 1 wurden Homologievergleiche durchgeführt. Als Vergleichssequenzen wurden Proteinkinasen mit Calmodulin-ähnlicher Domäne aus den Coccidea *Eimeria tenella*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium hominis* sowie aus *Plasmodium falciparum* und aus einer Pflanze *Arabidopsis thaliana* herangezogen. Die prozentualen Anteile identischer und ähnlicher Aminosäuren zwischen *Eb*CDPK 1 und den verglichenen Molekülen sind in der Tabelle 4.2 zusammengefaßt.

Das multiple Aligment der homologen CDPK-Sequenzen von *E. tenella*, *E. bovis*, *T. gondii*, *P. falciparum*, *C. hominis* ist in der Abbildung 4.10 dargestellt.

EbCDPK1 EtCDPK TgCDPK1 PfCDPK4 ChCDPK1	1 1 1 1	FVQHSTAAFSDRYKGQRVLGKGSFGEVILCKDKVTGEEYAVKVISKRQVK FVQHSTAAFSDRYKGQRVLGKGSFGEVILCKDKVTGQEYAVKVISKRQVK FVQHSTAIFSDRYKGQRVLGKGSFGEVILCKDKITGQECAVKVISKRQVK FIQNSNVVFNEQYKGIKILGKGSFGEVILSRDKHTGHEYAIKVISKKHVK FITSKKGHLSEMYQRVKKLGSGAYGEVLLCRDKVTHVERAIKIIRKTSVS
EbCDPK1	51	QKTDKE <mark>L</mark> LLKEVELLK <mark>K</mark> LDHPNIMKLYEFFEDKGYFYLVTEVYTGGELFD
EtCDPK	51	QKTDKELLLKEVELLKKLDHPNIMKLYEFFEDKGYFYLVTEVYTGGELFD
<i>Tg</i> CDPK1	51	QKTDKESLLREVQLLKQLDHPNIMKLYEFFEDKGYFYLVGEVYTGGELFD
PfCDPK4	51	RKTDKESLLREVELLKMLDHINIMKLYEFFEDNNYYYLVSDVYTGGELFD
CHCDPKI	51	TSSNSK-LLEEVAVLKLLDHPNIMKLYDFFEDKRNYYLVMECYKGGELFD
<i>Eb</i> CDPK1	101	EIISRKRFSEVDAARIIRQVLSGITYMHRNRIVHRDLKPENLLLESK <mark>R</mark> K-
EtCDPK	101	EIISRKRFSEVDAARIIRQVLSGITYMHKNKIVHRDLKPENLLLE <mark>N</mark> K <mark>R</mark> K-
<i>Tg</i> CDPK1	101	EIISRKRFSEVDAARIIRQVLSGITYMHKNKIVHRDLKPENLLLESK <mark>S</mark> K-
<i>Pf</i> CDPK4	101	EIISRKRFYEIDAARIIKQILSGITYMHKNNVVHRDLKPENILLETKNKE
<i>Ch</i> CDPK1	100	EIIHRMKFNEVDAAVIIKQVLSGVTYLHKHNIVHRDLKPENLLLESKEK-
<i>Eb</i> CDPK1	150	DANIRIIDFGLSTHFE <mark>A</mark> TKKMKDKIGTAYYIAPEVLHGTYDEKCDVWSTG
EtCDPK	150	DANIRIIDFGLSTHFE <mark>S</mark> TKKMKDKIGTAYYIAPEVLHGTYDEKCDVWSTG
<i>Tg</i> CDPK1	150	DANIRIIDFGLSTHFE <mark>A</mark> SKKMKDKIGTAYYIAPEVLHGTYDEKCDVWSTG
<i>Pf</i> CDPK4	151	D <mark>MI</mark> IKIIDFGLSTHFE <mark>Y</mark> SKKMKDKIGTAYYIAPDVLHGTYDEKCDIWS <mark>C</mark> G
<i>Ch</i> CDPK1	149	DALIKIVDFGLSAVFENQKKMKERLGTAYYIAPEVLRKKYDEKCDVWSIG
<i>Eb</i> CDPK1	200	VILYILLSGCPPFNGANE <mark>FE</mark> ILKKVEKGKYTFDLPQWKKVSE <mark>S</mark> AKDLIRK
<i>Et</i> CDPK	200	VILYILLSGCPPFNGANEFDILKKVEKGKFTFDLPQWKKVSE <mark>P</mark> AKDLIRK
<i>Tg</i> CDPK1	200	VILYILLSGCPPFNGANEYDILKKVEKGKYTFELPQWKKVSE <mark>S</mark> AKDLIRK
PfCDPK4	201	VILYILLSGCPPFNGSNEYDILKKVE <mark>A</mark> GKYTFDLPQFKKISDKAKDLIKK
<i>Ch</i> CDPK1	199	VILFILLAGYPPFGGQTDQEILRKVEKGKYTFDSPEWKNVSEGAKDLIKQ
<i>Eb</i> CDPK1	250	MLTYVPTMRISARDALEH <mark>A</mark> WLKEAESAADA-IDVPSLESTILNIRQFQGT
EtCDPK	250	MLAYVPTMRISARDALEHEWLKTTDAATDS-IDVPSLESTILNIRQFQGT
<i>Tg</i> CDPK1	250	MLTYVPSMRISARDALDHEWIQTYTKEQIS-VDVPSLDNAILNIRQFQGT
PfCDPK4	251	MLMYTSAVRISARDALEHEWIKMMTSKDNLNIDIPSLELSIANIROFQST
<i>Ch</i> CDPK1	249	MLQFDSQRRISAQQALEHPWIKEMCSKKESGIELPSLANALENMRKFQNS
<i>Eb</i> CDPK1	299	QKLA <mark>AAALLYMGSKLTSNEETKELN</mark> KIFKKMDKNGDGQLDKQELMEGY <mark>V</mark> E
EtCDPK	299	QKLA <mark>AAALLYMGSKLTTNEET<mark>VELN</mark>KIFQRMDKNGDGQLDKQELMEGY</mark> VE
TgCDPK1	299	QKLAQAALLYMGSKLTSQDETKELT <mark>AIFHKMDKNGDGQLDR</mark> AELIEGY <mark>K</mark> E
PfCDPK4	301	QKLAQAALLYMGSKLTTIDETKELTKIFKKMDKNGDGQLDRNELIIGY <mark>K</mark> E
<i>Ch</i> CDPK1	299	QKLAQAALLYMASKLTSQEETKELTDIFRHIDKNGDGQLDRQELIDGYS-
<i>Eb</i> CDPK1	349	LMKLKGEDVS <mark>A</mark> LD <mark>K</mark> SAIE <mark>C</mark> EVDQVLDAVDFDKNGFIEYSEFVTVAMDRKT
EtCDPK	349	LMKLKGEDVSALDQSAIEFEVEQVLDAVAFDKNGFIEYSEFVTVAMDRKT
<i>Tg</i> CDPK1	349	LMRMKGQDASMLDASAVEHEVDQVLDAVDFDKNGYIEYSEFVTVAMDRKT
PfCDPK4	351	LLKLKGEDTSDLDNAAIEYEVDQILNSIDLDQNGYIEYSEFLTVSIDRKL
<i>Ch</i> CDPK1	348	KLSGEEVAVFDLPQIESEVDTILGAADFDRNGYIDYSEFVTVAMDRKS

<i>Eb</i> CDPK1	399	LLSR <mark>K</mark> RLERAF <mark>G</mark> MFD <mark>A</mark> DGSGKISSSELATIFGVSEFDSETWRRVL <mark>A</mark> EVDK
<i>Et</i> CDPK	399	LLSR <mark>Q</mark> RLERAF <mark>G</mark> MFD <mark>A</mark> DGSGKISSSELATIFGVSEVDSETWRRVL <mark>A</mark> EVDR
<i>Tg</i> CDPK1	399	LLSRERLERAFRMFDSDNSGKISSTELATIFGVSDVDSETWKSVLSEVDK
<i>Pf</i> CDPK4	401	LLSTERLEKAFKLFDKDGSGKISANELAQLFGLSDVSSECWKTVLKEVDQ
<i>Ch</i> CDPK1	396	LLSKDKLESAFQKFDQDGNGKISVDELASVFGLDHLESKTWKEMISGIDS
<i>Eb</i> CDPK1	449	NNDGEVDFD <mark>EFQ</mark> QMLLKLCGDPKAAASAERTM
<i>Et</i> CDPK	449	NNDGEVDFEEF <mark>RQMLLKLCG</mark> DTAA
TgCDPK1	449	NNDGEVDFDEF <mark>Q</mark> QMLLKLCGN
<i>Pf</i> CDPK4	451	NNDGEIDF <mark>KEF</mark> RD <mark>MLVKLC</mark> NY
<i>Ch</i> CDPK1	446	NNDGDVDFEEFCKMIQKLCSNNEPQLKKN

Abbildung 4.10: Multiples Alignment von *Eb*CDPK 1 und den Calmodulin-Domäne Proteinkinasen von *Eimeria tenella (Et*CDPK), *Toxoplasma gondii (Tg*CDPK 1), und *Plasmodium falciparum (Pf*CDPK 4), und *Cryptosporidium hominis (Ch*CDPK 1). Die identischen Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt.

 Tabelle 4.2: Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren zwischen EbCDPK 1 und

 CDPK's anderer Apicomplexa und aus Arabidopsis thaliana

Vergleichssequenz aus:	Zugangsnr.	Identische Aminosäuren	Identische + ähnliche Aminosäuren
<i>Eimeria tenella</i> CDPK	AAT97980	93 %	97 %
Toxoplasma gondii CDPK 1	AAG53993	83 %	90 %
Plasmodium falciparum CDPK 4	Q8IBS5	72 %	87 %
Arabidopsis	Q06850	40 %	56 %
thaliana CDPK AK1			

Wie aus der Abbildung 4.10 und der Tabelle 4.2 zu entnehmen ist, sind Proteinkinasen mit Calmodulin-ähnlicher Domäne aus der Subklasse A bei Apicomplexa sehr konservierte Moleküle, so daß man prinzipiell aus der ähnlichen Struktur auch auf eine ähnliche Funktion dieser Molekülen schließen kann. Ein Bereich in der Sequenz zwischen den Aminosäuren 271-281 ist weniger konserviert und befindet sich genau hinter der Kinasedomäne.



Abbildung 4.11: Phylogenetischer Baum von ausgewählten heterologen Serin/Threonin Proteinkinasen mit Calmodulin-ähnlicher Domäne von Apicomplexa (Subgruppe A rot, Subgruppe B orange und Subgruppe C violett unterlegt), Pflanzen (blau unterlegt), Grünalgen (grün unterlegt) und von einer Calcium/Calmodulin abhängigen Proteinkinase II (gelb unterlegt). EbCDPK 1, E. bovis CDPK; EtCDPK und EtCDPK 2, E. tenella CDPK (ABA60894) E. tenella CDPK Isoform 2 (ABA60893); PfCDPK 1 bis 4, P. falciparum CDPK Isoformen 1 bis 4 (CAA47704, NP 703768, Q9NJU9, Q8IBS5); PyyCDPK 1 und 3 Plasmodium yoelii yoelii CDPK Isoformen 1 und 3 (Q7RAH3, Q7RAV5); TgCDPK 1 und 2, T. gondii CDPK Isoformen 1 und 2 (AAG53993, AAG53994); ChCDPK 1, 2 und Chro. 40377, Cryptosporidium hominis CDPK Isoformen 1, 2 und hypotetisches Protein Chro. 40377 (EAL36787, EAL38263, EAL38411); CpCDPK 1-3, C. parvum CDPK Isoformen 1 bis 3 (AAS47705, AAS47706, AAS47707); OsCDPK, Oryza sativa CDPK (XP 473487.1); OsCDPK 2, Oryza sativa CDPK 2

(P53683); *CeCPK*, *Chlamydomonas eugametos* CDPK; *Dt*CPK, *Dunaliella tertiolecta* CDPK; *Ta*CDPK, *Theileria annulata* CDPK, putativ (CAI74586, CAI73022); *Tp*CDPK, *Theileria parva* CDPK, putativ; CaM-Kinase II Maus, *Mus musculus* Calcium/calmodulin abhängige Proteinkianse II, β (NP_031621.2).

In der Abbildung 4.11 ist die Verwandtschaft zwischen einigen Isoformen von den CDPK's von Apicomplexa, Planzen und Grünalgen dargestellt. Als "Outgroup Kinase" wurde die Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaM II) aus der Maus genommen. Bei dieser Analyse wurde festgestellt, dass die protozoären CDPK's im Vergleich zu metazoären CDPK's und CaM-Kinase II mehr Verwandschaft aufweisen. Aus der Abbildung geht auch hervor, daß bei CDPK's aus Apicomplexa die weitere Aufteilung anhand der Homologie von Isoformen in drei weitere Subgruppen A, B und C möglich ist. Die *Eb*CDPK 1 findet sich auf einem Zweig mit heterologen Molekülen: *Pf*CDPK 1 und *Pf*CDPK 4 aus *P. falciparum, Tg*CDPK 1 aus *T. gondii, Ch*CDPK 1 aus *C. hominis, Et*CDPK aus *Eimeria tenella.* Diese CDPK's scheinen enger miteinander verwandt als die CDPK's aus der Subgruppe B. Bei den *Pf*CDPK 1, *Pf*CDPK 4 sowie *Tg*CDPK 1 gibt es Erkenntnisse über die Funktion (siehe Disskussion).

4.4 Expression der Teilsequenzen von *Eb*CDPK 1 in *Escherichia coli*

4.4.1 <u>Expressionskonstrukte</u>

Zur Herstellung eines Antiserums gegen *Eb*CDPK 1 für die weitere Charakterisierung des Moleküls wurden bestimmte Teilsequenzen des abgeleiteten Proteins in *E. coli* exprimiert. Die gewählten Abschnitte des Moleküls sind in Abbildung 4.12 dargestellt. Das zu exprimierende Fragment 1 (P 17 – S 343) enthielt am N-terminalen Ende 3 Aminosäuren aus dem Bereich "Intrinsic Disorder" und die Kinasedomäne. Dieser Bereich wurde ausgewählt, um ein Antiserum zu erhalten, das neben der Kinasedomäne der *Eb*CDPK 1 möglicherweise auch andere Proteine mit Serin/Threonin katalytischen Kinasedomänen erkennt. Das Fragment 2 (P 213 – A 530) beinhaltete eine Kinasedomäneteilsequenz, die Interdomäne und das Calmodulinhomolog mit 4 Calcium-bindenden Domänen. Das Fragment 3 (G 355 – A 530) war für ein Antiserum gegen ein Peptid mit den 4 Calcium-bindenden Domänen konzipiert. Positionen und Ausrichtung der jeweiligen Primer für die Klonierung sind aus der Abbildung 3.6 zu entnehmen. Die Expressionsfragment-

kodierende cDNA wurde mittels PCR amplifiziert und nach Restriktionsspaltung von Ankersequenzen in die pQE-Vektoren kloniert.



Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der *Eb*CDPK 1 mit Fragmenten 1, 2 und 3, die für Proteinexpression ausgewählt wurden.

4.4.2 <u>Proteinexpression und die Aufreinigung von 6× His-Fusionsproteinen</u>

Der Versuch, *Eb*CDPK 1-Fragment 1 unter standardmäßigen Bedingungen (Induktion mit 1 mM IPTG bei $OD_{600} = 0,6$) zu exprimieren, war erfolglos. Als ein Grund wurde die unterschiedliche Codonnutzung bei *Eimeria bovis* und *Escherichia coli* vermutet. Die Codon-Nutzung wurde mittels des Computerprogramms "Graphical Codon Usage Analyser" analysiert. Dabei zeigte sich zwischen *E. coli* und *Eb*CDPK 1 eine mittlere Differenz von 15,39 %. In der Tabelle 4.3 sind die Codons dargestellt, in deren Nutzung die deutlichsten Unterschiede auftraten.

Codon	Aminosöura	Codon-Nutzung, %				
Couon	Ammosaure	EbCDPK 1	E. coli			
AGA	Arginin	33	4			
AGG	Arginin	25	2			
GGA	Glycin	56	11			
TTA	Leucin	54	13			
ATA	Isoleucin	22	7			

Tabelle 4.3: Vergleich der Codonnutzung in *Eb*CDPK 1 und *E. coli* (Stamm K 12)

Zur Erhöhung des Expressionslevels wurde der Expressionsstamm M 15 [pREP4] mit einem zusätzlichen pACYC-basierten Plasmid (Codon+) transformiert, welches die Kopien von tRNA-Genen *argU* (Erkennungskodon AGR, R-Purine: G oder A), *ileY* (Erkennungskodon AUA) und *leuW* (Erkennungskodon CUR, R-Purine: G oder A) trägt. Diese Substituierung von *E. coli* führte zu Steigerung der Proteinexpression.

4.4.2.1 Fragment 1 (*Eb*CDPK 1-Fragment 1)

Bei der Expression von *Eb*CDPK 1-Fragment 1 (36,19 kDa) stellte sich heraus, daß das Expressionsprodukt auf die Zellen toxisch wirkte, d. h. es hemmte das bakterielle Wachstum nach Induktion. Allerdings liess sich das rekombinante Protein in der SDS-PAGE nachweisen (Abbildung 4.13). Gleichzeitig wurde auch die Anwesenheit des tRNAs-Gene-substituierenden Plasmids kontrolliert, wobei das Produkt des Resistenzgens, die Chloramphenicol-Acetyltransferase, nachgewiesen wurde.



Abbildung 4.13: Expression von *Eb*CDPK 1-Fragment 1 in *E. coli* M 15 [pREP4, Codon+]. Die Bakterienextrakte wurden in der SDS-PAGE auf einem 10 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie brilliant blue gefärbt. M: Marker, kDa; 1: Extrakt aus nicht induzierten Bakterien; 2: Extrakt mit IPTG-induzierten Bakterien nach einer Inkubationszeit von 2 h; 3: Extrakt aus IPTG-induzierten Bakterien nach einer Inkubationszeit von 4 h; 4: Extrakt aus *E coli* M 15 [pREP 4] ohne Transformation mit "Codon+" (Kontrolle); 5: Extrakt aus *E coli* M 15 [pREP 4] nach der Transformation mit

"Codon+". Die Pfleile zeigen: bei 2 und 3 die Bande des rekombinanten Proteins, bei 5 die Chloramphenicol-Acetyltransferase des Resistenzgenes von Codon+.

Das Expressionsniveau lag bei 2,4 mg Protein aus 1 l Kultur bei 2stündiger Induktion. Im Fragment 1 war die letzte Aminosäure am C-terminalen Ende dem T 344 in der *Eb*CDPK 1-Sequenz. Das heißt das Peptid, das die autoinhibitorische Rolle spielen könnte, wurde nur teilweise exprimiert und die Kinase konnte theoretisch bei der Expression in Bakterien nicht inhibiert werden

Zur Immunisierung wurde das Protein *Eb*CDPK 1-Fragment 1 aus *E. coli* mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt (Abbildung 4.14, vgl. Kapitel 3.9.2). Um ein kontaminationsfreies Protein zu bekommen, wurden die einzelnen Eluate mittels SDS-PAGE (Miniprep-Cell) nach der Molekülgröße fraktioniert (Abbildung 4.15 vgl. Kapitel 3.9.3).



Abbildung 4.14: Aufreinigung von His-Tag-Fusionsprotein – *Eb*CDPK 1-Fragment1 mittels Affinitätschromatografie. Die eluierten Fraktionen wurden in der SDS-PAGE auf einem 12 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie brilliant blue gefärbt. M: Marker, kDa; 1: Extrakt aus nicht induzierten *E. coli*; 2-8: Säuleneluate, die ein His-tag-Fusionsprotein enthalten (Pfeile).



Abbildung 4.15: Aufreinigung von *Eb*CDPK 1-Fragment1 mittels SDS-PAGE in Miniprep-Cell. Fraktioniertes Eluat wurde in der SDS-PAGE auf einem 12 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie brilliant blue gefärbt. M: Marker, kDa; eluierte Fraktionen. Der Pfeil zeigt das aufgereinigte *Eb*CDPK 1-Fragment 1 in einzelnen Fraktionen.

Somit wurden die geringsten Kontaminationen von *E. coli*-Proteinen und die Abbruchbanden (Produkte des proteolytischen Abbaus des exprimierten Proteins, die an ihrem N-terminalen Ende noch ein His-tag trugen.) entfernt. Für die Immunisierung wurde Antigen aus kontaminationsfreien Fraktionen verwendet.

4.4.2.2 Expression von Fragment 2 (*Eb*CDPK 1-Fragment 2)

Das Fragment 2 (34,72 kDa) wurde im etablierten Expressions- und Reinigungssystem produziert (Abbildungen 4.16 und 4.17). Aus 1 l Kultur wurden nach 2stündiger Induktion etwa 3 mg rekombinantes Protein gewonnen



Abbildung 4.16: Aufreinigung von His-Tag-Fusionsprotein – *Eb*CDPK 1-Fragment 2 mittels Affinitätschromatografie. Die eluierten Fraktionen wurden in SDS-PAGE auf einem 13 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie brilliant blue gefärbt. M: Marker, kDa; 1: Extrakt aus nicht induzierten *E. coli*; 2 – 10: Säuleneluate, die ein His-tag-Fusionsprotein enthalten (Pfeile).



Abbildung 4.17: Aufreinigung von *Eb*CDPK 1-Fragment 2 mittels SDS-PAGE in Miniprep-Cell. Fraktionisiertes Eluat wurde in SDS-PAGE auf einem 13 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie brilliant blue gefärbt. M: Marker, kDa; aufgereinigte Fraktionen: einzellne Fraktionen vom Eluat. Der Pfeil zeigt das aufgereinigte *Eb*CDPK 1-Fragment 2 in einzelnen Fraktionen.

4.4.2.3 Expression von Fragment 3 (*Eb*CDPK 1-Fragment 3)

Auch *Eb*CDPK 1-Fragment 3 (21,45 kDa) wurde in dem oben ausgeführten System hergestellt. Die Ausbeute war gegenüber den Fragmenten 1 und 2 deutlich höher: etwa 15 mg Fusionsprotein konnten aus einer 1 l-Kultur gewonnen werden (Abbildung 4.18). Bei der Auftrennung des rekombinanten Proteins in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen spaltete sich das nach der Ableitung 21,45 kDa große Molekül in drei Fraktionen, die sich im Gel mit Banden bei 19, 22 und 24 kDa darstellt (Abbildung 4.19).



Abbildung 4.18: Aufreinigung von His-Tag-Fusionsprotein – *Eb*CDPK 1-Fragment 3 mittels Affinitätschromatografie. Die eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf einem 13 %igen PolyAcrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie brilliant blue gefärbt. M: Marker, kDa; Fraktionen: Säuleneluate, die ein His-tag-Fusionsprotein enthalten (Pfeile).



Abbildung 4.19: Laufverhalten von *Eb***CDPK 1-Fragment 3 in der SDS-PAGE.** M: Marker, kDa; Auftrennung des Fusionsproteins (21,45 kDa) in drei Banden bei 24, 22 und 19 kDa.

4.5 Antiseren und Reaktivität der Antikörper gegen rekombinante *Eb*CDPK 1-Peptide

Alle 3 kommerziell hergestellten polyklonalen Antikörper aus Kaninchen reagierten stark mit den rekombinanten Proteinen in der Verdünnung 1:100.000 im Immunoblot. In der gleichen Verdünnungen wurden die Antisera gegen Parasitenextrakte im Immunoblot überprüft.

4.5.1 <u>Antiserum gegen Fragment 1 (α*Eb*CDPK 1-Fragment 1)</u>

α*Eb*CDPK 1-Fragment 1 reagierte weder in Extrakten von Sporozoiten, Merozoiten I noch von infizierten bovinen fetalen Gastrointestinalzellen (BFGZ) mit einem Protein der erwarteten Masse von 57,8 kDa, erfasste aber unbekannte Proteine bei Sporozoiten von etwa 22, 36, 39 und 45 kDa, bei Merozoiten und infizierten Zellen von 18, 36 und 39 kDa (Abbildung 3.20). Bei infizierten Zellen und auch bei nicht infizierten Kontrollzellen zeigten sich darüberhinaus Reaktionen im Bereich von 80 und 100 kDa.



Abbildung 4.20: Reaktion des Antiserums gegen das rekombinante Fragment 1 von *Eb*CDPK 1 mit Extrakten von *E.bovis*-Sporozoiten (1), -Merozoiten I (2), infizierten (15 Tage p. i.; 3) und, nicht infizierten Zellen (BFGZ) (4). Trenngel: 10 %; α*Eb*CDPK 1-Fragment 1-Verdünnung 1:100 000; Konjugatverdünnung (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege) 1:100.000; Nachweis durch Chemiluminiszenz-Substrat (ECL+): Exposition 10 min.

4.5.2 <u>Antiserum gegen Fragment 2 (α*Eb*CDPK 1-Fragment 2)</u>

Das Antiserum gegen Fragment 2 erkennt ein Antigen im Bereich von 55-57 kDa (Abbildung 3.21). Das Antigen war nachweisbar in Sporozoiten, Merozoiten I und infizierten Zellen (15 Tage p.i.), fehlte jedoch in nicht infizierten Zellen.

Auf kürzer exponierten Blots zeigte sich, daß sich bei Sporozoiten die markante 58 kDa-Bande aus zwei Banden von 57 kDa und 59 kDa zusammensetzte. Die untere Bande fand sich in der gleichen Position wie die Reaktionsbanden in Merozoiten- und infizierten Zellextrakten (aus technischen Gründen nicht abgebildet).



Abbildung 4.21: Reaktion des Antiserums gegen das rekombinante Fragment 2 von *Eb*CDPK 1 mit Extrakten von *E.bovis*-Sporozoiten (1), -Merozoiten I (2), infizierten und (15 Tage p. i.; 3) und nicht infizierten Zellen (BFGZ) (4) M: Marker, kDa. Trenngel: 10 %; α*Eb*CDPK 1-Fragment 1-Verdünnung 1:100.000; Konjugatverdünnung (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege) 1:100.000; Nachweis durch Chemiluminiszenz-Substrat (ECL+): Exposition 1 min.

4.5.3 <u>Antiserum gegen Fragment 3 (α*Eb*CDPK 1-Fragment 3)</u>

Das Antiserum gegen Fragment 3 erkennt wie αEb CDPK 1-Fragment 2 ausschließlich ein Antigen im Bereich von 57 kDa (Abbildung 4.22). Das Antigen war nachweisbar in Sporozoiten, Merozoiten I und infizierten BFGZ (15 Tage p.i.), fehlte jedoch in nicht infizierten Zellen.



Abbildung 4.22: Reaktion von dem Antiserum gegen Fragment 3 mit den Extrakten aus *E. bovis*-Sporozoiten (1), -Merozoiten I (2), infizierten (3) und nicht infizierten BFGZ (4). M: Marker, kDa. Trenngel: 10 %; α*Eb*CDPK 1-Fragment 3-Verdünnung 1:100 000; Konjugatverdünnung (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege) 1:100 000; Nachweis durch Chemiluminiszenz-Substrat (ECL+): Exposition 3 min.

4.5.4 <u>Antiserum CαEm70/1 gegen EmCDPK (Eimeria maxima-Proteinkinase mit</u> Calmodulin-ähnlicher Domäne)

Im Immunoblot zeigte sich eine Kreuzreaktivität zwischen *Eb*CDPK 1 (Antigen im Bereich 57 kDa) und den Antikörpern gegen rekombinante *Em*CDPK (Bumstead *et al.* 1995) (Abbildung 4.23). Das Antiserum erkennt neben anderen reaktiven Antigenen die *Eb*CDPK 1 bei 57 kDa in Extrakten aus Sporozoiten, Merozoiten und infizierten Zellen.

Beim Vergleich des Reaktionsmusters mit dem auf der Abbildung 4.20 (Reaktion des Antiserums α*Eb*CDPK 1-Fragment 1) konnten übereinstimmende reaktive Banden festgestellt werden. Die bei Sporozoiten stark reagierenden Antigene von 22 und 36 kDa sind auch in der Abbildung 4.23 auf dem Blot mit Sporozoiten-Antigen zu finden (Pfeile). Im Falle von Merozoiten I und infizierten Zellen konnten keine reaktiven Antigen-Banden bei 36 kDa und 39 kDa auf dem Immunoblot (Abbildung 4.23) festgestellt werden.


Abbildung 4.23: Reaktion von dem Antiserum CαEm70/1 gegen *Em*CDPK mit den Extrakten aus *E. bovis*-Sporozoiten (1), -Merozoiten I (2), infizierten Zellen (BFGZ) (3) und mit dem rekombinant hergestellten Peptid aus der Kinasedomäne der *Eb*CDPK 1 (4). M: Marker, kDa. Trenngel: 10 %; CαEm70/1-Verdünnung 1:10 000; Konjugatverdünnung (Alkalische Phosphatase gekoppeltes Anti-Huhn-IgG aus Kaninchen) 1:100 000; Nachweis durch Chemiluminiszenz-Substrat (CPD-Star): Exposition 12 min.

4.6 Nachweis von *Eb*CDPK 1 in Entwicklungsstadien von *E. bovis*

Zum Nachweis von *Eb*CDPK 1 mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests (IIFT) in Parasiten wurden die αEb CDPK 1-Fragment 3-Antiköper verwendet, da diese ausschließlich ein parasitenspezifisches 57 kDa-Antigen, d.h. ein in seiner Masse der berechneten Masse von *Eb*CDPK 1 Immunoblot erkannten. Zur Sicherheit wurden diese Antikörper einer zusätzlichen Affinitätsreinigung unterworfen.

4.6.1 <u>EbCDPK 1 in Sporozoiten</u>

Der Antikörper α*Eb*CDPK 1-Fragment 3 erfasste die *Eb*CDPK 1 im indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) bei frisch excystierten, Methanol- und Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-fixierten Sporozoiten. Im Gegensatz dazu konnte keine spezifische-Fluoreszenz nach der Reaktion mit Präimmunseren ermittelt werden (Abbildung 4.24).

Autofluoreszenz im Zytoplasma und verstärkt im Bereich der refraktilen Körperchen konnte nach Gegenfärbung mit Evans blue in das rote Spektrum umgeleitet werden.

Bei Methanol-fixierten Sporozoiten zeigte sich eine spezifische Fluoreszenz im Bereich des apikalen Komplexes und im Zytoplasma der Parasiten, wobei die Fluoreszenz im apikalen Bereich deutlich stärker war (Abbildung 4.24). Zusätzlich zeigte sich bei den meisten Parasiten eine gegenüber den Zytoplasma verstärkte Fluoreszenz der Oberfläche. Im Vergleich zu den Methanol-fixierten Sporozoiten war die spezifische Fluoreszenz bei Pfa/Ga-fixierten Sporozoiten relativ schwach; sie war am intensivsten am apikalen Ende der Sporozoiten und erstrekte sich, in der Intensität nachlassend, nach kaudal über ca. ³/₄ der Parasiten (Abbildung 4.25).



Abbildung 4.24: Reaktion der Antiköper gegen *Eb*CDPK 1-Fragment 3 mit Methanol-fixierten Sporozoiten von *E. bovis*; Antikörper- und Konjugatverdünnung jeweils 1:100. Spezifische Fluoreszenz im apikalen Bereich (A), im Zytoplasma (Z), R=Refraktiles Körperchen.



Abbildung 4.25: Reaktion der Antiköper gegen *Eb*CDPK 1-Fragment 3 mit Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-fixierten Sporozoiten von *E.bovis*; Antiköper- und Konjugatverdünnung jeweils 1:100. Spezifische Fluoreszenz auf der Parasitenoberfläche vom apikalen Ende (A) ausgehend und sich nach kaudal abschwächend (O); R=Refraktiles Körperchen



Abbildung 4.26: Reaktion von Präimmunseren aus Kaninchen mit Methanol-fixierten Sporozoiten von *E. bovis*; Testserum- und Konjugatverdünnung jeweils 1:100; rote Fluoreszenz ist die Autofluoreszenz der refraktilen Körperchen (R) nach der Gegenfärbung mit Evans Blue.



Abbildung 4.27: Reaktion von Präimmunseren aus Kaninchen mit Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-fixierten Sporozoiten von *E. bovis*; Testserum- und Konjugatverdünnung jeweils 1:100; rote Fluoreszenz ist die Autofluoreszenz der refraktilen Körperchen (R) nach der Gegenfärbung mit Evans Blue.

4.6.2 <u>*Eb*CDPK 1 in Merozoiten I</u>

Bei Merozoiten I erkannten die Antikörper gegen *Eb*CDPK 1-Fragment 3 wie bei Sporozoiten Strukturen im apikalen Bereich der Methanol-fixierten Parasiten (Abbildungen 4.28). Bei Pfa/Ga-fixierten Parasiten war, wie auch bei den Sporozoiten, eine Reaktion der Parasitenoberfläche nachzuweisen, die sich über die gesamte Zelle erstreckte. Präimmunseren reagierten im IIFT weder mit Methanol-fixierten noch mit Pfa/Ga-fixierten Merozoiten I (Abbildung 4.29). Da die Merozoiten im Gegensatz zu Sporozoiten kein refraktiles Körperchen besitzen, wurde bei diesen Zelle auch keine Autofluoreszenz beobachtet.



Abbildung 4.28: Reaktion der Antiköper gegen *Eb*CDPK 1-Fragment 3 mit Methanol-fixierten Merozoiten I von *E. bovis.* Antiköper- und Konjugatverdünnung jeweils 1:100. Spezifische FITC-Fluoreszenz im apikalen Bereich des Merozoiten I. (A); K=Zellkern;



Abbildung 4.29: Reaktion der Antiköper gegen *Eb*CDPK 1-Fragment 3 mit Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-fixierten Merozoiten I von *E. bovis.* Antiköper- und Konjugatverdünnung jeweils 1:100. Spezifische FITC-Fluoreszenz auf der Zelloberfläche im apikalen Bereich (A), in Zytoplasma (Z); K=Zellkern

4.6.3 <u>Agglutinationstest mit *Eb*CDPK-Antiseren</u>

Zur Überprüfung der Oberflächenlokalisation der *Eb*CDPK 1 bei den motilen Stadien wurde ein Agglutinationstest durchgeführt. Dabei wurden die Merozoiten I mit polyklonalen Antikörpern gegen allen drei Fragmenten sowie mit Präimmunseren (Negativkontrollen) und mit Rinderimmunseren (Positivkontrollen) getestet.

Die Rinderimmunseren führten zum erwarteten Ergebnis, in dem Sie die Merozoiten agglutinierten, und zwar in der Regel so, daß zahlreiche Zellen zu einem Konglomerat zusammengeballt wurden. Diese Reaktion unterblieb dagegen beim Einsatz der Präimmunseren, der Antiseren gegen die drei *Eb*CDPK 1-Fragmente sowie in serumfreien (Medium-) Kontrollen (ohne Abbildung).

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird bei *Eimeria bovis* erstmals eine Serin/Threonin-Kinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne *Eb*CDPK 1 identifiziert und beschrieben. Serin/Threonin-Kinasen mit vier Calcium-bindenden Domänen wurden bisher bei Pflanzen, darunter auch bei Grünalgen (*Dunaliella tertiolecta* und *Chlamydomonas eugametos*), und einigen Protozoen beschrieben (erstmals beschrieben u.a. von Harper et al., 1991; Zhao et al., 1992; Pinontoan et al., 2000). Sie fanden sich bei den Einzellern des Stammes Alveolata, den Parasiten der Gattungen *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* und *Eimeria* (Unterstamm Apicomplexa) und bei freilebenden Cilliaten der Gattungen *Moneuplotes*, *Paramecium* und *Eufolliculina* (Unterstamm Cilliophora). Derartige Kinasen konnten aber bis jetzt weder bei Pilzen noch bei mehrzelligen Tieren identifiziert werden (Zhang und Choi, 2001).

Bei den Apicomplexa wurden bis dato 28 CDPKs (einschließlich der in dieser Arbeit neu sequenzierte EbCDPK 1) sequenziert (vgl. Tabelle 5.1). Bei diesen Kinasen wurde bisher keine Systematik erstellt und die Nummerierung von Isoformen erfolgte willkürlich. In Tabelle 5.1 wird der Versuch einer Einordnung der CDPKs aus Apicomplexa in drei Subgruppen nach einem globalen Alignment von CDPK-Aminosäurensequenzen in ClustalW und anschließender Analyse des phylogenetischen Baums gemacht. Nach phylogenetischer Analyse von EbCDPK und in den Datenbanken vorhandener CDPKs aus Apicomplexa, kann man die CDPK Isoformen in drei Subgruppen, hier mit A, B und C bezeichnet unterteilen (siehe Tabelle 5.1). Die EbCDPK 1 ordnet sich dabei, wie sich aus der anschließenden Diskussionen ergibt, in die Subgruppe A ein. In Subgruppe A werden CDPKs zusammengefasst, welche eine Myrostoylierung-Konsensus-Sequenz (Ausnahme Theileria anulata CDPK) besitzen und im Vergleich zu CDPKs aus Subgruppe B enger miteinander verwandt sind (Analyse mit ClustalW und TreeView, siehe Abbildung 4.11). Die CDPKs aus der B-Subklasse sind im Vergleich dazu weniger miteinander verwandt und weisen etwa 50 - 70 % Identität zu den Kinasen der CDPK-Subgruppe A auf. In der C-Subgruppe werden CDPK-relevante Kinasen vereinigt (Abbildung 4.11), welche sich in ihrer Domänen-Struktur von konventionellen CDPKs unterscheiden (u.a. unterschiedliche Anzahl und Platzierung von EF-Händen in bezug auf die katalytische Kinasedomäne).

Tabelle 5.1: In Apicomplexa identifizierte/charakterisierte CDPKs geordnet nach ihrer phylogenetischen Verwandtschaft.

Subgruppe ABabesia rodhaini CDPKBAC57465Fujii et al., unpubliziertCryptosporidium hominis CDPK 1EAL36787Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Eimeria bovis CDPKABA60894,Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Eimeria tenella CDPKCAA96439Dunn et al., 1996Eimeria tenella CDPK 2ABA60893Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Plasmodium berghei CDPK 4P62345Billker et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 1CAA47704Zhao, 1992Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4QTRAH3Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4QTRJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDPK, putativCA173022Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Theileria parva(Stamm Mugua)XP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 3QPRAV5Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 4QTRAV5Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 3QPRAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Plasmodium falciparu	Spezies	AccessNr.	Sequenzierung/Beschreibung
Babesia rodhaini CDPKBAC57465Fujii et al., unpubliziertCryptosporidium hominis CDPK 1EAL36787Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Eimeria tovis CDPKABA60894, CAA96439Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Eimeria tenella CDPK 2ABA60830Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Plasmodium berghei CDPK 4P62345Billker et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 4Q8IBS5, QRIM2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RAGGenomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RAGGenomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Theileria parva(Stamm Mugua)XP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2CAH78864Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 4QTRAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 4AAS47707Genom	Subgruppe A		
Cryptosporidium hominis CDPK 1EAL36787Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Eimeria bovis CDPKABA60894, CAA96439Dunald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Eimeria tenella CDPKABA60893Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Plasmodium berghei CDPK 4P62345Billker et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 4Q81BS5, Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002Plasmodium falciparum CDPK 4Q7RAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Carlton et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 2AAS47705Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 2OI5865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 4Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCAH78864Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004 </td <td>Babesia rodhaini CDPK</td> <td>BAC57465</td> <td>Fujii et al., unpubliziert</td>	Babesia rodhaini CDPK	BAC57465	Fujii et al., unpubliziert
Eimeria tovis CDPKABA60894, CAA96439Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert) CAA96439Eimeria tenella CDPK 2ABA60893Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Plasmodium berghei CDPK 4P62345Billker et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 1CAA47704Zhao, 1992Plasmodium joelii yoelii CDPK 4Q8IBS5,Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Carlton et al., 2005Theileria annulata CDPKVP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BXP_766594Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPKEAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 4Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium falciparum CDPK 5Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 6AAS437743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 7AAS43794Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL38743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37743Genomsequenzierung:	Cryptosporidium hominis CDPK 1	EAL36787	Genomsequenzierung: Xu et al., 2004
Eimeria tenella CDPKABA60894, CAA96439Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert) CAA96439Eimeria tenella CDPK 2ABA60893Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Plasmodium berghei CDPK 4P62345Billker et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 1CAA47704Zhao, 1992Plasmodium yoeli yoelii CDPK 4QTRAH3Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 1QTRAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4QTBIG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2005Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Carlton et al., 2005CDPKXP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPKCAH78864Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 2DI5865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3QPRAV5GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 4QTRAV5Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3QTRAV5Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 4QTRAV5Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 5QAG5394Kieschnick et al., 2001Plasmodium falciparum CDPK 6AAG5394Kieschnick et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 7AAG5394Kieschnick et a	Eimeria bovis CDPK		
Elimeria tenella CDFKCAA96439Dunn et al., 1996Eimeria tenella CDFK 2ABA60893Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Plasmodium berghei CDFK 4P62345Billker et al., 2004Plasmodium falciparum CDFK 1CAA47704Zhao, 1992Plasmodium jalciparum CDFK 4Q8IBS5,Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDFK 1Q7RAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDFK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDFK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Toxoplasma gondii CDFKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDFK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDFK 2CAH78864Plasmodium falciparum CDFK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDFK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDFK 4Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDFK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDFK 2CAH78864Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium falciparum CDFK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDFK 4Q7RAV5Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDFK 5EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDFK 7EAL37743 <tr< td=""><td rowspan="2">Eimeria tenella CDPK</td><td>ABA60894,</td><td>Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)</td></tr<>	Eimeria tenella CDPK	ABA60894,	Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)
Eimeria tenella CDPK 2ABA60893Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)Plasmodium berghei CDPK 4P62345Billker et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 1CAA47704Zhao, 1992Plasmodium jalciparum CDPK 4Q8IBS5,Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BXP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPK 2AAG53994Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCCAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominisCDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominisCDPK 2EAL37872G		CAA96439	Dunn et al., 1996
Plasmodium berghei CDPK 4P62345Billker et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 1CAA47704Zhao, 1992Plasmodium falciparum CDPK 4Q8IBS5,Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 1Q7RAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Theileria annulata CDPKCAI73022Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPK 2AAG53994Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominisCDPK 2EAL3	Eimeria tenella CDPK 2	ABA60893	Donald und Liberator, 2005 (unpubliziert)
Plasmodium falciparum CDPK 1CAA47704Zhao, 1992Plasmodium falciparum CDPK 4Q8IBS5,Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 1Q7RAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva(Stamm Muguga) CDPKXP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 4Q7RAV5Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 2AAS63994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37872Protein-relatedEAL37872Cryptosporidium hominisEAL37841Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Corpotosporidium hominis CDPK 7EA	Plasmodium berghei CDPK 4	P62345	Billker et al., 2004
Plasmodium falciparum CDPK 4Q8IBS5,Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 1Q7RAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva(Stamm Muguga)XP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAS47743Genomsequenzierung: Carlton et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPK2EAL37743Cryptosporidium hominisEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominisCDPKEAL37804Cryptosporidium hominisCDPKFAL37804Cryptosporidium hominisCDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cr	Plasmodium falciparum CDPK 1	CAA47704	Zhao, 1992
Plasmodium yoelii yoelii CDPK 1Q7RAH3Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva(Stamm Mugua) CDPKXP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Plasmodium joelii cDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPKEAL37743Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPKEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 3EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Crypto	Plasmodium falciparum CDPK 4	Q8IBS5,	Genomsequenzierung: Gardner et al., 2002
Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4Q7RJG2Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva(Stamm Mugua) CDPKXP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium falciparum CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDP	Plasmodium yoelii yoelii CDPK 1	Q7RAH3	Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002
Theileria annulata CDPK, putativCAI73022Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva(Stamm Muguga) CDPKXP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7	Plasmodium yoelii yoelii CDPK 4	Q7RJG2	Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002
Theileria parva(Stamm Muguga) CDPKXP_766594Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Ge	Theileria annulata CDPK, putativ	CAI73022	Genomsequenzierung: Pain et al., 2005
Toxoplasma gondii CDPKCAD32376Kieschnick et al., 2001Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPKEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804	<i>Theileria parva</i> (Stamm Muguga) CDPK	XP_766594	Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005
Subgruppe BCryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPKEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPKEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7<	Toxoplasma gondii CDPK	CAD32376	Kieschnick et al., 2001
Cryptosporidium parvum CDPK 1AAS47705Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 2015865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPKCryptosporidium hominis CDPK2EAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2Prytosporidium hominis CDPK2EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804CPytosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Au et al., 2005Theileria a	Subgruppe B		
Cryptosporidium parvum CDPK 2AAS47706Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPKEAL37743Cryptosporidium hominis CDPK2EAL37872protein-relatedEAL37872Cryptosporidium hominis CDPK3EAL38411Cryptosporidium hominis CDPK4EAL37804Cryptosporidium hominis CDPK5EAL37804Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Chro.40377Cal174286Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Genomsequenzierung: Au et al., 2005Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Cryptosporidium parvum CDPK 1	AAS47705	Huang et al., 2004
Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL38263Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPKEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 2EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 4EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 5EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 8AAS47707Huang et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Cryptosporidium parvum CDPK 2	AAS47706	Huang et al., 2004
Plasmodium chabaudi CDPK, putativeCAH78864GenomsequenzierungPlasmodium falciparum CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPKEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2 protein-relatedEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Criptosporidium hominis CDPK 8AAS47707Huang et al., 2004Criptosporidium hominis CDPK 9GAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Geno	Cryptosporidium hominis CDPK 2	EAL38263	Genomsequenzierung: Xu et al., 2004
Plasmodium falciparum CDPK 2O15865Farber et al., 1997Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPKEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2EAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominisEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominisEAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominisCDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	<i>Plasmodium chabaudi</i> CDPK, putative	CAH78864	Genomsequenzierung
Plasmodium falciparum CDPK 3Q9NJU9Li et al., 2000Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPKEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2 protein-relatedEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Sai et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Plasmodium falciparum CDPK 2	O15865	Farber et al., 1997
Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3Q7RAV5Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2 protein-relatedEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK7EAL37804Genomsequenzierung: Cardner et al., 2005Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Plasmodium falciparum CDPK 3	Q9NJU9	Li et al., 2000
Toxoplasma gondii CDPK 2AAG53994Kieschnick et al., 2001Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPKEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2 protein-relatedEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Plasmodium yoelii yoelii CDPK 3	Q7RAV5	Genomsequenzierung: Carlton et al., 2002
Subgruppe CCryptosporidium hominis CDPKEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2 protein-relatedEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Toxoplasma gondii CDPK 2	AAG53994	Kieschnick et al., 2001
Cryptosporidium hominis CDPKEAL37743Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK2 protein-relatedEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Subgruppe C		
Cryptosporidium hominis CDPK2 protein-relatedEAL37872Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Cryptosporidium hominis CDPK	EAL37743	Genomsequenzierung: Xu et al., 2004
Cryptosporidium hominis CDPK Chro.40377EAL38411Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	<i>Cryptosporidium hominis</i> CDPK2 protein-related	EAL37872	Genomsequenzierung: Xu et al., 2004
Cryptosporidium hominis CDPK 7EAL37804Genomsequenzierung: Xu et al., 2004Cryptosporidium parvum CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	<i>Cryptosporidium hominis</i> CDPK Chro.40377	EAL38411	Genomsequenzierung: Xu et al., 2004
Cryptosporidium parvum CDPK 3AAS47707Huang et al., 2004Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Cryptosporidium hominis CDPK 7	EAL37804	Genomsequenzierung: Xu et al., 2004
Theileria annulata CDPK, putativCAI74286Genomsequenzierung: Pain et al., 2005Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Cryptosporidium parvum CDPK 3	AAS47707	Huang et al., 2004
Theileria parva CDPK, putativeEAN32980Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005	Theileria annulata CDPK, putativ	CAI74286	Genomsequenzierung: Pain et al., 2005
	Theileria parva CDPK, putative	EAN32980	Genomsequenzierung: Gardner et al., 2005

Davon ausgehend, daß bei den bisher untersuchten Vertretern des Substammes Apicomplexa mehrere CDPK-Isoformen existieren, ist damit zu rechnen, daß auch bei *Eimeria bovis* weitere CDPK-Isoformen vorkommen. Das hier beschriebene Enzym wurde daher als *Eb*CDPK 1 bezeichnet.

*Eb*CDPK 1 weist ein abgeleitetes Molekulargewicht von 57,81 kDa auf. Aus der Aminosäurensequenz von *Eb*CDPK 1 lassen sich eine Reihe von Motiven und Domänen vorhersagen, aus welchen sich Hinweise auf Lokalisation und Funktion der Kinase ergeben: am NH₂-terminalen Ende der *Eb*CDPK 1 liegt die katalytische Serin/Threonin-Kinasedomäne. In der 283 Aminosäuren langen Sequenz finden sich alle für Proteinkinasen typischen 11 Subdomänen (vgl. Hanks et al., 1988; Hanks und Hunter, 1995). Unter anderem lassen sich folgende charakteristische Elemente darstellen (Abbildung 3.8):

• NH₂-terminal in der ersten Subdomäne liegt eine Glycinschleife mit drei konservierten Glycinen (G 52-X-G 54-X-X-G 57), welche Teil einer ATP-Bindungsstelle ist (Hanks und Hunter, 1995);

• in der Subdomäne II befindet sich nach 15 Aminosäuren vom letzten konservierten Glycin aus ein invariantes K 72. Dieses Lysin ist auch bei anderen Kinasen relativ konstant und liegt COOH-terminal 14 – 23 Aminosäuren hinter dem letzten konservierten Glycin der Glycinschleife. Es wird vermutet, daß dieses Lysin direkt am Phosphattransfer beteiligt ist (Hanks und Quinn, 1991).

• zwischen den Subdomänen VI bis IX verteilt liegt eine Reihe von konstanten Aminosäuren; sie bilden den zentralen Bereich der katalytischen Domäne (vgl. Hanks und Hunter, 1995). Hier finden sich die konstanten D 167, N 172 (Subdomäne VI) und ein Triplet D 188-F 189-G 190 (Subdomäne VII). Ein Merkmal der Subdomäne VIII – das konservierte Triplet A-P-G mit konstantem Glycin (in *Eb*CDPK 1 A 212-P 213-G 214) – wird oft als Indikator für die katalytische Domäne bezeichnet (Hanks und Hunter, 1995).

• In den Subdomänen VI und VIII finden sich die Motive, anhand derer die katalytischen Domänen von Serin/Threonin-Proteinkinasen und von Tyrosin-Proteinkinasen unterschieden werden können (Hanks und Hunter, 1995). Die Sequenz D-L-K-P-E-N zwischen den oben erwähnten, invarianten D 167 und N 172 ist ein Indikator für die Substratspezifität von Ser/Thr-Proteinkinasen, während für die Tyrosinkinasen eine Sequenz D-L-A-A-R-N (für Tyrosinkinasen der Src-Familie D-L- R-A-A-N) typisch ist (Hanks und Hunter, 1995). Eine weitere Konsensussequenz liegt direkt vor einem konservierten Triplet A-P-G und lautet für Serin/Threonin-Kinasen: G-T/S-X-Y/F-X-<u>A-P-E</u>, für Tyrosin-Kinasen: P-I/V-K/R-W-T/M-<u>A-P-E</u> (Hanks et al, 1988; Hanks und Quinn, 1991; Bossemeyer, 1995).

Die kristallographische Aufklärung der Struktur von Kinasen belegt die Bedeutung dieser konservierten Regionen und Subdomänen (Bossemeyer, 1995; Hanks und Hunter, 1995).

Das Vorhandensein all dieser Regionen in der Sequenz der katalytischen Kinasedomäne der EbCDPK 1 lässt vermuten, daß das Protein in vivo aktiv ist und eine katalytische Rolle spielt. Ein indirekter Hinweis auf mögliche Kinaseaktivität in vitro ergab sich bei der Expression von EbCDPK-Fragment 1 in E. coli, wobei nach der Induktion eine Hemmung des Wachstums der Bakterien zu beobachten war. Das EbCDPK 1-Fragement 1 enthält neben der katalytischen Domäne nur eine kurze Aminosäurensequenz aus der Verbindungsdomäne; die [Ca²⁺]i-bindenden Domänen fehlen. Da der Verbindungsdomäne eine autoinhibitorische Rolle zugeschrieben wird (Harper et al., 1994), ließe sich die Hemmung des Bakterienwachstums möglicherweise mit einer ungehemmten Kinaseaktivität erklären. Außerdem stellten Harmon et al. (1994) fest, dass ein 312 Aminosäuren-Konstrukt aus Soja-CDPKa, bei dem die Calmodulin-ähnliche Domäne und ein Großteil der Verbindungsdomäne fehlten, ohne Anwesenheit von Calcium aktiv war.

Die Verbindungsdomäne im Bereich K 336 – K 365 liegt zwischen der katalytischen und der Calmodulin-ähnlichen Domäne. Diesem Bereich wird bei den heterologen CDPKs eine Kinase-autoinhibitorische Rolle zugeschrieben (Harper et al., 1994; Harmon et al, 1994). Ein bis jetzt nicht genau definiertes Motiv aus der Verbindungsdomäne wirkt als Pseudosubstrat und interagiert mit der Substratbindungsregion in der katalytischen Domäne. Dies resultiert in einer Blockierung der Region und somit einer Kinaseinhibition (Harmon et al., 1994; Harper et al., 1994).

Die in *Eb*CDPK 1 vorgefundene Konsensussequenz für eine NH₂-terminale Myristoylierung und das Auftreten von basischen Aminosäuren im anschließenden Bereich lässt vermuten, daß die *Eb*CDPK 1 mit Hilfe eines Myristinsäurenrests in einer Membran verankert wird. Proteine, die myristoyliert werden, beginnen mit der Sequenz MGXXXS/T (siehe Tabelle 4.2; vgl. Bologna et al., 2004). Dabei wird das initiale Methionin über eine Methionin-Aminopeptidase kotranslational entfernt und die Myristinsäure wird über N-

Myristintransferase an die Aminogruppe des NH₂-terminalen Glycin-Rests gebunden (Krauss, 1997).

Die Acylierung vom NH₂-terminalen Glycin mit einem Myristinsäure-Rest ist nur eine Voraussetzung für die Membranverankerung eines Proteins. Biophysikalische Studien zeigten, dass die Bindungsenergie des Myristinsäure-Rests in einer Membran relativ schwach ist und ungefähr bei 10^{-4} M K_d liegt (Peitzsch und McLaughlin, 1993). Zur wirksamen Verankerung eines Proteins in der Membran wird ein zweites Signal benötigt: eine zusätzliche Acylierung mit Palmitinsäure des NH₂-terminaliegenden Cysteins (in der Regel nach der Modifikation eines NH₂-terminalen Glycins) oder eine an basischen Aminosäuren reiche Sequenz, welche mit sauren Phospholipiden elektrostatisch interagiert (Buser et al, 1994; Sigal et al, 1994; Murray et al., 1998). Die Motive für dieses "zwei-Signal-Modell" der Membranverankerung sind bei Tyrosinkinasen der Src-Familie und den α -Untereinheiten von heterotrimeren G-Protein-Komplexen besonders deutlich. Im Einzelnen wurde unter myristoylierten Proteinen für Src selbst, HIV-1 Gag, HIV-1 Nef und MARCKS-Proteine die Myristoylierung in Kombination mit mit einem Cluster aus basischen Aminosäuren beobachtet (Übersicht bei Resh, 1994).

Die Assoziation von CDPK in der Membran mit Hilfe von kovalent gebundenen Fettsäuren (kombinierte Myristoylierung mit einer Palmitoylierung) wurde bei *P. falciparum* an *Pf*CDPK 1 gezeigt (Möskes et al., 2004). Auch im Falle von Pflanzen, bei einer Isoform der Reis CDPK (*Os*CPK 2), wurde die Doppelmodifizierung beobachtet und das Protein wurde in der Membranfraktion nachgewiesen (Martin und Busconi, 2000;). *Pf*CDPK 1 weist jedoch außerdem und im Gegensatz zu anderen CDPKs noch jenen Cluster aus basischen Aminosäuren als zusätzliches Signal zur Membranverankerung auf (Möskes et al., 2004). Eine Modifikation mit Palmitin ist dagegen bei *Eb*CDPK 1, *Pf*CDPK 4 und *Tg*CDPK 1 wegen eines fehlenden Cysteins (siehe Abbildungen 4.7 und 5.1) nicht möglich.



Abbildung 5.1: Hypothetische Darstellung einer Membranverankerung durch einen Myristinsäure-Rest von *Eb*CDPK 1 und *Tg*CDPK 1 (Kieschnick et al., 2001) (bei *E. bovis* bzw. *T. gondii*) im Vergleich zu *Pf*CDPK 1 (Zhao et al., 1994) aus *P. falciparum*. Der Myristinsäure-Rest ist als "Zick-zack"-Linie am NH₂-terminalen Glycin dargestellt. Die basischen Aminosäuren sind fett markiert, unterstrichen und mit der Ladung dargestellt. Bei *Pf*CDPK 1 ist der Palmitinsäure-Rest als zweite "Zick-zack"-Linie am Cystein dargestellt.

Das für die Membranverankerung erforderliche zweite Signal dürfte bei *Eb*CDPK 1 über die vier basischen Aminosäuren (ein Arginin sowie drei Lysine) in Position R 13, K 15, K 21, K 24 zustande kommen. Im Falle der gleichfalls aus Apicomplexa stammenden *Tg*CDPK 1 besteht der basische Cluster aus zwei Argininen und einem Histidin (Kieschnick et al., 2001), bei PfCDPK 4 aus drei Lysinen (Gardner et al., 2002; letztere nicht in der Abbildung).

Aus der NH₂-terminalen Aminosäuren-Sequenz von *Eb*CDPK 1 ergeben sich nicht nur Hinweise auf eine Membranverankerung des Moleküls, sondern auch auf dessen mögliche Abspaltung. Eine Rolle könnten dabei die Aminosäuren Serin und Threonin in den Positionen 5 und 6 in Form eines "Myristol-elektrostatischen Schalters" spielen, wie er z. B. bei MARCS-Proteinen als verantwortlich für deren intrazelluläre Lokalisation beschrieben worden ist (Thelen et al., 1991). MARCKS-Proteine sind durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen in der Membran verankert. Falls an eine der beiden Aminosäuren durch Autophosphorylierung der *Eb*CDPK 1 ein Phosphat geknüpft wird, kann dies theoretisch durch negative Ladung des Phosphats die Wechselwirkung zwischen basischen Aminosäuren und negativ geladenen sauren Phospholipiden beeinflussen und die Membranverankerung destabilisieren (vgl. McLaughlin und Aderem, 1995).

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Kinase gehört demnach zur Gruppe der Calmodulin-Kinasen und in die Familie Serin/Threonin Proteinkinasen mit Calmodulinähnlicher Domäne. *Eb*CDPK 1 ist somit Calcium-abhängig/Calmodulin-unabhängig, d. h. benötigt für ihre Aktivierung kein Calmodulin.

Mit dem Ziel, geeignete Antigene zur Produktion polyklonaler Antiköper gegen *Eb*CDPK 1 herzustellen, wurde die Kinase in 3 Fragmenten exprimiert. Bei der Expression von *Eb*CDPK 1-Fragment 1 wurde davon ausgegangen, dass die resultierenden Antisera wegen der Konservierung bestimmter Motive in der katalytischen Kinasedomäne auch mit anderen Kinasen kreuzreagieren würden. Die Antiseren gegen die beiden anderen Fragmente sollten spezifisch *Eb*CDPK 1 erkennen.

Der Expressionserfolg war in den ersten Versuchen unbefriedigend. Als eine Ursache wurden Unterschiede zwischen den Bakterien und *E. bovis* in der Kodonnutzung vermutet. Die kodierende *Eb*CDPK 1-cDNA und vermutlich die meisten anderen kodierenden cDNA-Sequenzen aus *E. bovis* sind reich an Adenin und Thymin. Dies scheint ein Charakteristikum des Substammes Apicomplexa zu sein. Aus den Daten der *P. falciparum*-Genom-Sequenzierung ergibt sich ein A+T-Gesamtgehalt von 80,6 %, in den Introns sogar von bis zu 90 % (Gardner et al., 2002). Der hohe Gehalt an Adenin und Thymin in der cDNA von *E. bovis* spiegelt sich auch in der Kodon-Nutzung wieder und kann bei der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* zu geringen Ausbeuten führen. Die entscheidende Verbesserung der Proteinexpression war daher erst nach der Substituierung der Bakterienzellen mit zusätzlichen tRNA's durch die Co-Transformation von tRNA-

kodierenden Genen möglich. Bei diesen tRNA-Genen handelte es sich um die tRNA's mit den Antikodons für Arginin, Leucin, und Isoleucin (Kleber-Janke und Becker, 2000).

Beim exprimierten Peptid *Eb*CDPK-Fragment 3 (Calcium-bindende Domäne) wurde in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen ein besonderes Laufverhalten beobachtet. Dabei spaltete sich das 21,45 kDa-große *Eb*CDPK-Fragment 3 in drei Fraktionen, die sich im Gel mit Banden bei 19, 22 und 24 kDa darstellten. Ein ähnliches Phänomen wurde auch bei anderen calciumbindenden Proteinen wie Calmodulin und Proponin C beschrieben (Head und Perry, 1973; Grand et al., 1978; Garrigos et al, 1991). Nach den eigenen Versuchen scheint die Ursache zu sein, daß das Peptid *Eb*CDPK-Fragment 3 im Probenpuffer mit 2-Merkaptoethanol und SDS zum Teil renaturiert, wenn die 2-Merkaptoethanol-Konzentration im Probenpuffer durch Verdunstung abnimmt. Nach Zugabe von 100 mM DTT erwies sich das *Eb*CDPK-Fragment 3 dann soweit denaturiert, daß es sich in der SDS-PAGE als eine einzelne Bande darstellte.

Die mit den rekombinanten Peptiden hergestellten polyklonalen Antikörper lieferten zum Teil überraschende Ergebnisse. Das αEb CDPK 1-Fragment 1-Serum reagierte nicht mit EbCDPK 1 im erwarteten Bereich von 57 kDa, sondern erkannte andere Antigene und zwar bei Sporozoiten in Bereichen von 22 kDa und 36 kDa und bei Merozoiten I und infizierten Zellen von 36 kDa und 39 kDa. Zum Vergleich wurde ein polyklonaler Antikörper α Em70/1 aus dem Huhn herangezogen, der sich gegen eine rekombinante *E. maxima*-CDPK (cDNA-Klon C α Em70/1) richtet (Dunn et al., 1996). Die cDNA aus diesem Klon kodiert für die *Em*CDPK ohne NH₂-terminalem Segment. Die α Em70/1-Antikörper reagierten unter anderem spezifisch mit *Eb*CDPK 1 im Bereich von 57 kDa und erfassten zusätzlich eine Reihe anderer Antigene, unter welchen sich auch die bei Sporozoiten mit α EbCDPK 1-Fragment 1 reagierenden Antigene im Bereich von 22 kDa und 36 kDa fanden. Es kann daher angenommen werden, dass die beiden Antiseren α EbCDPK 1-Fragment 1 und α Em70/1 mit konservierten Subdomänen oder Motiven in anderen Proteinen kreuzreagieren. Unerklärlich ist derzeit aber, warum diese Motive nicht in *Eb*CDPK 1 erfasst wurden.

Die polyklonalen Antikörper αEb CDPK 1-Fragment 2 erfassten spezifisch die EbCDPK 1 im Bereich von 57 kDa bei Sporozoiten, Merozoiten I, und infizierten Zellen (15 Tage p.i.), reagierten aber bei Sporozoiten in Form einer nahe beieinander liegenden Doppelbande. Verantwortlich für die besondere Situation bei Sporozoiten könnte a) die Existenz einer weiteren *Eb*CDPK-Isoform, welche mit diesem Antikörper kreuzreagiert und ein ähnliches Molekulargewicht besitzt, b) eine Sporozoiten-spezifische Modifikation der *Eb*CDPK 1 oder c) ein alternatives Spleißen der *Eb*CDPK 1-cDNA sein. Welche der Möglichkeiten in Betracht kommt, lässt sich derzeit nicht entscheiden.

Die Reaktionen der Antikörper mit Extrakten aus Sporozoiten, Merozoiten I und reifen Schizonten (infizierten Zellen 15 dpi.) zeigten eine Expression der *Eb*CDPK 1 in allen diesen Stadien. Die Ergebnisse gleichen den bisherigen Daten zur Expression von *Et*CDPK in motilen *E. tenella*-Stadien und in Schizonten-tragenden infizierten Zellen (Dunn et al., 1996). Ob die *Eb*CDPK 1 auch noch von Trophozoiten früh nach der Zellinvasion gebildet wird, ist derzeit noch offen. Dunn et al. (1996) haben dies für *Et*CDPK verneint, doch erhebt sich die Frage, ob der fehlende Nachweis in dieser Phase nicht vielleicht nur durch eine zu geringe Konzentration bedingt war. Eine Auskunft sollte hier eine Untersuchung auf mRNA-Ebene geben.

Zur Lokalisierung der Kinase in den motilen Stadien von *E. bovis* wurden affinitätsgereinigte Antikörper αEb CDPK 1-Fragment 3 verwendet, da diese im Vergleich zu αEb CDPK 1-Fragment 2 eine stärkere und deutlichere Reaktion im IIFT lieferten.

Die Untersuchungen mit *aEb*CDPK 1-Fragment 3 und Sporozoiten und Merozoiten im IIFT und anschließender CLSM zeigten, daß *Eb*CDPK 1 vorwiegend im apikalen Komplex dieser Stadien lokalisiert und mit der Pellicula der Parasiten assoziiert ist. Dies entspricht der Lokalisation der orthologen Moleküle bei *E. tenella* und *E. maxima* (Dunn et al.,1996).

Die Lokalisation der Kinase im Apikalkomplex ist von besonderem Interesse, weil die Organellen des Apikalkomplexes an der Invasion der Wirtszelle und an anderen Parasit-Wirt-Interaktionen direkt beteiligt sind (Carruthers und Sibley, 1997; Carruthers et al., 1999; Übersicht bei Tomley und Soldati, 2001; Soldati et al., 2001, Dubremetz et al., 1998). Hier bestünde die Möglichkeit, daß *Eb*CDPK 1 die Phosphorylierung von Molekülen übernimmt, die in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind. Daß diese Möglichkeit gegeben ist, ergibt sich anhand der Befunde der orthologen CDPK Isoform 1 (*Tg*CDPK 1) von *T. gondii*. Dobrowolski et al. (1997) hatten bereits früher gezeigt, daß die Motilität und Wirtszellinvasion von *T. gondii*-Tachyzoiten durch KT5926, d. h. einen selektiven Hemmer Calmodulin-abhängiger Kinasen, in tierischen Zellen drastisch reduziert wird. Den direkten Zusammenhang konnten dann Kieschnick et al. (2001) nachweisen, denn KT5926 hemmt *in vitro* die Aktivität der rekombinanten *Tg*CDPK 1.

Insbesondere wurden insgesamt nur drei Phosphoproteine gefunden, welche *in vivo* in einer KT5926-sensitiven Weise phosphoryliert werden und mit den von der rekombinanten *Tg*CDPK 1 *in vitro* phosphorylierten Proteinen identisch sind (Kieschnick et al., 2001). Die Autoren charakterisierten diese Substrate nicht weiter, aber es ist durchaus denkbar, daß es sich um Produkte aus Mikronemen handelte, da diese entscheidend für Andock- und frühe Invasionsschritte sind (Übersicht bei Menard et al., 2001; Soldati et al., 2001; Sibley, 2003). Parallele Experimente zur Hemmbarkeit der Wirtszellinvasion von *E. bovis*-Sporozoiten durch KT5926 wurden bisher nicht durchgeführt, so daß der Analogieschluss zu *T. gondii* nicht möglich ist. Ähnliche Verhältnisse zwischen den beiden Parasiten sind jedoch nicht ausgeschlossen, insbesondere, weil im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter berücksichtigte immunelektronenmikroskopische Untersuchung annehmen lassen, daß EbCDPK 1 in die Mikronemenmembran integriert ist.

Allerdings müssen jegliche Versuche von Analogieschlüssen bei den CDPKs aus Apicomplexa vorerst sehr vorsichtig beurteilt werden. Zwar scheint das Substratspektrum zumindest hinsichtlich der CDPK-Untergruppe A, zu denen *Eb*CDPK 1 zu zählen ist, nach den Ergebnissen bei *T. gondii* (Kieschnick et al., 2001) relativ schmal zu sein, doch ist die Frage bei Eimerien offen.

Als schwieriger zu interpretieren stellt sich dagegen bei genauer Betrachtung der Befund dar, daß gegen EbCDPK 1 gerichtete Antikörper an mit Paraformaldehyd/Glutaraldehyd fixierte Parasiten banden. Dieses war vor allem im apikalem Bereich sehr ausgeprägt; zum hinteren Bereich der Parasiten hin wurde die Reaktion schwächer. Im Prinzip entspricht das Bild dem, das Heise et al. (1999) für die Reaktion von E. bovis-Mikronemenspezifischen monoklonalen Antikörpern mit Sporozoiten nach erstem Kontakt mit Wirtszellen beschrieben hat. Dieses steht wiederum im Einklang mit den generellen Kenntnissen zur Exozytose von Mikronemenproteinen (vgl. Soldati et al., 2001 Carruthers und Sibley, 1999; Carruthers und Sibley, 1997; Tomley et al., 1996). Nachdem gemeinhin angenommen wird, daß mit der hier verwendeten Fixationsmethode die Proteine der Pellikula so vernetzt werden, daß eine Durchdringung mit Antiköpern nicht möglich ist (vgl. Dunn et al., 1996), wäre anzunehmen, daß der fluoreszenztechnische Nachweis einer Bindung von EbCDPK-Fragment 3-Serum tatsächlich eine Lokalisation des Proteins auf der Zelloberfläche belegt. Dies wird auch von Dunn et al. (1996) nach im Prinzip gleichem Versuchsansatz für die möglicherweise orthologen E. tenella- und E. maxima-Proteine so gesehen.

Vorausgesetzt, daß EbCDPK 1 wirklich in der Mikronemenmembran verankert ist, wäre demnach anzunehmen, daß es mit den Organellen über eine Vesikelexocytose (vgl. Carruthers und Sibley, 1999; Vierra und Moreno, 2000) nach außen geschleust und auf die Pellikula der Parasiten aufgelagert wird. Die Art der Membranbindung würde über den genannten Mechanismus (Carruthers and Sibley, 1999) eine rasche Freisetzung des Enzyms ermöglichen.

Diese Interpretation, die auch der von Dunn et al., (1996) entspricht, kann allerdings nicht ohne Einschränkung gelten. So war es nicht möglich, durch die polyklonalen Antikörper gegen EbCDPK-Fragment 3 eine Agglutination von freien Sporozoiten zu erzielen, wie dies z.B. durch Seren von rekonvaleszenten Kälbern und kolostralen Antikörpern erfolgt (J. H. Behrendt, pers. Mitteilung). Beim Rind sind kolostrale Antikörper vorwiegend IgG₁ (Butler, 1983; Saif und Smith, 1985) und auch in den reaktiven Seren spielten entsprechend vorgenommener Absorptionsstudien IgG-Antikörper die entscheidende Rolle. Da nach dem Immunisierungsschema auch im Antiserum aus Kaninchen IgGdominieren sollten, verwundert diese Diskrepanz. Antiköper Laufende immunelektronenmikroskopische Untersuchungen sollten genauere Aufklärung über die Loklisation des Enzyms erbringen. Daß CDPKs von Apicomplexa aber grundsätzlich nach außen geschleust werden können, ergibt sich aus den Untersuchungen von Möskes et al. (2004) bei PfCDPK 1 aus P. falciparum, denn dieses Enzym konnte in Erythrozyten in der parasitophoren Vakuole und in den sogenannten Maurer's Clefts nachgewiesen werden. Unklar ist derzeit aber, ob und gegebenfalls wie EbCDPK 1 bei der Invasion der Wirtszelle eine unmittelbare Rolle spielt, oder ob seine Freisetzung quasi ein Epiphenomen im Zusammenhang mit der Exozytose von Organellen ist. Dies sollte in Weiterführung dieser Arbeit u.a. mittels der hier vorgestellten Antikörper überprüft werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird bei *Eimeria bovis*, einem wichtigen Kokzid des Rindes, unter Verwendung von cDNA-Banken aus Merozoiten I eine ungewöhnliche Serin/Threonin-Proteinkinase mit Calmodulin-ähnlicher Domäne (*Eb*CDPK I) identifiziert. CDPKs wurden bisher bei Pflanzen und einigen Protozoen einschließlich Apicomplexa gefunden, nicht aber bei metazoären Tieren.

Die cDNA von *Eb*CDPK 1 wurde sequenziert. Nach der Sequenzanalyse ließen sich im kodierten Protein mehrere funktionelle Domänen ermitteln, und zwar: eine katalytische Serin/Threonin-Kinasedomäne, eine Zwischensequenz und eine Calmodulin-homologe Domäne mit 4 Calciumbindungsstellen (EF-Hände). *Eb*CDPK 1 ist damit Calmodulinunabhängig und wird direkt durch die Bindung von Ca²⁺ aktiviert. Das Vorhandensein konservierter Aminosäuren in den Subdomänen und aktiven Zentren des Proteins läßt annehmen, daß die Kinase *in vivo* aktiv ist. Eine potenzielle Myristoylierungsstelle und ein Cluster aus vier basischen Aminosäuren am NH₂-terminalen Ende lassen vermuten, daß *Eb*CDPK 1 in einer Membran durch die Acylierung mit einem Myristinsäure-Rest verankert ist.

*Eb*CDPK 1 weist eine hohe Homologie zu bestimmten CDPKs aus Apicomplexa auf, welche sich einer von insgesamt drei phylogenetischen Gruppen zuordnen lassen.

Drei überlappende Fragmente von *Eb*CDPK 1 wurden in *E. coli* exprimiert und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Fragment 1 deckt die gesamte katalytische Domäne und einen Teil der Zwischendomäne, Fragment 2 einen COOH-terminalen Teil der katalytischen Kinasedomäne und die Calmodulin-homologe Sequenz, Fragment 3 die Calmodulin-homologe Sequenz ab. Nur die Antikörper gegen Fragmente 2 und 3 reagierten im Immunoblot mit *Eb*CDPK 1 in Extrakten aus Sporozoiten, Merozoiten und infizierten Zellen (15 Tage p.i.) im Bereich von 57 kDa.

Der Antikörper gegen Fragment 3 wurde zur Lokalisation des Antigens mittels konfokaler Laser-Rastermikroskopie (CLSM) in fixierten Parasiten benutzt. *Eb*CDPK 1 ließ sich bei Methanol-fixierten Sporozoiten und Merozoiten I vorwiegend im apikalen Bereich, mit gewisser Wahrscheinlichkeit in den Mikronemen, nachweisen. Bei Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-fixierten Sporozoiten und Merozoiten I kam es offensichtlich zur Antikörperbindung auf der Parasitenoberfläche, insbesondere im apikalen Bereich. Die mögliche Funktion von *Eb*CDPK 1 wird im Zusammenhang mit der Lokalisation des Moleküls im Parasiten diskutiert.

7 SUMMARY

An uncommon serin/threonin protein kinase with a calmodulin like domain *Eb*CDPK 1 was identified in the important cattle coccid *Eimeria bovis* using 1st generation merozoite cDNA expression librarries. Corresponding enzymes have been observed so far in plants and protozoa including Apicomplexa but not in metazoan animales.

The cDNA of *Eb*CDPK 1 was sequenced. Sequence analysis suggests three main functional domains of the encoded protein – a catalytic serin/threonine kinase domain, a junction domain and a calmodulin like domain with 4 calcium binding sites (EF-hands). The presence of conserved amino acids in the subdomains and active sites suggests *in vivo* activity of the enzyme. An NH₂-terminal potential myristoylation site and clusters of basic amino acids argue for membrane anchoring of the kinase via myristyl residues.

*Eb*CDPK 1 shows high homology to a particular group of CDPKs in other Apicomplexa. In addition two groups of genetically different CDPKs are known in this parasite phylum.

Three overlapping fragments of *Eb*CDPK 1 were expressed in *E. coli* and used to immunize rabbits. Fragment 1 contained the kinase domain and a partial sequence of the junction domain, fragment 2 – part of kinase domain, the junction domain and the calmodulin like domain, *Eb*CDPK-Fragmen 3 – the whole calmodulin like domain. Only antibodies against fragment 2 and fragment 3 reacted with *Eb*CDPK 1 by immunobloting in extracts of sporozoites, first generation merozoites and infected host cells (15 days p.i.) and detected a 57 kDa protein. Antibodies to fragment 3 were used to localize the antigen in the fixed parasites by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The antigen could be shown prodominantely within the apical area of methanol fixed sporozoites and merozoites I, probably within the micronemes. Paraformaldehyde/glutaraldehyde fixed parasites bound the antibody predominantly to their surface, particulary in the apical part. Considering the localization of EbCDPK 1 the possible function of the enzyme is discussed

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahamsen, M. S., Clark, T. G., Mascolo, P., Speer, C. A., and White, M. W. (1993): Developmental gene expression in *Eimeria bovis*. Mol.Biochem.Parasitol. (57): 1-14.
- Abrahamsen, M. S., Johnson, R. R., Clark, T. G., and White, M. W. (1994): Developmental regulation of an *Eimeria bovis* mRNA encoding refractile bodyassociated proteins. Mol.Biochem.Parasitol. (68): 25-34.
- Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1991): Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. Parasitology (103 Pt 3): 321-329.
- 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): 1255-1264.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002): Molecular biology of the cell., Garland Science, New York, 4. Auflage, 176-180
- Barta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., Dashkevicz, M., Anderson, J. W., Feighner, S. D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M. C., Danforth, H. D., Ruff, M. D., and Profous-Juchelka, H. (1997): Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. J.Parasitol. (83): 262-271.
- Beckers, C. J., Dubremetz, J. F., Mercereau-Puijalon, O., and Joiner, K. A. (1994): The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. J.Cell Biol. (127): 947-961.
- 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): 39-49.

- Bermudes, D., Dubremetz, J. F., Achbarou, A., and Joiner, K. A. (1994): Cloning of a cDNA encoding the dense granule protein GRA3 from *Toxoplasma gondii*. Mol.Biochem.Parasitol. (68): 247-257.
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., and Brinkmann, V. (2004): Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. Cell (117): 503-514.
- Binder, E. M. and Kim, K. (2004): Location, location, location: trafficking and function of secreted proteases of *Toxoplasma* and *Plasmodium*. Traffic. (5): 914-924.
- Black, M. W., Arrizabalaga, G., and Boothroyd, J. C. (2000): Ionophore-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* reveal host cell permeabilization as an early event in egress. Mol.Cell Biol. (20): 9399-9408.
- Blackman, M. J. and Bannister, L. H. (2001): Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. Mol.Biochem.Parasitol. (117): 11-25.
- Boisson, B. and Meinnel, T. (2003): A continuous assay of myristoyl-CoA:protein Nmyristoyltransferase for proteomic analysis. Anal.Biochem. (322): 116-123.
- Bologna, G., Yvon, C., Duvaud, S., and Veuthey, A. L. (2004): N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. Proteomics. (4): 1626-1632.
- Bonhomme, A., Bouchot, A., Pezzella, N., Gomez, J., Le Moal, H., and Pinon, J. M. (1999): Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. FEMS Microbiol.Rev. (23): 551-561.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., and van der, N. J. (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J.Clin.Microbiol. (28): 495-503.
- Bossemeyer, D. (1995): Protein kinases--structure and function. FEBS Lett. (369): 57-61.
- 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): 4119-4127.

- Bumstead, J. and Tomley, F. (2000): Induction of secretion and surface capping of microneme proteins in *Eimeria tenella*. Mol.Biochem.Parasitol. (110): 311-321.
- Bumstead, J. M., Dunn, P. P., and Tomley, F. M. (1995): Nitrocellulose immunoblotting for identification and molecular gene cloning of *Eimeria maxima* antigens that stimulate lymphocyte proliferation. Clin.Diagn.Lab Immunol. (2): 524-530.
- Buser, C. A., Sigal, C. T., Resh, M. D., and McLaughlin, S. (1994): Membrane binding of myristylated peptides corresponding to the NH2 terminus of Src. Biochemistry (33): 13093-13101.
- Butler, J. E. (1983): Bovine immunoglobulins: an augmented review. Vet.Immunol.Immunopathol. (4): 43-152.
- Bürger, H.-J. (1983): *Eimeria* Infektionen beim Rind. Berlin München Tierärztl.Wschr. (69): 350-357.
- Carey, K. L., Donahue, C. G., and Ward, G. E. (2000): Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*.
 Mol.Biochem.Parasitol. (105): 25-37.
- Carey, K. L., Westwood, N. J., Mitchison, T. J., and Ward, G. E. (2004): A small-molecule approach to studying invasive mechanisms of *Toxoplasma gondii*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (101): 7433-7438.
- Carey, K. L., Jongco, A. M., Kim, K., and Ward, G. E. (2004): The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. Eukaryot.Cell (3): 1320-1330.
- 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): 114-123.
- Carruthers, V. B., Giddings, O. K., and Sibley, L. D. (1999): Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. Cell Microbiol. (1): 225-235.
- 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. and Sibley, L. D. (1999): Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. Mol.Microbiol. (31): 421-428.
- Carruthers, V. B., Hakansson, S., Giddings, O. K., and Sibley, L. D. (2000): *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. Infect.Immun. (68): 4005-4011.
- 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): 14346-14353.
- Carruthers, V. B. (2002): Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Trop. (81): 111-122.
- 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): 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): 2424-2431.
- Chehab, E. W., Patharkar, O. R., Hegeman, A. D., Taybi, T., and Cushman, J. C. (2004): Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. Plant Physiol (135): 1430-1446.
- Chiappino, M. L., Nichols, B. A., and O'Connor, G. R. (1984): Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. J.Protozool. (31): 288-292.
- Chobotar, B., Scholtyseck, E., Senaud, J., and Ernst, J. V. (1975): A fine structural study of asexual stages of the murine coccidium *Eimeria ferrisi* Levine and Ivens 1965. Z.Parasitenkd. (45): 291-306.
- Chobotar, B., Danforth, H. D., and Entzeroth, R. (1993): Ultrastructural observations of host-cell invasion by sporozoites of *Eimeria papillata* in vivo. Parasitol.Res. (79): 15-23.

- Christodoulou, J., Malmendal, A., Harper, J. F., and Chazin, W. J. (2004): Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. J.Biol.Chem. (279): 29092-29100.
- Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S. M., Hrabak, E. M., Harmon, A. C., Pickard, B. G., and Harper, J. F. (2003): Subcellular targeting of nine calciumdependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. Plant Physiol (132): 1840-1848.
- Daugschies, A., Akimaru, M., and Burger, H. J. (1986): [Experimental *Eimeria bovis* infections in the calf: 1. Parasitologic and clinical findings]. Dtsch.Tierarztl.Wochenschr. (93): 393-397.
- Daugschies, A., Burger, H. J., and Akimaru, M. (1998): Apparent digestibility of nutrients and nitrogen balance during experimental infection of calves with *Eimeria bovis*. Vet.Parasitol. (77): 93-102.
- De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., and Kim, S. H. (1993): Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. Nature (363): 595-602.
- Dobrowolski, J. M., Carruthers, V. B., and Sibley, L. D. (1997): Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Mol.Microbiol. (26): 163-173.
- Dobrowolski, J. M., Niesman, I. R., and Sibley, L. D. (1997): Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. Cell Motil.Cytoskeleton (37): 253-262.
- Dowse, T. and Soldati, D. (2004): Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. Curr.Opin.Microbiol. (7): 388-396.
- Dubremetz, J. F., Ferreira, E., and Dissous, C. (1989): Isolation and partial characterization of rhoptries and micronemes from *Eimeria nieschulzi* zoites (Sporozoa, Coccidia). Parasitol.Res. (75): 449-454.
- Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., and Joiner, K. A. (1993): Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. Parasitol.Res. (79): 402-408.
- 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.

- Dunn, P. P., Bumstead, J. M., and Tomley, F. M. (1996): Sequence, expression and localization of calmodulin-domain protein kinases in *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*. Parasitology (113 (Pt 5)): 439-448.
- Ellard-Ivey, M., Hopkins, R. B., White, T. J., and Lomax, T. L. (1999): Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (*Cucurbita pepo L.*). Plant Mol.Biol. (39): 199-208.
- Ellison, S. P., Greiner, E., and Dame, J. B. (2001): In vitro culture and synchronous release of Sarcocystis neurona merozoites from host cells. Vet.Parasitol. (95): 251-261.
- Ernst, J. V. and Benz, G. W. (1986): Intestinal coccidiosis in cattle. Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract. (2): 283-291.
- Evans, N. H., McAinsh, M. R., and Hetherington, A. M. (2001): Calcium oscillations in higher plants. Curr.Opin.Plant Biol. (4): 415-420.
- Farber, P. M., Graeser, R., Franklin, R. M., and Kappes, B. (1997): Molecular cloning and characterization of a second calcium-dependent protein kinase of *Plasmodium falciparum*.
 Mol.Biochem.Parasitol. (87): 211-216.
- Fayer, R. and Hammond, D. M. (1967): Development of first-generation schizonts of *Eimeria bovis* in cultured bovine cells. J.Protozool. (14): 764-772.
- Fayer, R. and Hammond, D. M. (1969): Morphological changes in *Eimeria bovis* sporozoites during their first day in cultured mammalian cells. J.Parasitol. (55): 398-401.
- Fischer, H. G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H. E., and Reichmann, G. (1998): GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. Mol.Biochem.Parasitol. (91): 251-262.
- Foussard, F., Gallois, Y., Tronchin, G., Robert, R., and Mauras, G. (1990): Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition. Parasitol.Res. (76): 563-565.
- Friend, S. C. and Stockdale, P. H. (1980): Experimental *Eimeria bovis* infection in calves: a histopathological study. Can.J.Comp Med. (44): 129-140.

- 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): 353-364.
- Garcia, C. R. (1999): Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. Parasitol.Today (15): 488-491.
- Garcia, J. L., Gennari, S. M., Navarro, I. T., Machado, R. Z., and Sinhorini, I. L. (2004): *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into Iscom. Exp.Parasitol. (108): 40-46.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M., and Barrell, B. (2002): Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature (419): 498-511.
- Garrigos, M., Deschamps, S., Viel, A., Lund, S., Champeil, P., Moller, J. V., and le Maire, M. (1991): Detection of Ca(2+)-binding proteins by electrophoretic migration in the presence of Ca2+ combined with 45Ca2+ overlay of protein blots. Anal.Biochem. (194): 82-88.
- Graat, E. A., Henken, A. M., Ploeger, H. W., Noordhuizen, J. P., and Vertommen, M. H. (1994): Rate and course of sporulation of oocysts of *Eimeria acervulina* under different environmental conditions. Parasitology (108 (Pt 5)): 497-502.
- Grand, R. J., Perry, S. V., and Weeks, R. A. (1979): Troponin C-like proteins (calmodulins) from mammalian smooth muscle and other tissues. Biochem.J. (177): 521-529.
- Gräfner, G., Graubmann, H.-D., Schwarz, K., Hiepe, T. H., and Kron, A. (2005): Weitere Untersuchungen zum Vorkommen, Epizootologie und Bekämpfung der *Eimeria*-Kokzidiose des Rindes unter Bedingungen der Intesiven Stallhaltug. Mh.Vet.Med. (40): 41-44.
- Gubbels, M. J., Wieffer, M., and Striepen, B. (2004): Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa.
 Mol.Biochem.Parasitol. (137): 99-110.

- Bürger, H.-J. (1983): *Eimeria*-Infektionen beim Rind. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 90, 350-357.
- Hakansson, S., Charron, A. J., and Sibley, L. D. (2001): *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. EMBO J. (20): 3132-3144.
- Hammond D.M., Bowman, G. W., Davis, L. R., and Simms, T. B. (1946): The endogenous phase of the life cycle of *Eimeria bovis*. J.Parasitol. (32): 409-427.
- 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): 428-434.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science (241): 42-52.
- Hanks, S. K. and Quinn, A. M. (1991): Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. Methods Enzymol. (200): 38-62.
- Hanks, S. K. and Hunter, T. (1995): Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J. (9): 576-596.
- Harmon, A. C., Yoo, B. C., and McCaffery, C. (1994): Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. Biochemistry (33): 7278-7287.
- Harper, J. F., Sussman, M. R., Schaller, G. E., Putnam-Evans, C., Charbonneau, H., and Harmon, A. C. (1991): A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. Science (252): 951-954.
- Harper, J. F., Huang, J. F., and Lloyd, S. J. (1994): Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. Biochemistry (33): 7267-7277.
- Harper, J. F., Breton, G., and Harmon, A. (2004): Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. Annu.Rev.Plant Biol. (55): 263-288.

- Harper, J. F. and Harmon, A. (2005): Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. (6): 555-566.
- Head, J. F. and Perry, S. V. (1974): The interaction of the calcium-binding protein (troponin C) with bivalent cations and the inhibitory protein (troponin I). Biochem.J. (137): 145-154.
- 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): 2149-2158.
- Hermosilla, C., Burger, H. J., and Zahner, H. (1999): T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. Vet.Parasitol. (84): 49-64.
- 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): 301-307.
- Hoff, E. F. and Carruthers, V. B. (2002): Is Toxoplasma egress the first step in invasion? Trends Parasitol. (18): 251-255.
- Hoppe, H. C., Ngo, H. M., Yang, M., and Joiner, K. A. (2000): Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. Nat.Cell Biol. (2): 449-456.
- Hu, K., Roos, D. S., and Murray, J. M. (2002): A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*.
 J.Cell Biol. (156): 1039-1050.
- 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): 771-782.
- Isler, C. M., Bellamy, J. E., and Wobeser, G. A. (1987): Pathogenesis of neurological signs associated with bovine enteric coccidiosis: a prospective study and review. Can.J.Vet.Res. (51): 261-270.
- Jacobs, D., Dubremetz, J. F., Loyens, A., Bosman, F., and Saman, E. (1998): Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*.
 Mol.Biochem.Parasitol. (91): 237-249.

- 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): 13-16.
- Kappes, B., Doerig, C. D., and Graeser, R. (1999): An overview of *Plasmodium* protein kinases. Parasitol.Today (15): 449-454.
- 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.
- Khan, S. M., Jarra, W., and Preiser, P. R. (2001): The 235 kDa rhoptry protein of *Plasmodium (yoelii) yoelii*: function at the junction. Mol.Biochem.Parasitol. (117): 1-10.
- Kieschnick, H., Wakefield, T., Narducci, C. A., and Beckers, C. (2001): *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. J.Biol.Chem. (276): 12369-12377.
- Kleber-Janke, T. and Becker, W. M. (2000): Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. Protein Expr.Purif. (19): 419-424.
- Kozak, M. (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.
 Nucleic Acids Res. (15): 8125-8148.
- Kraus, G. (1997): Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. Wiley-VCH, Einheim, 253-260
- Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J. S., Vermunt, A. M., Pain, A., Sauerwein, R. W., Eling, W. M., Hall, N., Waters, A. P., Stunnenberg, H. G., and Mann, M. (2002): Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. Nature (419): 537-542.
- Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J. L., Maes, P., Tartar, A., Capron, A., and Cesbron-Delauw, M. F. (1993): Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. Mol.Biochem.Parasitol. (59): 143-153.

- Leriche, M. A. and Dubremetz, J. F. (1990): Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. Parasitol.Res. (76): 559-562.
- Levine, N. D. (1970): Taxonomy of the sporozoa. J. Parasitol. (56): 208
- Lew, A. E., Anderson, G. R., Minchin, C. M., Jeston, P. J., and Jorgensen, W. K. (2003): Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. Vet.Parasitol. (112): 33-50.
- Li, J. L., Baker, D. A., and Cox, L. S. (2000): Sexual stage-specific expression of a third calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum*. Biochim.Biophys.Acta (1491): 341-349.
- 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
- Lovett, J. L., Marchesini, N., Moreno, S. N., and Sibley, L. D. (2002): *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. J.Biol.Chem. (277): 25870-25876.
- Lovett, J. L. and Sibley, L. D. (2003): Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. J.Cell Sci. (116): 3009-3016.
- Lu, S. X. and Hrabak, E. M. (2002): An *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. Plant Physiol (128): 1008-1021.
- Ludwig, A. A., Romeis, T., and Jones, J. D. (2004): CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. J.Exp.Bot. (55): 181-188.
- Martin, M. L. and Busconi, L. (2000): Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. Plant J. (24): 429-435.
- Martin, M. L. and Busconi, L. (2001): A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. Plant Physiol (125): 1442-1449.

- Matthiesen, S. H., Shenoy, S. M., Kim, K., Singer, R. H., and Satir, B. H. (2001): A parafusin-related *Toxoplasma gondii* in Ca2+-regulated secretory organelles. Eur.J.Cell Biol. (80): 775-783.
- McLaughlin, S. and Aderem, A. (1995): The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. Trends Biochem.Sci. (20): 272-276.
- Meissner, M., Schluter, D., and Soldati, D. (2002): Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. Science (298): 837-840.
- Meissner, M., Reiss, M., Viebig, N., Carruthers, V. B., Toursel, 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 escorters.
 J.Cell Sci. (115): 563-574.
- Menard, R. (2001): Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. Cell Microbiol. (3): 63-73.
- Miller, S. A., Thathy, V., Ajioka, J. W., Blackman, M. J., and Kim, K. (2003): TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase. Mol.Microbiol. (49): 883-894.
- Mohrle, J. J., Zhao, Y., Wernli, B., Franklin, R. M., and Kappes, B. (1997): Molecular cloning, characterization and localization of PfPK4, an eIF-2alpha kinase-related enzyme from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Biochem.J. (328 (Pt 2)): 677-687.
- Mondragon, R. and Frixione, E. (1996): Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. J.Eukaryot.Microbiol. (43): 120-127.
- Monteiro, V. G., de Melo, E. J., Attias, M., and De Souza, W. (2001): Morphological changes during conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites treated with calcium ionophore. J.Struct.Biol. (136): 181-189.
- Mordue, D. G. and Sibley, L. D. (1997): Intracellular fate of vacuoles containing Toxoplasma gondii is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. J.Immunol. (159): 4452-4459.

- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., and Sibley, L. D. (1999): Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. J.Exp.Med. (190): 1783-1792.
- Mordue, D. G., Hakansson, S., Niesman, I., and Sibley, L. D. (1999): *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. Exp.Parasitol. (92): 87-99.
- Morris, M. T., Coppin, A., Tomavo, S., and Carruthers, V. B. (2002): Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. J.Biol.Chem. (277): 45259-45266.
- Morrissette, N. S. and Sibley, L. D. (2002): Cytoskeleton of apicomplexan parasites. Microbiol.Mol.Biol.Rev. (66): 21-38.
- Moskes, C., Burghaus, P. A., Wernli, B., Sauder, U., Durrenberger, M., and Kappes, B. (2004): Export of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1 to the parasitophorous vacuole is dependent on three N-terminal membrane anchor motifs. Mol.Microbiol. (54): 676-691.
- Moudy, R., Manning, T. J., and Beckers, C. J. (2001): The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. J.Biol.Chem. (276): 41492-41501.
- Murray, D., Hermida-Matsumoto, L., Buser, C. A., Tsang, J., Sigal, C. T., Ben Tal, N., Honig, B., Resh, M. D., and McLaughlin, S. (1998): Electrostatics and the membrane association of Src: theory and experiment. Biochemistry (37): 2145-2159.
- Nakaar, V., Ngo, H. M., Aaronson, E. P., Coppens, I., Stedman, T. T., and Joiner, K. A. (2003): Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*.
 J.Cell Sci. (116): 2311-2320.
- Nakanishi, S., Yamada, K., Iwahashi, K., Kuroda, K., and Kase, H. (1990): KT5926, a potent and selective inhibitor of myosin light chain kinase. Mol.Pharmacol. (37): 482-488.
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L., and O'Connor, G. R. (1983): Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. J.Ultrastruct.Res. (83): 85-98.

- Nichols, B. A. and Chiappino, M. L. (1987): Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. J.Protozool. (34): 217-226.
- Niilo, L. (1970): Bovine coccidiosis in Canada. Can.Vet.J. (11): 91-98.
- Nyberg, P. A. and Hammond, D. M. (1964): Excystation of *E. bovis* and other species of bovine coccidia. J.Protozool. (11): 474-480.
- Opitz, C. and Soldati, D. (2002): 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Mol.Microbiol. (45): 597-604.
- Pasamontes, L., Hug, D., Humbelin, M., and Weber, G. (1993): Sequence of a major *Eimeria maxima* antigen homologous to the *Eimeria tenella* microneme protein Etp100.
 Mol.Biochem.Parasitol. (57): 171-174.
- Peitzsch, R. M. and McLaughlin, S. (1993): Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. Biochemistry (32): 10436-10443.
- 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): 192-199.
- Pellerdy, L.P. (1974): Coccidia and Coccidiosis., Paul Parey Verlag, Berlin, 2. Auflage, 723-761
- Pezzella-D'Alessandro, N., Le Moal, H., Bonhomme, A., Valere, A., Klein, C., Gomez-Marin, J., and Pinon, J. M. (2001): Calmodulin distribution and the actomyosin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii*. J.Histochem.Cytochem. (49): 445-454.
- Pezzella, N., Bouchot, A., Bonhomme, A., Pingret, L., Klein, C., Burlet, H., Balossier, G., Bonhomme, P., and Pinon, J. M. (1997): Involvement of calcium and calmodulin in *Toxoplasma gondii* tachyzoite invasion. Eur.J.Cell Biol. (74): 92-101.
- Pinontoan, R., Yuasa, T., Anderca, M. I., Matsuoka, T., Uozumi, N., Mori, H., and Muto, S. (2000): Cloning of a cDNA encoding a 66-kDa Ca2+-dependent protein kinase (CDPK) from *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta). Journal of Phycology (36): 545-552.

- 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): 537-547.
- Reduker, D. W. and Speer, C. A. (1986): Antigens of in vitro-produced first-generation merozoites of *Eimeria bovis* (Apicomplexa). J.Parasitol. (72): 782-785.
- Refega, S., Girard-Misguich, F., Bourdieu, C., Pery, P., and Labbe, M. (2003): Gene discovery in *Eimeria tenella* by immunoscreening cDNA expression libraries of sporozoites and schizonts with chicken intestinal antibodies. Vet.Parasitol. (113): 19-33.
- 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): 563-578.
- Resh, M. D. (1999): Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. Biochim.Biophys.Acta (1451): 1-16.
- Roberts, W. L. and Hammond, D. M. (1970): Ultrastructural and cytologic studies of the sporozoites of four *Eimeria* species. J.Protozool. (17): 76-86.
- Rodrigues, C. O., Scott, D. A., Bailey, B. N., De Souza, W., Benchimol, M., Moreno, B., Urbina, J. A., Oldfield, E., and Moreno, S. N. (2000): Vacuolar proton pyrophosphatase activity and pyrophosphate (PPi) in *Toxoplasma gondii* as possible chemotherapeutic targets. Biochem.J. (349 Pt 3): 737-745.
- Romeis, T., Ludwig, A. A., Martin, R., and Jones, J. D. (2001): Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. EMBO J. (20): 5556-5567.
- Russel, D. G. and Burns, R. G. (1984): The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. J.Cell Sci. (65): 193-207.
- Rutschmann, F., Stalder, U., Piotrowski, M., Oecking, C., and Schaller, A. (2002): LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. Plant Physiol (129): 156-168.

- Ryan, R., Shirley, M., and Tomley, F. (2000): Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella*. Int.J.Parasitol. (30): 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): 526-530.
- Sahlinger, R. (1977): Beitrag zur Verbreitung der Rinderkokzidien in Österreich sowie Versuche zur Differentialdiagnose von Oozysten mittels Rasterelektronenmikroskopie und Disk-Elektrophorese. Inaug. Diss., Vet. Med., Wien
- Sam-Yellowe, T. Y. (1996): Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. Parasitol.Today (12): 308-316.
- Satterlee, J. S. and Sussman, M. R. (1998): Unusual membrane-associated protein kinases in higher plants. J.Membr.Biol. (164): 205-213.
- Scholtyseck, E., Mehlhorn, H., and Friedhoff, K. (1970): The fine structure of the conoid of sporozoa and related organisms. Z.Parasitenkd. (34): 68-94.
- Scholtyseck, E., Mehlhorn, H., and Senaud, J. (1972): Die subpellikulären Mikrotubuli in den Merozoiten von *Eimeria falciformis*. Z.Parasitenkd. (40): 281-294.
- Scholtyseck, E. (1973): Ultrastructure. In: Hammond, D. M. und Long, P. L. (eds.): The Coccidia. *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and related organisms., University Park Press, Baltimore, 82-104
- Scholtyseck, E. (1978): Fine Structure of Parasitic Protozoa., Springer Verlag, Heidelerberg, 15-34
- Schwartzman, J. D., Krug, E. C., Binder, L. I., and Payne, M. R. (1985): Detection of the microtubule cytoskeleton of the coccidian *Toxoplasma gondii* and the hemoflagellate Leishmania donovani by monoclonal antibodies specific for betatubulin. J.Protozool. (32): 747-749.
- Seeber, F., Beuerle, B., and Schmidt, H. H. (1999): Cloning and functional expression of the calmodulin gene from *Toxoplasma gondii*. Mol.Biochem.Parasitol. (99): 295-299.
- Shirley, M. W. (1994): The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organisation. Parasitol.Res. (80): 366-373.
- Shirley, M. W. (2000): The genome of *Eimeria* spp., with special reference to Eimeria tenella--a coccidium from the chicken. Int.J.Parasitol. (30): 485-493.
- Shirley, M. W., Ivens, A., Gruber, A., Madeira, A. M., Wan, K. L., Dear, P. H., and Tomley, F. M. (2004): The Eimeria genome projects: a sequence of events. Trends Parasitol. (20): 199-201.
- 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): 301-311.
- Sibley, L. D., Hakansson, S., and Carruthers, V. B. (1998): Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. Curr.Biol. (8): R12-R14.
- Sibley, L. D. (2003): *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. Traffic. (4): 581-586.
- Sigal, C. T., Zhou, W., Buser, C. A., McLaughlin, S., and Resh, M. D. (1994): Aminoterminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (91): 12253-12257.
- 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): 1293-1302.
- Soldati, D. and Meissner, M. (2004): Toxoplasma as a novel system for motility. Curr.Opin.Cell Biol. (16): 32-40.
- Song, H. O., Ahn, M. H., Ryu, J. S., Min, D. Y., Joo, K. H., and Lee, Y. H. (2004): Influence of calcium ion on host cell invasion and intracellular replication by *Toxoplasma gondii*. Korean J.Parasitol. (42): 185-193.
- Stockdale, P. H., Sheard, A., and Tiffin, G. B. (1982): Resistance to *Eimeria bovis* produced after chemotherapy of experimental infections in calves. Vet.Parasitol. (9): 171-177.

- Stommel, E. W., Ely, K. H., Schwartzman, J. D., and Kasper, L. H. (1997): *Toxoplasma gondii*: dithiol-induced Ca2+ flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole. Exp.Parasitol. (87): 88-97.
- Stommel, E. W., Cho, E., Steide, J. A., Seguin, R., Barchowsky, A., Schwartzman, J. D., and Kasper, L. H. (2001): Identification and role of thiols in *Toxoplasma gondii* egress. Exp.Biol.Med.(Maywood.) (226): 229-236.
- Stone, J. M. and Walker, J. C. (1995): Plant protein kinase families and signal transduction. Plant Physiol (108): 451-457.
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., and Ward, G. E. (1996): Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (93): 8413-8418.
- Swedlow, J. R., Hu, K., Andrews, P. D., Roos, D. S., and Murray, J. M. (2002): Measuring tubulin content in *Toxoplasma gondii*: a comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (99): 2014-2019.
- Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A. C., and Aderem, A. (1991): Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. Nature (351): 320-322.
- 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): 195-206.
- Tomley, F. M. and Soldati, D. S. (2001): Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. Trends Parasitol. (17): 81-88.
- Torpier, G., Darde, M. L., Caron, H., Darcy, F., and Capron, A. (1991): Toxoplasma gondii: membrane structure differences between zoites demonstrated by freeze fracture analysis. Exp.Parasitol. (72): 99-102.
- Vieira, M. C. and Moreno, S. N. (2000): Mobilization of intracellular calcium upon attachment of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to human fibroblasts is required for invasion. Mol.Biochem.Parasitol. (106): 157-162.

- Vitart, V., Christodoulou, J., Huang, J. F., Chazin, W. J., and Harper, J. F. (2000): Intramolecular activation of a Ca(2+)-dependent protein kinase is disrupted by insertions in the tether that connects the calmodulin-like domain to the kinase. Biochemistry (39): 4004-4011.
- 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): 203-214.
- Weljie, A. M. and Vogel, H. J. (2004): Unexpected structure of the Ca2+-regulatory region from soybean calcium-dependent protein kinase-alpha. J.Biol.Chem. (279): 35494-35502.
- Wetzel, D. M., Hakansson, S., Hu, K., Roos, D., and Sibley, L. D. (2003): Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. Mol.Biol.Cell (14): 396-406.
- Yoon, G. M., Cho, H. S., Ha, H. J., Liu, J. R., and Lee, H. S. (1999): Characterization of *Nt*CDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein.
 Plant Mol.Biol. (39): 991-1001.
- Zhang, X. S. and Choi, J. H. (2001): Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. J.Mol.Evol. (53): 214-224.
- Zhao, Y., Kappes, B., Yang, J., and Franklin, R. M. (1992): Molecular cloning, stagespecific expression and cellular distribution of a putative protein kinase from *Plasmodium falciparum*. Eur.J.Biochem. (207): 305-313.
- Zhao, Y., Kappes, B., and Franklin, R. M. (1993): Gene structure and expression of an unusual protein kinase from *Plasmodium falciparum* homologous at its carboxyl terminus with the EF hand calcium-binding proteins. J.Biol.Chem. (268): 4347-4354.
- Zhao, Y., Franklin, R. M., and Kappes, B. (1994): *Plasmodium falciparum* calciumdependent protein kinase phosphorylates proteins of the host erythrocytic membrane. Mol.Biochem.Parasitol. (66): 329-343.
- Zhao, Y., Pokutta, S., Maurer, P., Lindt, M., Franklin, R. M., and Kappes, B. (1994): Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum* and the significance of individual calcium-binding sites for kinase activation. Biochemistry (33): 3714-3721.

9 ANHANG

Tabelle 9.1: In dieser Arbeit verwendete Programme

Programme	URL
Datenbanksuche	
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
European Bioinformatics Institute	http://www.ebi.ac.uk/
Eimeria tenella-Genomprojekt	http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/
Programme zur Sequenzanalyse	
The Sequence Manipulation Suite	http://bioinformatics.org/sms/
Multipler Sequenzvergleich	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
(ClustalW)	
Boxshade	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
Simple Modular Architecture	http://smart.embl-heidelberg.de/
Research Tool, SMART	
Ermittlung der Myristoylierung-	http://www.expasy.ch/tools/myristoylator/
konsensus-Sequenz, Myristoylator	
Voraussage von funktionälen	http://elm.eu.org/
Gruppen von einer Proteinsequez,	
ELM	
Kodon-Nutzung-Analyse, GCUA	http://gcua.schoedl.de/
Primerdesign	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-
	bin/primer3/primer3_www.cgi
Chromas 1.45	http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html
Erstellung von phylogenetischen	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
Bäumen	

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei allen hezlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. H. Zahner danke ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, seine Geduld, die kritische Betrachtung der Ergebnisse und schnelle Durchsicht der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt dem Herrn Prof. Dr. E. Beck für die technische Unterstützung bei der Herstellung der cDNA-Bank und bei der Proteinexpression sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft bei den technischen und experimentellen Problemen und seine wertvollen Tips und Ratschläge in biochemischen Fragen.

Bei Herrn Dr. J. Hirzmann bedanke ich mich für die freundliche Betreuung bei der Durchführung einiger molekularbiologischer Experimente und sein offenes Ohr bei vielen Fragen sowie seine Hilfe bei der Sequenzanalyse.

Ganz herzlich möchte ich Frau C. Henrich für ihr Engagement und zuverlässige Mitarbeit bei der Ausführung Experimenten danken. Ebenso danke ich Frau B. Hoffman und Frau T. Scheld für die Einweisung in die Zellkultur und die Hilfestellung beim Materialsammeln.

Weiterhin danke ich Frau Dr. A. Taubert, Herrn Dr. C Hermosilla und Herrn Dr. T. Dafa'alla für die freundliche Atmosphäre, Ideen und Disskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. C. Bauer danke ich für seine Ratschläge und Hilfe bei allen Fragen und Problemen.

Ich möchte mich auch für die Hilfesbereitschaft bei zahlreichen Fragen und Bitten und auch nicht zuletzt für eine witzige und entspannte Atmosphäre im Dokrandenzimmer, welche dafür sorgte, daß das Schreiben des Manuskripts nicht zu einer langweiligen Beschäftigung wurde, bei Niko Pantchev, Anke Sühwold, Stefanie Stankewitz, Mirjam Lang, Denis Wolf, Svenja Beckmann und Thomas Quack bedanken. Jan Behrendt und Kathleen Lutz danke ich besonders für die Hilfestellung, beim Zusammenfassen und Drucken des Manuskriptes, und auch CLSM-Untersuchungen

Für die Ratschläge bei der Abfassung des Manuskripts sowie die ständige Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn Prof. C. Grevelding.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. E. Petzinger und Herrn Prof. Dr. R. Bauerfeind sowie Frau J. Heber danke ich für die Organisation aller Belange des Graduiertenkollegs "Molekulare Veterinärmedizin".

Mein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Eltern; ohne deren Hilfe wäre mein Studium und meine Promotion nicht gewesen.

Diese Arbeit wurde durch das Graduiertenkolleg "Molekulare Veterinärmedizin" unterstützt

Feci, quod potui, faciant meliora potentes

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlicher 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."

édition scientifique VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG GLEIBERGER WEG 4 D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757 redaktion@doktorverlag.de w w w . d o k t o r v e r l a g . d e

